



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO DA FORMAÇÃO DE COMPOSTOS  
CARBONÍLICOS, COM ÊNFASE EM HIDROXIALDEÍDOS  $\alpha$ ,  
 $\beta$ - INSATURADOS, NA FASE LÍQUIDA DE ÓLEO DE SOJA  
AQUECIDO E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE ÍONS  
METÁLICOS**

**LUCIANE CONCEIÇÃO SILVA BASTOS**

Salvador – 2014

LUCIANE CONCEIÇÃO SILVA BASTOS

ESTUDO DA FORMAÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS, COM ÊNFASE EM  
HIDROXIALDEÍDOS  $\alpha$ ,  $\beta$ -INSATURADOS, NA FASE LÍQUIDA DE ÓLEO DE SOJA  
AQUECIDO E AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS

Orientador: Profº Dr. Pedro Afonso de Paula Pereira

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

Salvador – 2014

Sistema de Bibliotecas – IQ/UFBA

Bastos, Luciane Conceição Silva.

Estudo da formação de compostos carbonílicos, com ênfase em hidroxialdeídos  $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturados, na fase líquida de óleo de soja aquecido e avaliação da influência de íons metálicos / Luciane Conceição Silva Bastos - 2015.

131 f.:il.

Inclui anexos

Orientador: Prof. Dr. Pedro Afonso de Paula Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2014.

1. Óleos vegetais. 2. Compostos carbonílicos. 3. Íons metálicos. 4. Altas temperaturas. I. Pereira, Pedro Afonso de Paula. II. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. III. Título.

CDD - 665.3

CDU - 546.3:665.35

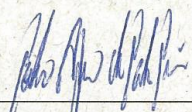
TERMO DE APROVAÇÃO

LUCIANE CONCEIÇÃO SILVA BASTOS

Estudo da formação de compostos carbonílicos, com ênfase em hidroxialdeídos  $\alpha$ -,  $\beta$ -insaturados, na fase líquida de óleo de soja aquecido e avaliação da influência de íons metálicos

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

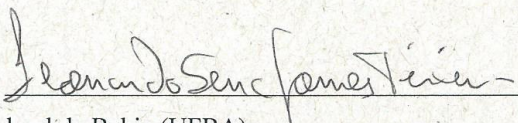
Prof. Dr. Pedro Afonso de Paula Pereira



Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Universidade Federal da Bahia

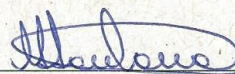
Prof. Dr. Leonardo Sena Gomes Teixeira



Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Universidade Federal da Bahia

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marta Valéria Almeida Santana



Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Universidade Estadual da Bahia

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Clícia Maria Jesus Benevides



Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Universidade Estadual da Bahia

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilian Lefol Nani Guarieiro



Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)

SENAI/CIMATEC

Salvador, 28 de novembro de 2014.

*Dedico esta conquista aos meus eternos e incondicionais amores: meu avô Joaquim da Silva (in memória) pelo sonho de me ver estudar e a meus sobrinhos, Linda e Francisco por tornarem meus dias mais alegres e suaves.*

## AGRADECIMENTOS

Todos nós precisamos acreditar que algo só é possível se é feito com amor, dedicação e força de espírito. Essas forças nos vêm de muitas fontes e é a elas que agradeço imensamente.

Ao Professor Pedro Afonso de Paula Pereira, pela oportunidade concedida, confiança, paciência, competência com que me orientou e pelos seus ensinamentos, que contribuiu muito para a minha formação.

Aos professores membros da banca examinadora pela colaboração valiosa nas sugestões e correções.

Aos professores Jailson Bittencourt, Wilson Lopes, Luis Carvalho, Luciana Almeida, Gisele Olimpo e Claudia Martins pelos exemplos de profissionais, estímulo, carinho e ensinamentos.

A todos do Laboratório de pesquisa e desenvolvimento em química (LPQ), pela convivência, troca de experiências e conhecimentos, conversas e risadas.

Aos queridos amigos Jeancarlo, Rogério, Aldenor, Nina, Ana Célia, Ana Carla, pelas palavras de ânimo, conforto, otimismo, amizade, cumplicidade, torcida para o bom êxito deste trabalho.

Às alunas de iniciação científica, Hortência Coutinho e Elayne Costa que contribuíram diretamente para a realização desse trabalho.

À Eliane Teixeira pelo suporte, empenho e dedicação com que cuida de todos do LPQ.

Aos meus pais, Jane e Lazaro Bastos, pelo apoio, incentivo e amor dispensado em todo trajeto da minha vida. Obrigado por terem acreditado nesse e em tanto outros sonhos.

A toda minha família pelas orações, amor, apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao meu marido Fabrício Lacerda pelo incentivo, estímulo, apoio, compreensão e carinho imprescindíveis. Obrigada por tudo!

Ao CNPq pelo apoio e suporte financeiro.

A todos que direta ou indiretamente torceram e me apoiaram para a realização deste trabalho ao longo desses anos.

**De uma maneira especial a Deus, pela força, ânimo, fé, saúde e disposição para trabalhar com amor. Obrigada!**

*“Bom mesmo é ir a luta com determinação, abraçar a vida e viver com paixão. Perder com classe e vencer com ousadia. Pois o triunfo pertence a quem mais se atreve. (...) E a vida é muito para ser insignificante”.*

*Charles Chaplin*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TALELAS</b>	<b>XII</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b>	<b>XIII</b>
<b>1.0 CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b>	<b>1</b>
<b>2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	
2.1 Óleos vegetais	4
2.1.1 Óleo de soja	9
2.2 Aspectos nutricionais dos óleos	11
2.3 Processo de fritura por imersão	13
2.3.1 Processo de degradação dos óleos vegetais	14
2.3.1.1 Hidrólise	15
2.3.1.2 Oxidação	16
2.3.1.3 Polimerização	21
2.3.2 Fatores que influenciam na oxidação lipídica	23
2.3.2.1 Influência de íons metálicos na oxidação lipídica	24
2.3.3 Principais produtos secundários da oxidação lipídica	27
2.3.3.1 Hidroxialquenos $\alpha$ , $\beta$ -insaturados	30
2.4 Principais métodos de avaliação da qualidade dos óleos	33
2.4.1 Principais métodos de análise de compostos carbonílicos em óleos vegetais	38
<b>3.0 JUSTIFICATIVA</b>	<b>41</b>
<b>4.0 OBJETIVOS</b>	
4.1 Objetivos gerais	42
4.2 Objetivos específicos	42
<b>5.0 EXPERIMENTAL</b>	
5.1 Reagentes e Solventes	43
5.2 Materiais	43
5.3 Equipamentos	44
5.4 Preparo da solução de 2,4- DNPH	44
5.5 Síntese das hidrazonas dos compostos carbonílicos	45
5.6 Preparo das soluções padrão	46



5.7 Obtenção e preparo da amostra de óleo	48
5.8 Descrição do sistema experimental	48
5.9 Procedimento de extração dos compostos carbonílicos nas amostras de óleo	49
5.10 Método cromatográfico (UFLC-DAD-ESI-MS)	50
<b>6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	
6.1 Determinação das condições cromatográficas de separação	52
6.2 Otimização das condições de extração dos compostos carbonílicos no óleo	53
6.2.1 Seleção do solvente extrator	54
6.2.2 Seleção do volume do solvente extrator	55
6.2.3 Seleção do modo, velocidade e tempo de agitação	57
6.2.4 Seleção do tempo de sonicação	59
6.2.5 Condições otimizadas para a extração dos cc de óleos vegetais	60
6.3 Validação do método	61
6.3.1 Efeito da matriz	61
6.3.2 Seletividade	64
6.3.3 Linearidade e faixas de trabalho	67
6.3.4 Sensibilidade	68
6.3.5 Limites de detecção e quantificação	69
6.3.6 Precisão do método	71
6.3.7 Exatidão	73
6.4 Identificação de compostos carbonílicos presentes no óleo de soja aquecido	75
6.5 Determinação de compostos carbonílicos em óleo de soja em função do tempo de aquecimento (sem adição de metais)	78
6.6 Correlação de Pearson entre os compostos carbonílicos identificados no óleo de soja (sem adição de metais)	91
6.7 Influência de íons metálicos na degradação do óleo de soja durante aquecimento	94
<b>7.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	104
<b>8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	106
<b>9.0 ANEXO</b>	
9.1 Anexo A	117
9.2 Anexo B	125

## RESUMO

A fritura é um processo rápido de preparação do alimento, resultando em produtos com aroma, sabor e textura agradável. As alterações que se processam em um óleo comestível durante o preparo de alimentos, são derivadas de reações hidrolíticas, térmicas e oxidativas. Entre os compostos formados durante a degradação dos óleos pode-se destacar os hidroxialquênais  $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturados, devido a seus efeitos citotóxicos e mutagênicos, uma vez que eles podem interferir em uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo a inibição de proteínas e a síntese de DNA. Esse trabalho teve como objetivo estudar a formação de compostos carbonílicos (CC), com ênfase nos hidroxialdeídos  $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturados, na fração líquida do óleo quando submetido a aquecimento contínuo a temperatura típica de processo de fritura (180°C), na presença dos íons metálicos Fe(III), Cu(II) e Mn(II), em diferentes concentrações (10, 30 e 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de óleo) ao longo de oito horas de aquecimento. Para determinação dos CC, foi desenvolvida, validada e aplicada metodologia analítica por extração líquido-líquido e análise por UFLC-DAD-ESI-MS. No desenvolvimento do método foram avaliados: solvente extrator, volume do extrator, modo e velocidade de agitação e tempo de sonicação. Na validação do método foram avaliados o efeito da matriz, sensibilidade, seletividade, linearidade das curvas analíticas, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão. Dentre os CC estudados foram identificados e quantificados dez: 4-hidroxi-2-trans-hexenal, 4-hidroxi-2-trans-nonenal, 4,5-epoxi-2-decenal, acroleína, 2-heptenal, 2,4-heptadienal, 2-octenal, 2,4-decadienal, 2-decenal e 2-undecenal. Além destes, o hidroxi-decadienal e o dihidroxi-decenal foram propostos como também sendo formados, baseando-se na análise dos espectros de massas dos picos cromatográficos. Durante o aquecimento, 4-hidroxi-2-trans-nonenal, 2,4-decadienal e 2,4-heptadienal foram os compostos que apresentaram as maiores concentrações médias nas oito horas de aquecimento. No estudo da influência dos metais, de um modo geral, a adição dos íons metálicos às amostras provocou um aumento nas concentrações dos CC, sendo que o 2-undecenal, 4-hidroxi-2-trans-hexenal e o 2-decenal foram os que tiveram os maiores aumentos relativos nas concentrações. Em termos de efeito catalítico, o cobre foi o metal que mostrou-se mais eficiente em promover um aumento nas concentrações, seguido do manganês, sendo que, em geral, esses efeitos eram superiores na concentração de 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ . Por outro lado, os íons metálicos estudados não afetaram significativamente a ordem de concentração com que os CC foram formados; entretanto, atuaram como catalisadores de reações oxidativas, acelerando o processo de degradação dos óleos vegetais e com isso aumentaram a formação de compostos secundários, como os compostos carbonílicos. Finalmente, cabe destacar as concentrações relativamente altas do 4-hidroxi-2-trans-nonenal, 2,4-decadienal e 4,5-epoxi-2-decenal, encontradas neste estudo na fração líquida do óleo de soja, tendo em vista sua alta toxicidade relatada e uma possível transferência para os alimentos em contato com o óleo.

**Palavras-chave:** óleos vegetais; compostos carbonílicos; hidroxialdeídos  $\alpha$ -,  $\beta$ -insaturados, íons metálicos; UFLC-DAD-MS

## ABSTRACT

The frying is a rapid process of preparing the food, resulting in products with nice aroma, flavor and texture. The changes that occur in the edible oil during food preparation are derived from hydrolytic, thermal and oxidative reactions. Among the compounds formed during the degradation of oils can highlight the  $\alpha$ ,  $\beta$ - unsaturated hydroxyalkenals, due to their cytotoxic and mutagenic effects, since they may interfere with a wide range of biological activities, including inhibition of protein and DNA synthesis. This work aimed to study the formation of carbonyl compounds, with emphasis on  $\alpha$ ,  $\beta$ - unsaturated hydroxyaldehydes present in soybean oil when subjected to the process continuous heating at typical frying temperature (180°C), in the presence of metal ions such as Fe (II), Cu (II) and Mn (II), in different concentrations (10, 30 and 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$  oil) over eight hours of heating. For determination of carbonyl compounds in oil samples was developed, validated and applied the analytical method by liquid-liquid extraction and analysis by UFLC-DAD/ESI-MS. In developing the method were evaluated: solvent extractor, extractor volume, mode and rate of stirring and sonication time; in the validation of the method were evaluated the matrix effect, sensitivity, selectivity, linearity of the calibration curves, limits of detection and quantification, precision and accuracy. We identified and quantified ten CC: 4-hydroxy-2-trans-hexenal, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, 4,5-epoxy-2-decadal, acrolein, 2-heptenal, 2,4-heptadienal, 2-octenal, 2,4-decadienal, 2-decadal and 2-undecenal. In addition, the hydroxy-dihydroxy-decadienal and decadal also been proposed as being formed, based on the analysis of the mass spectra of the chromatographic peaks. During heating, 4-hydroxy-2-trans-nonenal, 2,4-heptadienal and 2,4-decadienal were compounds which had the highest average concentration within eight hours of heating. In the study of the influence of metals, in general, the addition of metal ions to the samples caused an increase in the concentration of CC, wherein the 2-undecenal, 4-hydroxy-2-hexenal and trans-2-decadal were that had the greatest relative increases in concentrations. In terms of catalytic effect, copper is the metal which was more efficient at promoting an increase in concentration followed by manganese, and, in general, these effects were higher in concentration of 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . On the other hand, the metal ions studied did not significantly affect the order that the CC concentration were formed; however, acted as catalysts for oxidative reactions, accelerating the process of degradation of vegetable oils and thereby increased the formation of secondary compounds, such as carbonyl compounds. Finally, we highlight the 4,5-epoxy-2-decadal relatively high concentrations of HNE, 2,4-decadienal, and in this study the liquid fraction of soybean oil, given its high toxicity and reported a possible transfer to food in contact with the oil.

**Keywords:** vegetable oils; carbonyl compounds;  $\alpha$ ,  $\beta$ - unsaturated hydroxyaldehydes; metal ions; UFLC-DAD-MS

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura genérica de uma molécula de triacilglicerol.	4
<b>Figura 2.</b> Estruturas dos principais ácidos graxos presente nos óleos vegetais.	5
<b>Figura 3.</b> Consumo mundial de óleos vegetais a partir de 1995/96 a 2013/14, por tipo de óleo (em milhões de toneladas).	7
<b>Figura 4.</b> Configuração <i>cis</i> e <i>trans</i> de uma ácido graxo.	13
<b>Figura 5.</b> Hidrólise sequencial de um triacilglicerol, catalisada por lipase.	15
<b>Figura 6.</b> Reação de formação da acroleína a partir da desidratação do glicerol.	16
<b>Figura 7.</b> Esquema geral da foto-oxidação.	17
<b>Figura 8.</b> Esquema geral de oxidação de ácidos graxos.	19
<b>Figura 9:</b> Formação de um composto cíclico a partir do ácido linoleico.	22
<b>Figura 10.</b> Esquema de formação de acroleína a partir do ácido linolênico.	29
<b>Figura 11.</b> Estrutura geral dos hidroxialquênais.	30
<b>Figura 12.</b> Formação de aduto a partir da interação do HNE e uma proteína.	31
<b>Figura 13.</b> Esquema de formação do HNE, a partir da oxidação do ácido linoléico.	32
<b>Figura 14.</b> Reação geral de compostos carbonílicos com a 2,4 dinitrofenilhidrazina, formando as hidrazonas das carbonilas.	39
<b>Figura 15.</b> Foto do sistema experimental.	49
<b>Figura 16.</b> Separação da fase extratora da matriz.	50
<b>Figura 17.</b> Sistema UFLC-DAD-ESI-MS utilizado na análise das amostras.	51
<b>Figura 18.</b> Cromatograma obtido por UFLC-DAD de uma mistura padrão dos CC.	53
<b>Figura 19.</b> Variação do sinal analítico em função do tipo de solvente extrator.	55
<b>Figura 20.</b> Variação do sinal analítico em função do volume do solvente extrator.	56
<b>Figura 21.</b> Cromatograma da segunda extração de uma amostra de óleo fortificada com uma mistura padrão de 8,0 µg.mL <sup>-1</sup> .	57
<b>Figura 22.</b> Avaliação do modo, velocidade e tempo de agitação na extração dos CC em amostra de óleo vegetal.	58
<b>Figura 23.</b> Variação do sinal analítico para as hidrazonas de CC em função do tempo de sonicação da solução.	60
<b>Figura 24.</b> Variação da resposta analítica do HHE em solvente puro e em	63

extrato da matriz.

- Figura 25.** Variação da resposta analítica da acroleína em solvente puro e em extrato da matriz. 63
- Figura 26.** Cromatograma de uma amostra de óleo sem aquecimento. 64
- Figura 27.** Espectros UV-vis, sendo: I e III espectro dos padrões de 4-hidroxi-2-trans-nonenal e 4-hidroxi-2-trans-hexenal, respectivamente; II e IV, espectros referentes aos picos do 4-hidroxi-2-trans-nonenal e 4-hidroxi-2-trans-hexenal em amostra de óleo aquecida. 65
- Figura 28.** Espectros de massas, sendo: I e III espectro dos padrões de 4-hidroxi-2-trans-nonenal e 4-hidroxi-2-trans-hexenal, respectivamente; II e IV, espectros referentes aos picos do 4-hidroxi-2-trans-nonenal e 4-hidroxi-2-trans-hexenal em amostra de óleo aquecida. 66
- Figura 29.** Cromatograma de hidrazonas de CC, referente à amostra coletada em 1 h de aquecimento contínuo para o óleo de soja. 76
- Figura 30.** Espectros de massas referente as hidrazonas 4,5-epoxi-2-decenal (I), HNE (II) e 2,4-heptadienal (III), no modo de ionização negativa. 77
- Figura 31.** Perfis de concentrações dos CC formados pelo no óleo de soja nos diferentes tempos de aquecimento estudados. 79
- Figura 32.** Perfil de concentrações médias dos CC identificados no óleo de soja, referente à média das cinco coletas ao longo de oito horas de aquecimento. 81
- Figura 33.** Rota de formação do hexanal, 2-octenal e 2,4-decadienal a partir do ácido linoléico. 83
- Figura 34.** Rota de formação do propanal, 2,4-heptadienal, 2-hexenal, 2-pentenal e o 2,4,7-decatrienal a partir do ácido linolênico. 84
- Figura 35.** Rota de decomposição do 2,4-heptadienal, com formação do acetaldeído. 85
- Figura 36.** Rota de formação do 2-heptenal e do pentanal a partir do ácido linoléico. 86
- Figura 37.** Rota de formação do 4,5-epoxi-e-decenal a partir do ácido linoléico. 87
- Figura 38.** Rota de formação do octenal e 2-decenal a partir do ácido oléico. 89
- Figura 39.** Rota de formação do nonanal e 2-undecenal a partir do ácido oléico. 90
- Figura 40.** Reações de oxidação envolvendo íons ferro. 94
- Figura 41.** Variação da concentração dos CC, em função da adição de íons Fe (III), Cu (II) e Mn (II); média das três concentrações estudadas. 96
- Figura 42.** Variação no somatório das concentrações dos CC em função da adição de íons Fe (III), Cu (II) e Mn (II); média das três concentrações estudadas. 99

- Figura 43.** Concentrações médias dos CC presentes em amostras de óleo de soja com adição dos íons  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  na concentração de  $50\mu g.kg^{-1}$  . 101
- Figura 44.** Perfil de concentração do 2,4-decadienal, em função do tempo de aquecimento do óleo, sem e com adição dos íons  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  na concentração de  $30\mu g.kg^{-1}$  de óleo 102
- Figura 45.** Perfil de concentração do HNE, em função do tempo de aquecimento do óleo, sem e com adição dos íons  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  na concentração de  $30\mu g.kg^{-1}$  de óleo 103

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Composição, em ácidos graxos dos óleos refinados de canola, girassol, milho, oliva e soja.	6
<b>Tabela 2.</b> Consumo mundial dos principais óleos vegetais, entre 1999/00 e 2011/12 para fins alimentícios e não- alimentícios.	8
<b>Tabela 3.</b> Faixa de composição dos principais ácidos graxos no óleo de soja.	11
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros analíticos utilizados para avaliação da qualidade de óleo, baseados em mudanças físicas e químicas.	35
<b>Tabela 5.</b> Concentrações reais das hidrazonas e dos compostos carbonílicos.	47
<b>Tabela 6.</b> Variáveis otimizadas e seus respectivos valores para a extração dos CC em óleos vegetais.	61
<b>Tabela 7.</b> Equações da curva de calibração, coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e faixa linear de trabalho de cada CC para o método de determinação empregado.	68
<b>Tabela 8.</b> Estudo da sensibilidade do método empregado.	69
<b>Tabela 9.</b> Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ).	70
<b>Tabela 10.</b> Coeficientes de variação (%) obtidos no estudo da precisão intradia.	72
<b>Tabela 11.</b> Coeficientes de variação (%) obtidos no estudo da precisão interdia.	73
<b>Tabela 12.</b> Recuperações relativas e RSD(%) em diferentes níveis de fortificação.	74
<b>Tabela 13.</b> Correlação de Pearson para os CC presentes nas amostra de óleo de soja aquecido.	93

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ABIOVE** – Associação brasileira das indústrias de óleos vegetais

**ACN** – Acetonitrila

**AG** – Ácidos graxos

**AGI** – Ácidos graxos insaturados

**AGPI** – Ácidos graxos poliinsaturados

**AGS** – Ácidos graxos saturados

**AGT** – Ácidos graxos *trans*

**ANVISA** – Agência Nacional de vigilância sanitária

**CC** – Compostos carbonílicos

**CPT** – Compostos polares totais

**EMBRAPA** – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária

**HDL** – Lipoproteína de alta densidade

**HHE** – 4-hidroxi-2-hexenal

**HNE** – 4-hidroxi-2-nonenal

**UFLC-DAD-ESI-MS** – Cromatografia líquida ultrarrápida acoplada a detector por arranjo de diodos e a detector de espectrômetro de massa por ionização eletrospray

**LDL** – Lipoproteína de baixa densidade

**LLE** – Extração líquido-líquido

**LD** – Limite de detecção

**LQ** – Limite de quantificação

**THF** – Tetrahydrofurano

**2,4-DNPH** – 2,4-dinitrofenilidrazina

**2,4-DNPHo** – 2,4-dinitrofenilhidrazona

**$\omega$ -3** – Ômega 3

**$\omega$ -6** – Ômega 6

**$\omega$ -9** – Ômega



## 1.0 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A fritura é um processo de cozimento de alimentos bastante comum na culinária de diversos países, que confere aos mesmos características organolépticas agradáveis, como sabor, odor e textura. O processo de fritura é rápido e prático no preparo de alimentos, muito utilizado de forma doméstica e largamente empregado por estabelecimentos comerciais, como em bares, lanchonetes e restaurantes, indústrias de salgadinhos (*snacks, chips*), cadeias de alimentação rápida (*fast food*), bem como por ambulantes em feiras livres e praças públicas (CELLA et al., 2002).

Os óleos vegetais desempenham importante papel na nutrição humana, atuando como um dos principais aportes energéticos, transportadores de vitaminas lipossolúveis e ácidos graxos essenciais, além de contribuir para o aumento da palatabilidade dos alimentos e sensação de saciedade (Ferrari, 1998; Pereda et al., 2005). Contudo, o consumo de óleos oxidados, como verificado em frituras dos mais diversos tipos de alimentos, traz riscos à saúde humana, pois alguns dos compostos formados pela oxidação têm atividade biológica (Choe e Min, 2007).

Durante o processo de fritura, uma série complexa de reações produz compostos de degradação. O óleo é exposto a três agentes físico-químicos que causam mudanças na sua composição: a água, proveniente do próprio alimento, que acarreta alterações hidrolíticas; o oxigênio, dissolvido no próprio óleo e o que entra em contato com sua superfície, que promovem alterações oxidativas; e o calor fornecido no processo de fritura, do qual resultam as alterações térmicas. Estas alterações promovem modificações visíveis, como o escurecimento do óleo, aumento da viscosidade, formação de espuma e fumaça, além da diminuição das qualidades funcionais, sensoriais e nutricionais do óleo (Bobio e Bobio, 2003; Choe e Min, 2007)

A intensidade com que as reações de degradação dos óleos e gorduras ocorrem depende de vários fatores, como: tipo de óleo empregado, temperatura e tempo de fritura, relação superfície/volume do óleo, tipo de aquecimento, natureza do alimento a ser frito, materiais que constituem as fritadeiras, presença de metais em níveis traço e antioxidantes (Warner, 2002). A combinação destas variáveis determina a taxa com que as reações de degradação irão ocorrer durante o processo de fritura (Lima e Gonçalves, 1994).

Devido à complexidade do processo de fritura, não há um único método capaz de avaliar com precisão a degradação dos óleos. Diferentes tipos de ensaio como índice de acidez, índice de peróxidos e o índice de iodo, são bastante utilizados para avaliar a qualidade dos óleos aquecidos, por serem rápidos e simples (Bobio e Bobio 2003). Entretanto, eles não fornecem informações sobre a identificação dos produtos primários e secundários formados, durante a oxidação térmica de óleos vegetais.

No Brasil praticamente não há um regulamento que estabeleça critérios de qualidade e aceitação nos procedimentos de fritura com óleos vegetais. Existe apenas um informe Técnico, que define que a temperatura de óleo de fritura não deve ultrapassar 180°C. Há também uma regulamentação sobre as características mínimas de qualidade de óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal quanto à acidez e índice de peróxidos (Brasil, 2004). Considerando que parte do óleo utilizado na fritura é absorvida pelo alimento, tornando-se assim parte da nossa dieta, é de grande importância à avaliação das alterações e a identificação e quantificação dos compostos formados no óleo durante o processo de fritura, especialmente para o consumidor final.

Diversos compostos, formados durante a oxidação lipídica, foram identificados durante aquecimento de óleos vegetais, através de diferentes condições de oxidação, como: acetaldeído, acroleína, 2-decenal, 2-octenal, 2-heptenal, 2,4-heptadienal, 2,4-decadienal, 2-undecenal, 4-hidroxi-2-octenal, 4-hidroxi-2-nonenal, 4-hidroxi-2-hexenal, entre outros (Seppanen e Csallany, 2001; Zhu *et al.*, 2001; da Silva e Pereira, 2008). Entre os compostos formados durante a degradação dos óleos, pode-se destacar os hidroxialquenos  $\alpha$ -,  $\beta$ - insaturados, devido a seus efeitos citotóxicos e mutagênicos.

A influência de íons metálicos como ferro, cobre e manganês, em diferentes concentrações (10, 30 e 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ), foi avaliada uma vez que metais atuam como catalisadores de reações oxidativas, e que podem estar presentes no óleo provenientes do próprio solo, onde suas sementes foram cultivadas; de equipamentos utilizados no processo de refino; de recipientes de estocagem; e de utensílios culinários, usados durante o processo de fritura de alimentos (La Pera *et al.* 2002). O óleo de soja foi escolhido para a condução deste trabalho em virtude do

seu grande uso nos hábitos culinários, sendo o segundo óleo vegetal mais consumido mundialmente (Lipid library, 2014).

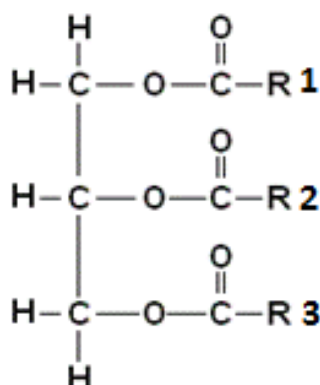
Essa pesquisa teve como objetivo estudar a formação de compostos carbonílicos, com ênfase nos hidroxialdeídos  $\alpha$ -,  $\beta$ - insaturados, na fração líquida do óleo de soja, quando aquecido por diferentes intervalos de tempo à temperatura típica utilizada na fritura de alimentos, em presença de oxigênio atmosférico e de íons metálicos em diferentes concentrações. O estudo envolveu o desenvolvimento, validação e aplicação de metodologia analítica por UFLC-DAD-ESI-MS para análise de compostos carbonílicos na fração líquida de amostras de óleos aquecidos.

## 2.0 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 ÓLEOS VEGETAIS

Óleos e gorduras são substâncias lipofílicas encontrados na natureza em células de origem animal, vegetal e microbiana, e representam uma das três maiores classes de produtos alimentícios, sendo as outras constituídas por proteínas e carboidratos. Dentre as suas mais variadas funções, destaca-se a alimentação humana, por seu valor energético e nutricional (Moretto e Feet, 1998; Araújo, 2008; Mendonça, 2008).

Os óleos são misturas de natureza complexa, compostos por cerca de 98% a 99% de triglicerídeos, contendo ainda frações menores de monoglicerídeos, diglicerídeos, glicerol, fosfolipídios, esteróis, entre outros compostos. Os triglicerídeos são constituídos de uma molécula de glicerol, esterificado com três moléculas de ácidos graxos, e podem ser classificados em simples, quando por hidrólise fornecem ácidos graxos e alcoóis, e em compostos, quando por hidrólise fornecem ácidos graxos, alcoóis e outro grupo funcional, como os fosfolipídios e os glicolipídios (Moretto e Feet, 1998; Oetterer, *et al.*, 2006; Ribeiro e Seravalli, 2007). Na Figura 1 é representada a estrutura química genérica de uma molécula de triacilglicerol.

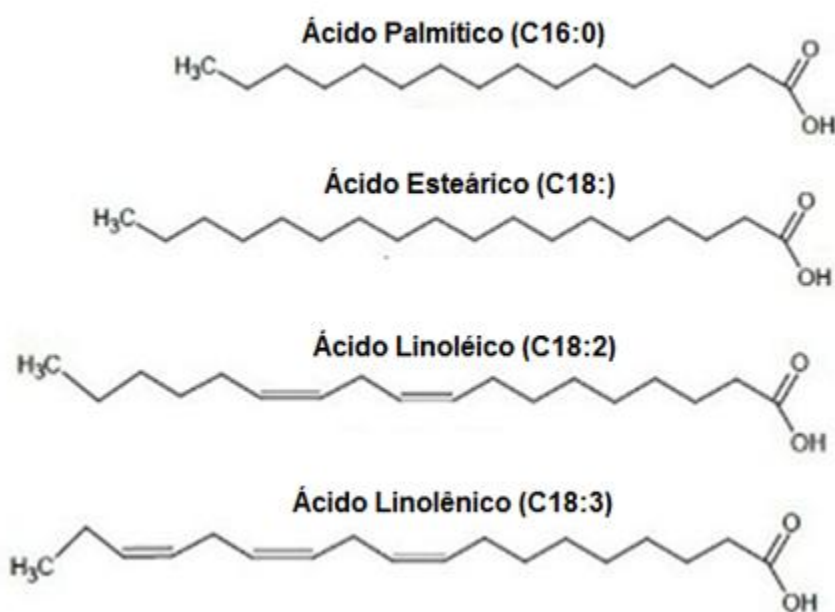


**Figura 1.** Estrutura química genérica de uma molécula de triacilglicerol.

Os ácidos graxos (AG), comumente encontrados nos óleos vegetais, são ácidos monocarboxílicos de cadeia longa e linear, com número par de átomos de carbono. Podem ser saturados ou insaturados, sendo as ligações duplas geralmente

separadas por um grupo metilênico (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-). As duplas ligações impedem a rotação livre dos átomos gerando isômeros *cis* e *trans*, das quais *cis* é a mais comum entre os AG dos óleos vegetais. (Moretto e Feet, 1998; Ribeiro e Seravalli, 2007).

As propriedades físicas, químicas e nutricionais dos óleos dependem, fundamentalmente, da natureza dos AG que os compõem, e a composição em AG varia segundo a fonte de origem. Nos óleos vegetais, os AGS (ácidos graxos saturados) mais comuns são o palmítico (C16:0) e o esteárico (C18:0), enquanto os AGI (ácidos graxos insaturados) são o oléico (C18:1(9)), linoléico (C18:2(9,12)) e linolênico (C18:3(9,12,15)) (Ribeiro e Seravalli, 2007). Na Figura 2 são mostradas as estruturas moleculares dos principais AG encontrados nos óleos vegetais.



**Figura 2.** Estruturas de ácidos graxos presente nos óleos vegetais.

Os AGI podem ser divididos em três séries: ômega 9 ( $\omega$ -9), ômega 6 ( $\omega$ -6) e ômega 3 ( $\omega$ -3), onde  $\omega$  designa o carbono do grupamento metílico terminal da cadeia alquílica dos AGI, e o número indica a posição da primeira dupla a partir do carbono  $\omega$ . A série  $\omega$ -9 é composta por ácidos graxos monoinsaturados, enquanto as séries  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 por AGPI (ácidos graxos poliinsaturados). Nos  $\omega$ -6, a primeira insaturação encontra-se entre os carbonos ( $\omega$ ) 6 e 7, enquanto os  $\omega$ -3 apresentam a primeira dupla ligação entre os carbonos 3 e 4, a partir do grupo metílico terminal da

molécula. Por exemplo, o ácido oléico e o linoléico pertencem às famílias  $\omega$ -9 e  $\omega$ -6, respectivamente (Moretto e Feet, 1998; Bobio e Bobio 2003; Araújo, 2008)

O ácido oléico é o mais comum dos AG monoinsaturados e é encontrado na maioria das gorduras animais, incluindo aves, carne de vaca e cordeiro, bem como em azeitonas, sementes e nozes. O ácido linoléico é o mais importante da série  $\omega$ -6 e está presente de forma abundante nos óleos vegetais, como óleos de girassol, milho, soja, algodão, etc. O ácido linolênico, representante da família  $\omega$ -3, é encontrado em quantidades apreciáveis em sementes oleaginosas como canola, soja e linhaça (Liu *et al.*, 2007; Corsine e Jorge, 2008) .

O teor de AG varia de acordo com a oleaginosa da qual foi extraído, como é mostrado na Tabela 1, e mesmo entre uma mesma espécie pode haver pequenas variações, a depender do clima, do solo de plantio e do adubo utilizado na plantação da oleaginosa (Ribeiro e Seravalli, 2007)

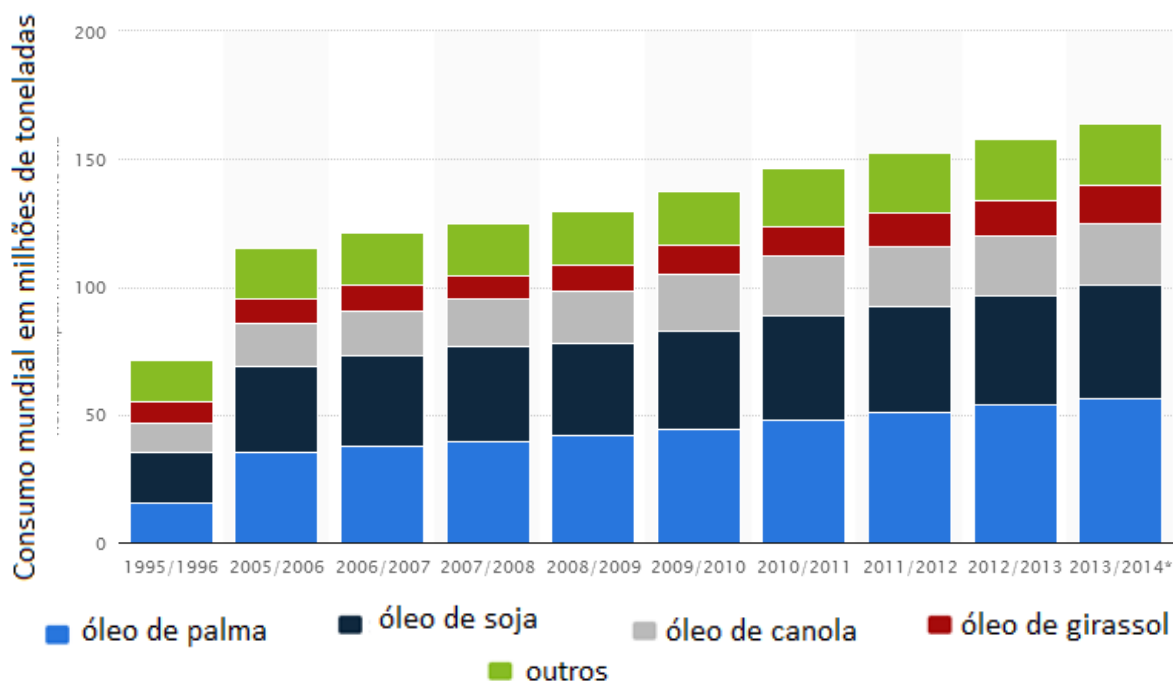
**Tabela 1.** Composição, de ácidos graxos dos óleos refinados de canola, girassol, milho, oliva e soja.

Óleos vegetais	Ácidos graxos saturados (%)	Ácidos graxos monoinsaturados (%)	Ácidos graxos poliinsaturados (%)	
			Ácido linoléico	Ácido linolênico
			Canola	6
Girassol	11	20	69	0
Milho	13	25	61	1
Oliva	14	77	8	< 1
Soja	15	24	54	7

Fonte: Reda, 2007

Os óleos vegetais são frequentemente extraídos de frutos, como o fruto da oliveira (*Olea europea*) e palma (*Elaeis guineensis*) e de diversas sementes oleaginosas, tais como soja (*Glycine hispida*), girassol (*Helianthus annuus*), canola (*Brassica campestris*), algodão (*Gossypum herbaceum*) dentre outras (Campestre, 2014). Os óleos vegetais mais consumidos mundialmente são o óleo de palma, óleo de soja, óleo de canola e o óleo de girassol, respectivamente (Statistics, 2014). A

Figura 3 mostra o panorama de consumo mundial dos principais óleos vegetais de 1995 a 2014.



**Figura 3.** Consumo mundial de óleos vegetais a partir de 1995/96 a 2013/14, por tipo de óleo (em milhões de toneladas).  
**Fonte:** Statistics, 2014

Nas últimas décadas é possível verificar um aumento significativo no consumo mundial de óleos vegetais. Para os óleos de palma e de soja, os dois mais consumidos, houve um aumento de cerca de 350 e 225%, respectivamente entre os anos de 1995/96 a 2013/14 (Statistics, 2014). Esse fator pode estar associado ao crescimento de diferentes setores consumidores de óleos vegetais como restaurantes, sistemas de alimentação coletiva e de alimentos de consumo imediato, e a modificação nos hábitos alimentares (com o aumento no consumo de alimentos fritos e pré-fritos). Tal fato tem sido influenciado por razões sociais e econômicas pois, as pessoas dispõem de menos tempo para preparação de seus alimentos e o processo de fritura fornece uma alternativa mais rápida, ao mesmo tempo em que confere a diversos tipos de alimentos características sensoriais diferenciadas (Jorge e Janieri, 2005; Almeida, *et al.* 2006).

Entretanto, o aumento do consumo de óleos não se deve apenas ao crescimento no setor alimentício, mas também a um crescimento das indústrias

oleoquímicas, voltadas para o ramo não alimentício, como a produção de tintas, lubrificantes, cosméticos, produtos farmacêuticos, iluminação e combustíveis (Lipid library, 2014). O consumo mundial dos principais óleos vegetais utilizados para fins alimentícios e não alimentícios pode ser observado na Tabela 2, onde é apresentado um aumento de 9 para 36 milhões de toneladas de óleos para o setor não alimentício. Este aumento é acentuado a partir de 2003/04, refletindo, principalmente o crescimento da produção de biosiesel na Europa, EUA, Brasil e Argentina (Lipid library, 2014). No Brasil o aumento da produção de biodiesel ocorreu em 2005 com a publicação da Lei 11.097, que obrigava a adição de 2% de biodiesel (B2) a todo diesel utilizado em território nacional. Esta adição sofreu aumento gradativo para B3 em 2008, B4 em 2009 e B5 em 2010, sendo que atualmente a proposta é que se utilize a mistura B7 (Rocha, *et al.* 2013).

**Tabela 2.** Consumo mundial dos principais óleos vegetais, entre 1999/00 e 2011/12 para fins alimentícios e não- alimentícios

<b>Ano</b>	<b>Total</b> (milhões de toneladas)	<b>Alimentícios</b> (milhões de toneladas)	<b>Não- Alimentícios</b> (milhões de toneladas)	<b>Não- Alimentícios</b> (%)
<b>1999/00</b>	82.9	74.2	8.7	10.5
<b>2000/01</b>	88.8	78.6	10.2	11.5
<b>2001/02</b>	91.1	80.2	10.9	12.0
<b>2002/03</b>	95.1	82.9	12.2	12.8
<b>2003/04</b>	100.7	86.9	13.8	13.7
<b>2004/05</b>	108.2	91.5	16.7	15.4
<b>2005/06</b>	114.7	94.2	20.5	17.9
<b>2006/07</b>	119.4	95.9	23.5	19.7
<b>2007/08</b>	125.1	98.8	26.3	21.0
<b>2008/09</b>	129.7	101.4	28.3	21.8
<b>2009/10</b>	137.8	106.4	31.4	22.8
<b>2010/11</b>	144.6	110.9	33.7	23.3
<b>2011/12</b>	150.0	114.2	35.8	23.9

Fonte: Lipid library, 2014



### 2.1.1 ÓLEO DE SOJA

O óleo de soja é extraído das sementes da soja (*Glycine max (L) Merrill*), pertencente à família das leguminosas cuja semente encontra-se dentro de vagens. O óleo de soja refinado apresenta-se como um óleo de cor levemente amarelado, límpido e com odor suave característico (Abiove, 2014).

A soja é um dos principais produtos agrícolas, com papel importante na área econômica e social. É a oleaginosa mais cultivada no Brasil, estando o país na 2ª posição do ranking mundial da produção, perdendo apenas para os Estados Unidos (Abiove, 2014; Embrapa, 2014).

A soja ganhou expressão econômica a partir de meados do Século XX, graças às suas vastas aplicações industriais. Atualmente é a principal oleaginosa, participando com aproximadamente 57% da produção média mundial de grãos fornecedores de óleos. É a cultura que mais cresceu em área e importância econômica durante as últimas décadas (Abiove, 2014; Embrapa, 2014).

No Brasil, a soja foi introduzida em 1908, inicialmente na região de São Paulo, por imigrantes japoneses. Teve sua cultura iniciada no Rio Grande do Sul por volta de 1914, porém a expansão desta leguminosa só aconteceu na década de 1970, com o interesse crescente da indústria de óleo e a demanda do mercado internacional (Abiove, 2014; Embrapa, 2014).

O grão de soja possui cerca de 40% de proteínas, 20% de lipídios (óleo), 5% de minerais (como potássio, cálcio, fósforo, ferro, cobre, magnésio e sódio) e 34% de carboidratos. A fração proteica da soja é destinada principalmente à fabricação de ração animal a partir do farelo, que é resultante da extração da fração óleo. A fração óleo é utilizada na indústria de alimentos para produção de margarina, óleo de cozinha, agentes emulsificantes entre outros, apresentando diversas utilidades na indústria química e farmacêutica (Moretto e Feet, 1998; Araújo 2008).

A extração do óleo das sementes da soja pode ser feita por prensagem mecânica ou por extração com solvente. Na extração por solvente o hexano é o solvente mais utilizado, por dissolver o óleo sem interagir com os componentes da matéria oleaginosa, por possuir uma composição homogênea, uma faixa estreita de temperatura de ebulição e imiscibilidade em água. Em contra partida este solvente

apresenta algumas desvantagens como alta inflamabilidade e alto custo (Moretto e Feet, 1998; Oetterer *et al.*, 2006).

O óleo extraído por solvente ou prensagem é chamado de óleo bruto, e para se tornar comestível é necessário que seja submetido a um processo de refino para que seja melhorada a sua aparência, odor e sabor, por meio da remoção de componentes do óleo bruto como: substâncias coloidais, proteínas, fosfatídeos e seus derivados, ácidos graxos livres e seus sais, corantes, substâncias voláteis e substâncias inorgânicas como sais de cálcio e de outros metais, silicatos, fosfatos entre outros (Moretto e Feet, 1998; Oetterer *et al.*, 2006).

O refino do óleo bruto pode ser realizado em quatro etapas: degomagem, que tem por objetivo a retirada de fosfolipídios, proteínas e substâncias coloidais; neutralização, para retirada de ácidos graxos livres através da adição de soluções alcalinas como NaOH, KOH e NaHCO<sub>3</sub>; branqueamento, que tem por finalidade a remoção de pigmentação, resíduos de traços de metais e sabões e produtos de oxidação; desodorização, que visa a remoção de odores e sabores indesejáveis formados durante armazenamento e processamento da semente e do óleo, como ácidos graxos oxidados, produtos da decomposição de proteínas, carotenoides, esteroides e de substâncias naturais presentes no óleo como hidrocarbonetos insaturados e ácidos graxos de cadeia curta (Moretto e Feet, 1998; Araújo 2008).

A qualidade dos óleos vegetais refinados depende da sua composição de ácidos graxos, principalmente da proporção de AGPI, uma vez que produtos com alto teor de AGPI apresentam baixa estabilidade oxidativa (Oetterer *et al.*, 2006). Os principais AG que compõem o óleo de soja estão descritos na Tabela 3.

**Tabela 3:** Faixa de composição dos principais ácidos graxos no óleo de soja.

Ácido graxo	Nomenclatura	% (g/100g)
-	C < 14	< 0,1
Mirístico	C 14:0	< 0,5
Palmítico	C 16:0	7,0 - 14,0
Palmitoléico	C 16:1	< 0,5
Esteárico	C 18:0	1,4 - 5,5
Oléico	C 18:1	19,0 - 30,0
Linoléico	C 18:2	44,0 - 62,0
Linolênico	C 18:3	4,0 - 11,0
Araquidônico	C 20:0	< 1,0
Eicosenóico	C 20:1	< 1,0
Behênico	C 22:0	< 0,5

Fonte: Campestre, 2014

## 2.2 ASPECTOS NUTRICIONAIS DOS ÓLEOS

Os óleos desempenham um papel importante na nutrição humana, atuando como um dos principais aportes energéticos da dieta, fornecendo aproximadamente o dobro da energia proporcionada pelas proteínas e pelos carboidratos. Esta importante fonte de combustível para os seres humanos quando ingeridos em excesso e/ou sem levar em consideração a qualidade e o tipo da gordura, podem causar graves problemas como a obesidade, o aumento de colesterol no sangue e cardiopatias, sendo que estas complicações são atribuídas à maior proporção de ácidos graxos saturados. Por outro lado, as gorduras insaturadas são capazes de reduzir o índice de colesterol, diminuindo os problemas cardiovasculares. Como os óleos vegetais são ricos em ácidos graxos insaturados, eles são os mais indicados para uma dieta saudável (Ferrari, 1998; Freire, *et al.*, 2013).

Os óleos também promovem o transporte de vitaminas lipossolúveis como as vitaminas A, E, D e K e ácidos graxos essenciais das séries Ômega-6 e Ômega-3 para o interior das células; o processo de fritura contribui para o sabor e a palatabilidade dos alimentos e também para a sensação de saciedade após a

alimentação, além de promover uma maior conservação dos alimentos por meio da destruição de microrganismos e enzimas (Ferrari, 1998; Pereda *et al.*, 2005)

Contudo, o consumo de óleos oxidados, como verificado em frituras dos mais diversos tipos de alimentos, traz sérios riscos à saúde, pois alguns dos produtos formados pela oxidação têm atividade biológica (Choe e Min, 2007).

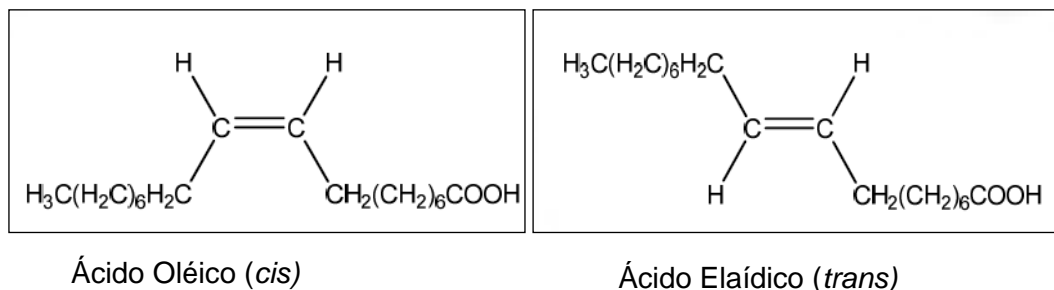
Compostos formados pela decomposição de ácidos graxos insaturados durante o processo de fritura afetam a disponibilidade dos ácidos graxos essenciais como o ácido linoléico e linolênico, responsáveis pela biossíntese dos ácidos aracdônico, ecosapentaenóico e docosaheptaenóico, na formação das prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina, compostos que participam da regulação da pressão arterial, frequência cardíaca, resposta imunológica, dos processos de coagulação sanguínea e do funcionamento do sistema nervoso central (Sanibal e Mancini-Filho, 2004; Coscine e Jorge 2008).

Estudos têm mostrado que ratos alimentados com óleos exaustivamente processados em frituras apresentam alterações metabólicas, resultando em perda de peso, supressão do crescimento, diminuição do tamanho do fígado e rins, aumento da taxa de colesterol no fígado e fertilidade reduzida. Estas alterações estão relacionadas ao processo oxidativo das membranas desses animais, na presença de oxidantes oriundos das frituras (Sanibal e Mancini-Filho, 2004). Outra implicação está relacionada aos radicais livres formados no processo de oxidação, que reagem com lipídios insaturados presentes na membrana celular, ocasionando lesões ou mesmo destruição nas células. O DNA e RNA podem ser afetados, mudando a função celular, desenvolvendo doenças como câncer, aterosclerose, artrite e envelhecimento precoce (Castro *et al.*, 2004; Araújo, 2008).

Outro fator de risco à saúde está relacionado à formação dos ácidos graxos *trans* (AGT). Estudos clínicos foram realizados e demonstraram que AGT, formados durante a hidrogenação dos óleos vegetais ou no processo de fritura, agem sobre as lipoproteínas aumentando os teores de LDL (lipoproteína de baixa densidade) e reduzindo os de HDL (lipoproteína de alta densidade); tais efeitos são potenciais fatores de risco cardiovasculares (Sanibal e Filho, 2002; Coscine e Jorge 2008).

Os AGT não são sintetizados no organismo humano. No entanto, as formas *cis* dos ácidos graxos insaturados podem ser convertidas em formas *trans* por aquecimento, na presença de catalisadores, ou por processos industriais (Oetterer *et*

al., 2006, Liu *et al.*, 2007). O ácido oléico, por exemplo, pode ter sua forma convertida para *trans* e transformar-se no ácido elaídico. A Figura 4 mostra a representação de um arranjo *cis* e *trans* de um ácido graxo insaturado.



**Figura 4.** Configuração *cis* e *trans* de uma ácido graxo

### 2.3 PROCESSO DE FRITURA POR IMERSÃO

O método de fritar os alimentos é um procedimento conhecido mundialmente e muito popular nas mais diversas classes sociais, por ser um processo mais rápido de preparo de diferentes tipos de alimentos quando comparado com outros métodos, como cozinhar, assar e grelhar (Mendonça *et al.*, 2008).

Fritura é um processo de imersão de alimentos no óleo quente com contato entre o óleo, ar, alimento e uma alta temperatura de 180 a 190°C, o qual age como meio de transferência de calor. Essa forma de aquecimento é mais rápida que o cozimento a vapor ou em água, já que as temperaturas alcançadas pelo óleo em processo de fritura são superiores às alcançadas pela água em ebulição ou pelo vapor de água. Na fritura, o mecanismo se dá pelo bombeamento de água do interior dos alimentos para o exterior, arrastando alguns compostos que passam para o óleo. Ao mesmo tempo, ocorre a absorção do óleo pelo alimento, tornando-o parte da dieta. O óleo, geralmente, tende a se acumular na superfície do alimento e se move para seu interior durante o resfriamento. (Blumenthal, 1991; Lima e Goncalves, 1994; Cella *et al.*, 2002).

Enquanto o alimento está sendo frito, sua água capta energia do óleo quente que o rodeia. O calor é conduzido desde a superfície em contato com o óleo até o interior do alimento, fazendo com que esse cozinhe. Parte da água transforma-se em vapor, consumindo parte da energia do óleo em contato com o mesmo, fazendo que o alimento cozinhe a temperatura mais baixa do que o meio de fritura, evitando

a queima ou a carbonização por excessiva desidratação (Blumenthal, 1991; Lima e Goncalves, 1994 Cella *et al.* 2002).

No óleo novo, durante o aquecimento, é formada uma pequena quantidade de agentes tensoativos que levam a um melhor cozimento do alimento, que fica mais crocante superficialmente. Com o decorrer do tempo de fritura, o óleo passa da fase ótima, e um pequeno excesso de tensoativos permite que quantidades maiores que a desejada de óleo penetre no alimento, que fica mais dourado, rígido e adquire aroma de fritura. No estágio de degradação, o meio de fritura apresenta avançadas reações de oxidação que levam à formação de compostos indesejáveis, sendo que os alimentos apresentam vida de prateleira curta e aroma e sabor desagradável, superfície muito dura e escurecida, excesso de óleo absorvido e o centro do alimento cru, gerando alimentos fritos de baixa qualidade (Blumenthal, 1991; Lima e Goncalves, 1994; Cella *et al.*, 2002).

A quantidade de óleo absorvido pelo alimento pode variar de 10% a 60% do peso total, segundo a composição do alimento, tempo e temperatura, porosidade do alimento, qualidade do óleo, composição e formação da crosta do alimento e as dimensões da superfície de contato do alimento com o óleo (Pereda *et al.*, 2005).

Os óleos podem sofrer transformações físicas durante o processo de fritura como escurecimento, aumento da viscosidade, diminuição do ponto de fumaça e formação de espuma; e transformações químicas durante a sua produção, processamento, preservação, armazenamento e preparo dos alimentos. Essas transformações causam deterioração e alteram diversas propriedades, como a qualidade sensorial, nutricional e funcional dos alimentos (Choe e Min, 2007).

### **2.3.1 PROCESSO DE DEGRADAÇÃO DOS ÓLEOS VEGETAIS**

Durante o processo de fritura, o óleo é o componente mais crítico do sistema, por estar exposto a três agentes que promovem alterações físicas e químicas: a água, proveniente do próprio alimento; o oxigênio e a temperatura, os quais desencadeiam alterações que contribuem para a degradação do óleo, ocasionando aumento da viscosidade, formação de fumaça, alteração da cor e de características nutricionais e organolépticas, além da formação de compostos nocivos à saúde (Choe e Min, 2006).

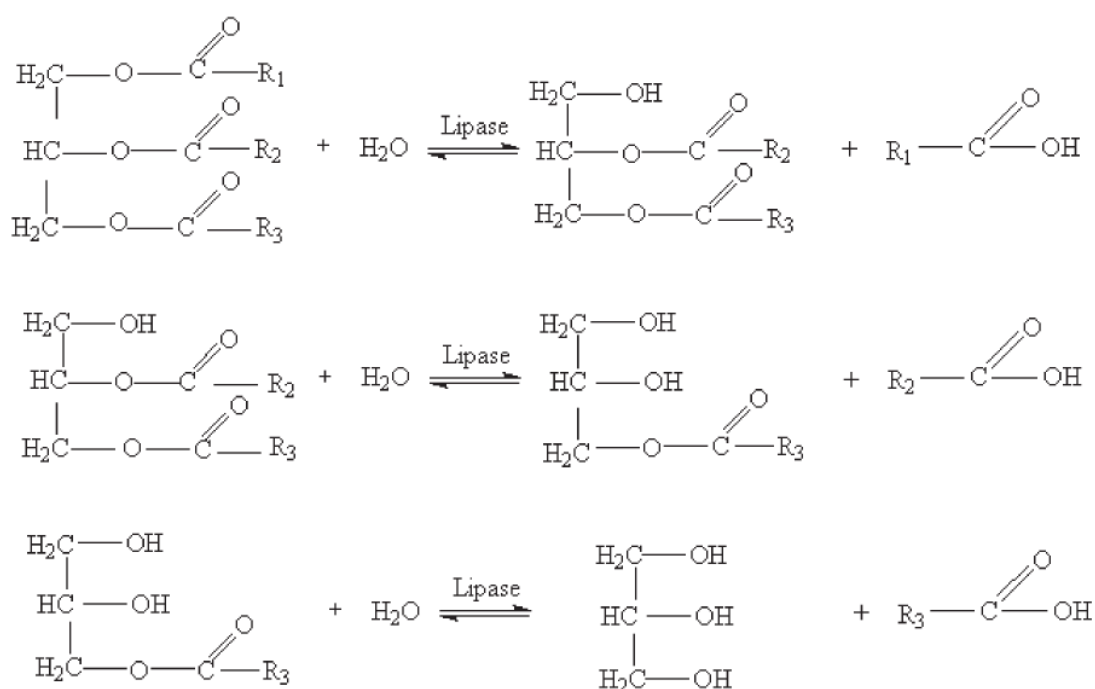
Os principais meios de degradação de óleos são a hidrólise, a oxidação e a polimerização.

### 2.3.1.1 HIDRÓLISE

A rancidez hidrolítica refere-se à hidrólise dos óleos e gorduras com produção de ácidos graxos. O alimento quando imerso em óleo quente absorve sua energia térmica e promove a evaporação da água, desencadeando uma série de reações de degradação (Warner, 2002; Choe e Min, 2007).

A hidrólise pode ocorrer devido à ação catalítica de enzimas lipase, que estão presentes em sementes de oleaginosas (fosfolipase), ou lipase de origem microbiana, originárias do alimento ou produzidas por bactérias e fungos (Warner, 2002; Bobio e Bobio, 2003; Castro *et al.* 2004; Choe e Min, 2007). A hidrólise pode também ser catalisada por outros componentes presentes no alimento, que durante o processo de fritura podem ser arrastados ou dissolvidos no óleo (Bobio e Bobio, 2003).

A água, proveniente do próprio alimento, e o vapor agem na ligação éster do triglicerídeo quebrando-a e formando monoglicerídeo, diglicerídeo, glicerol e ácidos graxos livres, conforme pode ser observado no esquema da Figura 5.

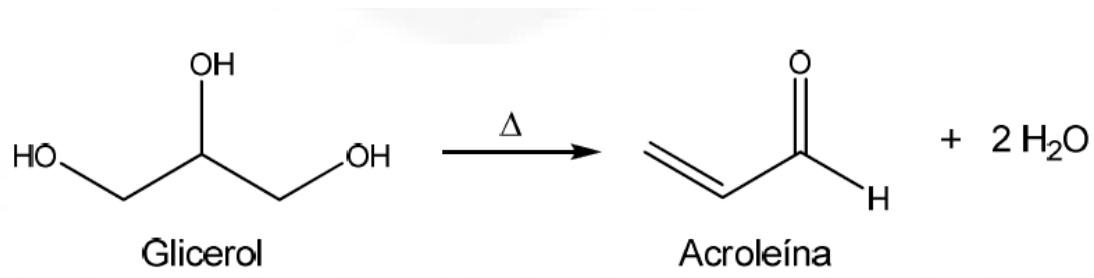


**Figura 5.** Hidrólise sequencial de um triacilglicerol, catalisada por lipase.  
**Fonte.** Adaptada de Castro *et al.* 2004

A hidrólise promove alterações que resultam na modificação do sabor e odor e no aumento da oxidação, uma vez que os ácidos graxos livres são mais susceptíveis a oxidação que os ácidos graxos ligados ao glicerol (Warner, 2002; Choe e Min, 2007).

Em geral, os AGI de cadeia curta são mais susceptíveis a hidrólise por serem mais solúveis em água, quando comparados aos ácidos graxos de cadeia longa e saturados (Machado, Garcia e Abrantes, 2008; Aylón, 2009).

A desidratação do glicerol, um dos produtos da hidrólise, pode levar a formação da acroleína (2- propenal), que é um aldeído insaturado de alta toxicidade. A Figura 6 ilustra a reação de formação da acroleína a partir da desidratação do glicerol (Bobio e Bobio, 2003).



**Figura 6.** Reação de formação da acroleína a partir da desidratação do glicerol  
**Fonte:** Bobio e Bobio, 2003

### 2.3.1. 2 OXIDAÇÃO

A oxidação lipídica é um fenômeno espontâneo, que conduz a mudanças durante o processamento, armazenamento, distribuição e consumo dos óleos. Este aspecto é de grande importância, não somente sob o enfoque econômico, através de perdas devido à diminuição da vida-de-prateleira, mas também pela possibilidade dos radicais livres formados interagirem com outros constituintes dos alimentos, provocando uma queda na qualidade nutricional dos mesmos (Araújo, 2008).

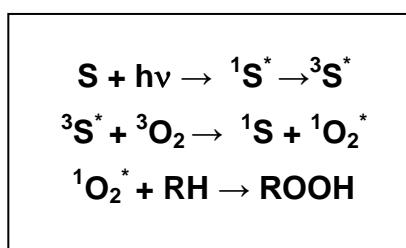
A reação de oxidação pode ser definida como o processo de adição de oxigênio ou remoção de hidrogênio ou elétrons. Tal reação pode ser acelerada pelo



calor, luz, traços de metais, metaloproteínas e pela enzima lipoxigenase (Vergara *et al.* 2006; Choe e Min, 2007).

A oxidação consiste no processo degradativo que ocorre quando o oxigênio atmosférico, ou o oxigênio dissolvido no óleo, reage com os ácidos graxos insaturados. As reações químicas envolvidas no processo de oxidação dos óleos são extremamente complexas e geram produtos com odores e sabores desagradáveis para o consumo humano. Este processo pode ocorrer por diferentes vias, em função do meio e dos agentes catalisadores, podendo ser classificado como foto-oxidação, oxidação enzimática, autooxidação e oxidação térmica (Bobio e Bobio, 2003; Vergara *et al.*, 2006; Choe e Min, 2007).

O mecanismo de foto-oxidação de AGI é promovido essencialmente pela radiação UV em presença de fotossensibilizadores, substâncias cromóforas presentes nos óleos (clorofila, mioglobina, e outros). Estas substâncias absorvem intensamente a luz visível próximo ao UV, acumulando energia e posteriormente a transferindo para o oxigênio do meio, que passa para o estado singlete ( $^1\text{O}_2$ ), e age como intermediário reativo. O processo envolve reações radiculares, cujo resultado é a formação de hidroperóxidos (diferentes dos que se observam na ausência da luz e de sensibilizadores) e que por degradação posterior originam aldeídos, cetona, alcoóis e hidrocarbonetos (Warner, 2002; Veloso, 2005; Vergara *et al.*, 2006; Choe e Min, 2007). Na Figura 7 é representado o esquema geral da foto-oxidação.

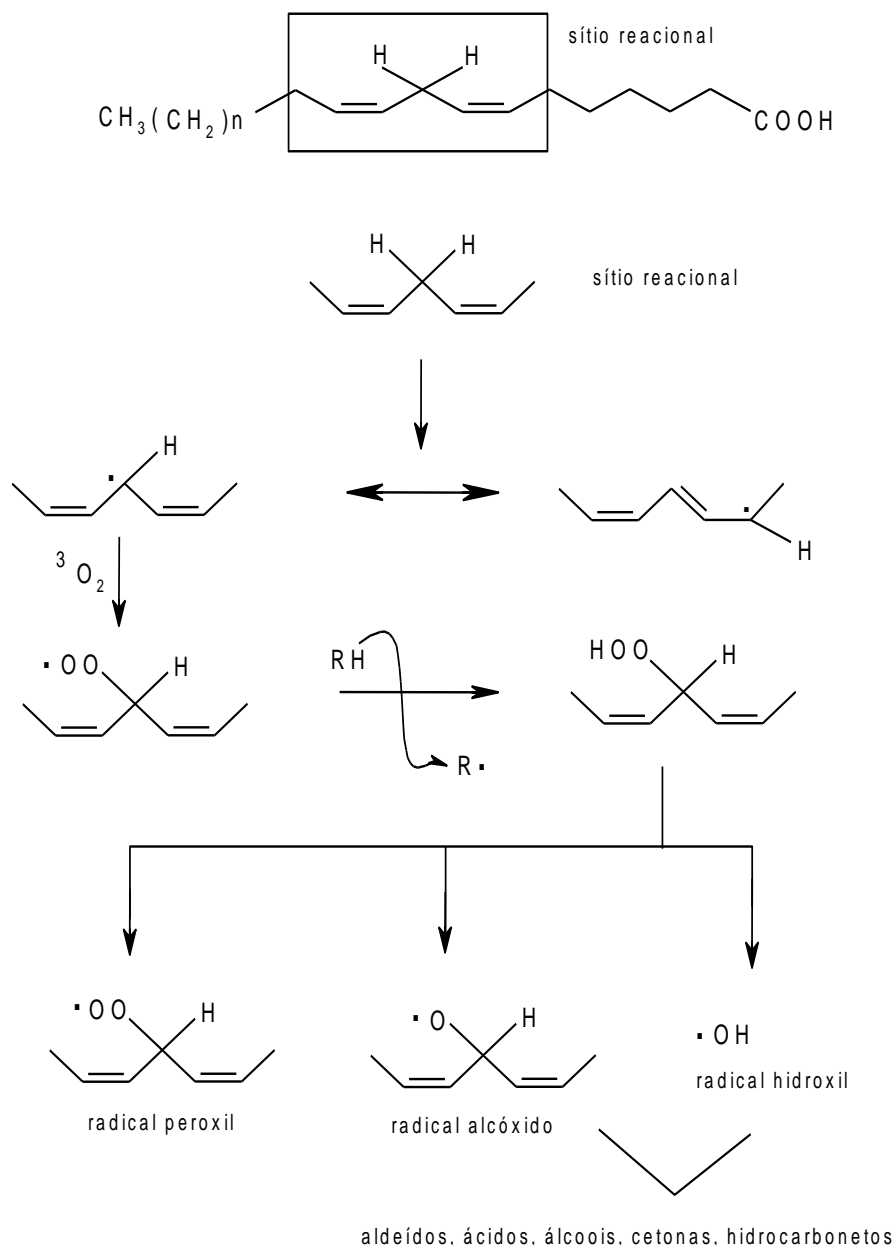


**Figura 7.** Esquema geral da foto-oxidação

\* onde S é o fotossensibilizador;  $^1\text{S}^*$ , o fotossensibilizador singlete no estado excitado;  $^3\text{S}^*$ , o fotossensibilizador triplete no estado excitado;  $^3\text{O}_2$  oxigênio molecular triplete;  $^1\text{O}_2$  oxigênio singlete; RH, ácido graxo; ROOH, hidroperóxido do ácido graxo.

**Fonte.** Adaptada de Moretto e Feet, 1998.

A autooxidação é um processo que está relacionado a uma série de reações complexas, que envolvem a formação de espécies radicalares capazes de auto-propagação, e dependem do tipo de ação catalítica envolvida, como a ação da luz, calor, radiação ionizante, íons metálicos, radicais livres e enzimas. A sequência reacional é classicamente dividida em três etapas (iniciação, propagação e terminação) que podem ser distinguíveis pelos produtos formados e pelas características organolépticas em cada uma delas (Warner, 2002; Veloso, 2005; Choe e Min, 2007). Na Figura 8, é possível observar o esquema geral de degradação oxidativa de um ácido graxo poliinsaturado (AGPI).



**Figura 8.** Esquema geral de oxidação de ácidos graxos

**Fonte:** Veloso, 2005.

A oxidação ocorre, preferencialmente, nos ácidos graxos livres insaturados e poliinsaturados. O processo de oxidação se inicia num carbono vizinho às duplas ligações com configuração espacial do tipo cis=(Z), não conjugadas e separadas por grupo metilênico ( $\alpha\text{-CH}_2$ ). Cada dupla ligação, junto com o carbono  $\alpha$ -metilênico, forma um sistema alílico, ou bis-alílico, possuindo, portanto átomos de hidrogênio com baixa energia de ligação, susceptíveis de serem abstraídos (Warner, 2002; Bobio e Bobio, 2003; Veloso, 2005; Choe e Min, 2007).

A etapa inicial da reação envolve a abstração de um átomo de hidrogênio do carbono  $\alpha$ -metilênico, para formar um radical alil, que pode ser estabilizado por ressonância. Essa etapa caracteriza-se por baixo consumo de oxigênio, mas que tende a aumentar progressivamente, baixa concentração de peróxido, aumento da concentração de radicais livres e ausência de alterações organolépticas (Warner, 2002; Bobio e Bobio, 2003; Veloso, 2005; Choe e Min, 2007).

Na etapa de propagação o radical alílico formado reage rapidamente com o oxigênio ( $^3\text{O}_2$ ), ocorrendo então a formação de um radical peroxil ( $\text{ROO}\cdot$ ), radical que pode ter formas de ressonância estabilizadoras, que aumentam a sua vida útil, e que pode retirar um átomo de hidrogênio de um carbono  $\alpha$ -metilênico de outro lipídeo insaturado. Em consequência, um hidroperóxido ( $\text{ROOH}$ ) pode ser produzido e outro radical livre pode ser formado, propagando a reação. Esta etapa caracteriza-se pelo alto consumo de oxigênio, grande concentração e decomposição de peróxido, causando alterações organolépticas com o aparecimento de odores característicos (Warner, 2002; Bobio e Bobio, 2003; Veloso, 2005; Choe e Min, 2007).

Uma vez formados, os hidroperóxidos são muito instáveis e sofrem reações que reduzem ou aumentam a sua toxicidade. A primeira inclui a reação de redução por dois elétrons, catalisada por enzimas antioxidantes como a glutationala peroxidase, resultando na formação de um álcool e conseqüentemente reduzindo a toxicidade do hidroperóxido. A segunda envolve reação de oxidação, catalisada por metais ou outros oxidantes, levando à formação de radicais como o peroxil, o alcóxil e o hidroxil. Estes radicais podem atacar outros lipídios, promovendo a propagação da peroxidação e/ou sofrer reação entre si ou com os radicais dos ácidos graxos, formando compostos secundários de maior reatividade e toxicidade, como os aldeídos e cetonas. Na etapa de término há uma diminuição do consumo de oxigênio e redução da concentração de peróxido (Warner, 2002; Bobio e Bobio, 2003; Veloso, 2005; Choe e Min, 2007).

A rancidez oxidativa pode ainda causar alterações em outros componentes do alimento, através da ação oxidante dos peróxidos sobre vitaminas, carotenoides, proteínas e outros componentes oxidáveis presentes, alterando, portanto, o seu valor nutricional (Warner, 2002; Bobio e Bobio, 2003).

A auto-oxidação, uma vez iniciada, segue em cadeia acontecendo mesmo em baixa temperatura. Isso ocorre porque a auto-oxidação é um processo químico que

necessita de baixa energia de ativação e somente termina quando estiverem esgotadas as reservas de ácidos graxos insaturados e oxigênio (Ferrari, 1998; Warner, 2002).

É importante ressaltar que uma vez iniciada a degradação oxidativa, não há mais como controlá-la, pois os antioxidantes agem apenas evitando o início do processo de oxidação, não conseguindo combatê-los, caso já esteja instalado (Ferrari, 1998).

A oxidação lipídica enzimática ocorre devido à ação catalítica da enzima lipoxigenase, que atua sobre os AGI (ácidos linoleico e linolênico, e seus ésteres), catalisando a adição de oxigênio à cadeia carbônica, resultando na formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas, os quais podem envolver-se em diferentes reações degradativas, semelhantes às observadas para os processos de autooxidação, originando diversos produtos (Warner, 2002; Veloso, 2005; Choe e Min, 2007).

O mecanismo da oxidação térmica é essencialmente o mesmo da auto-oxidação, a principal diferença é que na oxidação térmica os produtos primários de oxidação são rapidamente degradados em compostos secundários devido à ação do calor (Warner, 2002).

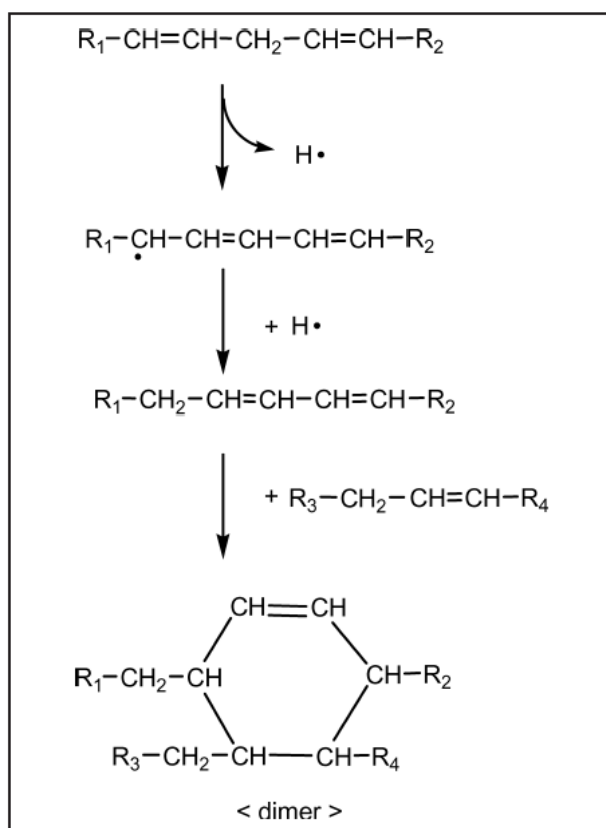
Os principais produtos finais da oxidação lipídica compreendem os derivados da decomposição de hidroperóxidos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos. Também são produzidas moléculas derivadas do rearranjo de monohidroperóxidos e produtos de elevado massa molar, resultantes de reações de polimerização (Ferrari, 1998).

### **2.3.1.3 POLIMERIZAÇÃO**

A polimerização é um processo que acontece em altas temperaturas, quando duas ou mais moléculas de ácidos graxos combinam-se, em razão de alterações no processo de oxidação, formando produtos de maior massa molar e polaridade, que no óleo provocam o aumento da viscosidade, alteração da cor, formação de espuma e fumaça, diminuição da sua capacidade de conduzir de energia, além de perdas nutricionais. O aumento da viscosidade favorece um maior encharcamento na superfície da massa do alimento, causando alteração sensorial bastante

desagradável (Moretto e Feet, 1998; Warner, 2002; Vergara *et al.*, 2006; Freire *et al.*, 2013).

A polimerização pode ocasionar a formação de polímeros cíclicos e acíclicos, dependendo do tipo de reação e dos ácidos graxos. Entre os principais compostos formados pela polimerização estão os dímeros, que podem ser formados a partir de reações de radicais alilas. Os polímeros cíclicos podem ser formados através da reação de Diels-Alder, que desencadeia reações entre uma dupla ligação e um dieno conjugado para formar um derivado de ciclohexeno tetrasubstituído. A Figura 9 ilustra a formação de um composto cíclico a partir do ácido linoléico, por reação de Diels-Alder (Warner, 2002; Choe e Min, 2007).



**Figura 9:** formação de um composto cíclico a partir do ácido linoléico

**Fonte:** Choe e Min, 2007

Os polímeros cíclicos por possuírem elevada massa molar e estrutura complexa podem dificultar a sua hidrólise pela lípase pancreática e, portanto, contribuir para a uma diminuição significativa da digestibilidade dos óleos, os que os torna nutricionalmente indesejáveis (Jorge e Janieri, 2005). A formação de dímeros e

polímeros depende do tipo de óleo, temperatura e tempo de fritura. Óleos ricos em AGPI são mais facilmente polimerizados durante o processo de fritura do que os óleos ricos em ácidos graxos insaturados e monoinsaturados devido a sua maior reatividade, uma vez que possuem uma maior quantidade de duplas ligações (Choe e Min, 2006).

### **2.3.2 FATORES QUE INFLUENCIAM NA OXIDAÇÃO LIPÍDICA**

A intensidade com que as reações de degradação dos óleos e gorduras ocorrem depende de vários fatores, como: tipo de óleo empregado, temperatura e tempo de fritura, relação superfície/volume do óleo, tipo de aquecimento, natureza do alimento a ser frito, materiais que constituem as fritadeiras, presença de metais traços e antioxidantes (Warner, 2002).

O processo de fritura intermitente normalmente é aplicado pela maior parte dos estabelecimentos comerciais, em que o óleo é submetido a vários aquecimentos e resfriamentos ao longo de um período de uso. Esse processo facilita a solubilização do oxigênio durante o resfriamento do óleo, gerando vários produtos de degradação, que quando aquecidos acelerarão os processos de oxidação. No processo contínuo, geralmente utilizado por indústrias de alimentos, o óleo é aquecido por longos períodos, o que acarreta a formação de uma “nuvem” de vapor sobre o meio de fritura, dificultando a solubilização do oxigênio e protegendo por mais tempo o óleo da degradação (Seppanen e Csallany, 2006; da Silva e Pereira, 2008).

O tempo e a temperatura de aquecimento são variáveis importantes no processo de oxidação. O tempo de aquecimento traduz um incremento do nível de alteração, porém sua principal consequência é a diferente composição quantitativa dos compostos derivados da sua alteração (Jorge e Janieri, 2005). A temperatura usual de fritura de alimentos é de cerca de 180°C. Entretanto, o uso de temperatura baixa, provoca uma maior absorção de óleo no alimento, e temperaturas muito altas aumentam a oxidação térmica e a polimerização dos óleos. Na temperatura de fritura, o óleo interage com o ar, água e componentes dos alimentos que estão sendo fritos, gerando, ao longo do aquecimento, compostos responsáveis por

alterações de características organolépticas, próprias de produtos fritos e posterior degradação desses produtos (Jorge *et al.*, 2005; Han e Csallany, 2008).

O tipo de óleo representa um dos componentes mais críticos no sistema de fritura. Sua degradação depende da proporção de ácidos graxos saturados/insaturados e em menor grau da presença de componentes naturais como tocoferóis, clorofilas e esteróis. Óleos vegetais que apresentam grandes proporções de ácidos graxos poliinsaturados favorecem os processos oxidativos com maior intensidade, visto que as insaturações presentes na cadeia carbônica são mais susceptíveis aos ataques de agentes oxidantes como radicais livres, enzimas e metais que atuam como catalisadores de processos oxidativos e de foto-oxidação (Jorge *et al.*, 2005; Almeida *et al.* 2006; Reda e Carneiro, 2007).

Para reduzir os AGI presentes nos óleos tem-se utilizado a hidrogenação, interesterificação e a modificação genética. A hidrogenação aumenta a estabilidade oxidativa, apesar de produzir ácidos graxos *trans* (Liu *et al.*, 2007). A modificação genética é uma alternativa a hidrogenação, uma vez que reduz o teor dos AGI, aumentando a estabilidade oxidativa dos óleos, sem produzir ácidos graxos *trans* (Castro *et al.*, 2004).

A relação superfície/volume (s/v) tem efeito marcante sobre a velocidade de alteração no óleo. Quanto maior esta relação, maior é a superfície do óleo em contato com ar, fato que favorece as reações oxidativas (Negishi *et al.*, 2003; Freire *et al.*, 2013). De acordo com o trabalho de da Silva e Pereira (2008) o aumento da relação s/v promoveu um aumento das taxas de emissão de alguns compostos carbonílicos saturados, como o acetaldeído, propanal, butanal e hexanal. Entretanto, para os compostos insaturados, como a acroleína, (*E*)-2-heptenal, (*E*)-2-octenal o aumento da razão s/v não promoveu o mesmo efeito, possivelmente devido à dupla ligação participar de reações com o oxigênio, consumindo assim estes compostos e competindo com o processo de formação dos mesmos.

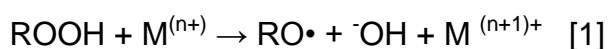
### **2.3.2.1 INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS NA OXIDAÇÃO LIPÍDICA**

A presença de metais também é um fator que contribui para a degradação lipídica. A contaminação de óleo por metais pode ser devida tanto a fatores endógenos como exógenos. A presença destes metais no solo, na água, no



fertilizante e no metabolismo da planta representa fatores endógenos, enquanto a contaminação através dos métodos de colheita, extração e procedimentos de acondicionamento do óleo, presença de rodovias e indústrias próximas às plantações são fatores exógenos (Pehlivan, *et al.*, 2008 e La Pera *et al.*, 2002). Nunes e colaboradores (2011) determinaram Cu, Fe, Ni e Zn em amostras de óleos de soja, oliva e girassol, sendo o níquel e o ferro os metais encontrados em maior concentração.

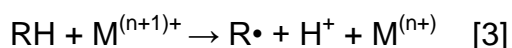
Os metais de transição, como Fe, Cu, Co e Mn que possuem dois ou mais estados de valência, afetam tanto a velocidade da oxidação quanto a direção da quebra dos hidroperóxidos formados durante a oxidação. Íons metálicos de transição, em seu estado de valência mais baixo ( $M^{n+}$ ), reagem muito rapidamente com hidroperóxidos, agindo como doadores de um elétron para formar um radical alcóxil, o que pode ser considerado como uma ramificação da etapa de propagação, reação apresentada na Equação 1 (Paz e Molero, 2000; Bobio e Bobio, 2003; Bastos e Pereira, 2010)



Em uma reação mais lenta, o estado reduzido do íon metálico pode ser regenerado por moléculas de hidroperóxido, como mostrado na Equação 2.



Devido à presença de água ou de metal complexado, a regeneração não é completa. A atividade catalítica de metais depende, na realidade, não somente das espécies de íons e seu potencial redox, mas também do tipo de ligantes presentes, do pH, do sistema de solvente e da presença de doadores de elétrons, tais como o ascorbato e a cisteína, que mantém o íon metálico em seu estado de baixa valência. A máxima degradação dos peróxidos ocorre em pH entre 5,0 e 5,5. De acordo com a Equação 3, os metais também podem levar à abstração de um átomo de hidrogênio dos próprios ácidos graxos, na etapa de indução (Paz e Molero, 2000; Bobio e Bobio, 2004; Bastos e Pereira, 2010).



Os íons metálicos também podem reagir com os produtos da oxidação como alcoóis e produzir aldeídos como mostrado abaixo, nas Equações 4 e 5 (Paz e Molero, 2000).



Para reduzir o efeito negativo da presença de íons metálicos nos óleos, são adicionados agentes quelantes, como ácido cítrico, para diminuir a atividade dos íons no óleo (Coscione e Artz, 2005).

O tipo de recipiente pode alterar a qualidade do óleo. No caso das panelas de ferro, por exemplo, sabe-se que elas recebem pintura com tinta escura atóxica e própria para contato com alimentos. Essa tinta, durante o uso da panela, sai gradualmente, expondo o metal ao oxigênio, umidade e ácidos próprios dos alimentos. Isso irá resultar na ferrugem (óxido de ferro) que habitualmente é vista nas panelas de ferro. O cozimento de alimentos em panelas com ferrugem pode alterar a cor e o sabor do alimento e causar distúrbios gastrointestinais (Quintaes *et al.* 2004). Quintaes e colaboradores (2004) investigaram a influência de recipientes de vidro, ferro, alumínio e inox durante o processamento de frituras de óleos vegetais através de diferentes métodos. Os resultados mostraram que para o óleo de soja, a influência no processo oxidativo foi maior quando se utilizou o recipiente de ferro e menor para o recipiente de vidro, sendo uma possível explicação o efeito catalítico do ferro sobre as reações oxidativas. É importante verificar o estado de conservação das fritadeiras (riscados, amassados), que podem liberar metais para o óleo ou para a gordura de fritura, bem como a não utilização de utensílios que possam favorecer a liberação de metais.

O tipo do alimento também pode afetar a composição do óleo utilizado no processo. Quando os alimentos são empanados, partículas da superfície podem se desprender para o óleo e serem queimadas, intensificando o seu escurecimento e conferindo sabores e aromas desagradáveis, além de acelerar a degradação do

óleo. A fritura de alimentos que contêm ovo na sua preparação pode contribuir para a rápida formação de espuma, pela solubilização da lecitina. A fritura é bastante apropriada para alimentos de origem vegetal ricos em amido, uma vez que eles, quando imersos no óleo aquecido, tendem a formar uma crosta impermeável que retém em seu interior vapor de água, evitando a absorção de lipídeos (Freire *et al.*, 2013). Os alimentos também podem ser fonte de acúmulo de íons metálicos nos óleos vegetais, uma vez que durante o processo de fritura pode haver transferência do alimento para o óleo. Por exemplo, produtos à base de carne podem acusar aumento no teor de ferro no óleo durante um processo fritura e com isso aumentar a taxa de degradação do óleo (Coscione e Artz, 2005).

A presença de antioxidantes no óleo atua bloqueando a formação de radicais livres, mesmo em pequenas quantidades. Entre os antioxidantes, os tocoferóis são encontrados naturalmente na maioria dos óleos vegetais. A legislação brasileira permite a adição de até 300mg/kg de tocoferol em óleos e gorduras. Sua ação antioxidante é devida à capacidade de doação de hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos, interrompendo a etapa de propagação (Freire *et al.*, 2013).

### **2.3.3 PRINCIPAIS PRODUTOS SECUNDÁRIOS DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA**

Produtos secundários são compostos formados durante processo de oxidação, na etapa de término, onde os radicais livres reagem entre si formando diferentes compostos, que podem ser classificados em voláteis: (moléculas de baixa massa molecular, como aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres, alcoóis e hidrocarbonetos de cadeia curta) e em compostos não voláteis: (triacilgliceróis oxidados, dímeros, trímeros e polímeros de triacilglicerol), que contribuem para o sabor do óleo (Choe e Min, 2007).

Diversos compostos formados durante a oxidação lipídica foram identificados no óleo de soja através de diferentes condições de oxidação e metodologias, como: acetaldeído, acroleína, 2-decenal, 2-octenal, 2-heptenal, 2,4-heptadienal, 2,4-decadienal, 2-undecenal, 4-hidroxi-2-octenal, 4-hidroxi-2-nonenal, 4-hidroxi-2-octenal, entre outros (Seppanen e Csallany, 2001; Zhu *et al.*, 2001; Seppanen e Csallany, 2004; da Silva e Pereira, 2010).

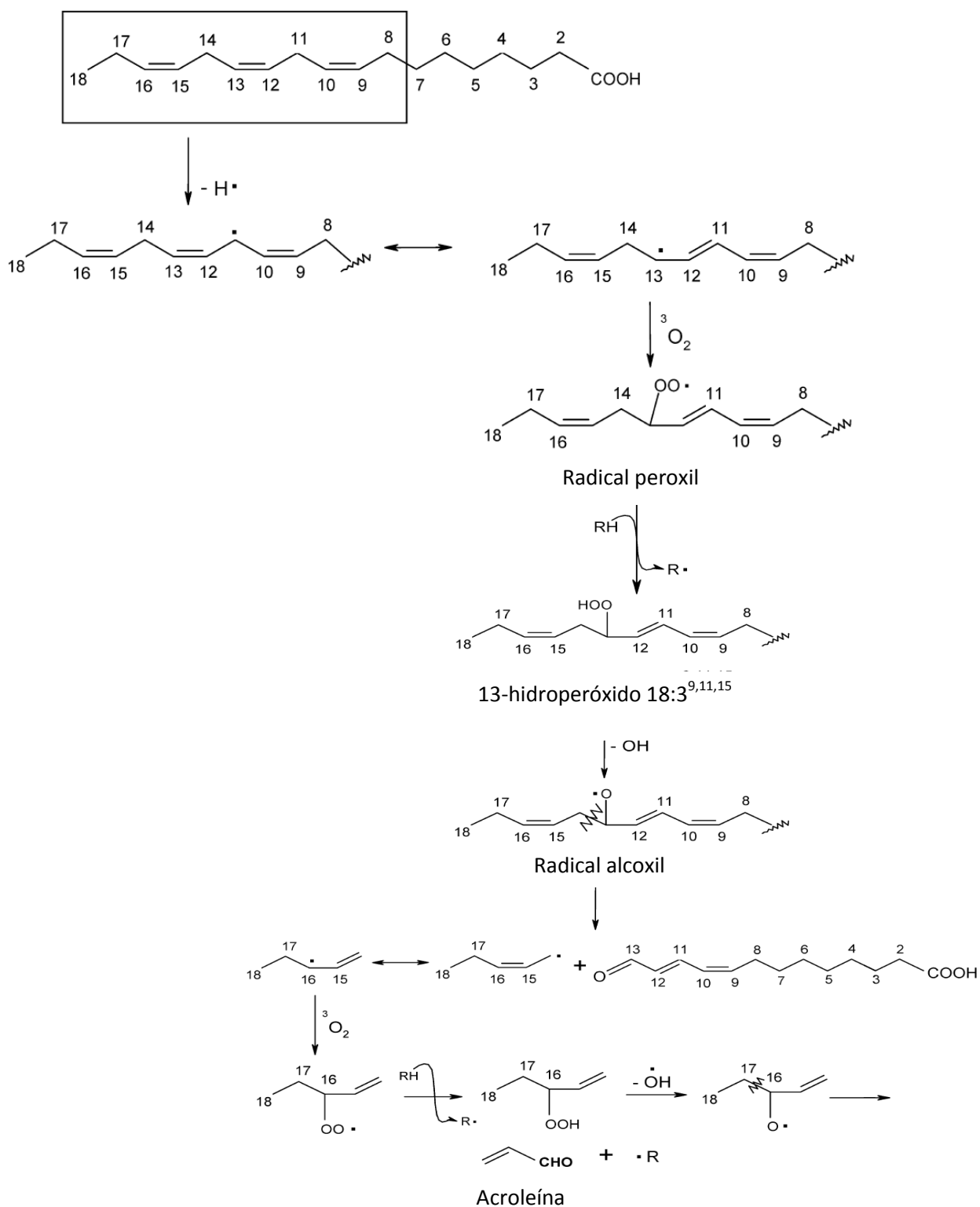
É possível destacar alguns destes compostos em função da sua alta toxicidade, como a acroleína (2-propenal). Segundo a USEPA, a acroleína está entre

os poluentes mais perigosos do ar, é muito irritante para os olhos, nariz e garganta, e tem sido associada a várias doenças, tais como arterosclerose, carcinogênese, doença de Alzheimer e por inibir uma proteína (p53) supressora de tumor, o que pode contribuir para a formação de câncer de pulmão (Seaman, Bennett e Cahill, 2007; Seaman, Bennett e Cahill, 2009).

Segundo Seaman e colaboradores (2009) frituras com óleos vegetais em cozinhas domésticas gera uma quantidade considerável de acroleína, e de outros compostos carbonílicos. Nelas, a concentração de acroleína variou entre 26,4 e 64,5  $\mu\text{g m}^{-3}$ , valores próximos ao limite de exposição aguda que é de 75  $\mu\text{g m}^{-3}$  (nível em que a maioria das pessoas vai experimentar irritação e/ou desconforto em curto espaço de tempo) e superior ao limite de exposição crônica, que é de 0,002  $\mu\text{g m}^{-3}$ . A estimativa do tempo de meia-vida da acroleína dentro das cozinhas é de 14,4 horas, o que indica que a concentração gerada durante os procedimentos de frituras pode persistir no ambiente por muitas horas, principalmente se a taxa de troca de ar do ambiente é baixa. As altas taxas de emissão de acroleína, a partir de óleo, combinadas com a longa meia-vida devem ser motivo de preocupação para as pessoas que fazem frituras, rotineiramente (em casa ou em cozinhas de restaurantes), onde as quantidades de óleo usado e os tempos de aquecimento de óleo são maiores do que na culinária doméstica (Seaman, Bennett e Cahill, 2009).

A acroleína pode ser formada via termólise do glicerol, sendo este proveniente da hidrólise dos acilgliceróis em altas temperaturas, e via degradação do ácido linolênico, como proposto por da Silva e Pereira (2008) conforme esquema ilustrado na Figura 10.

Ácido linolênico 18:3<sup>9,12,15</sup>



**Figura 10.** Esquema para formação de acroleína a partir do ácido linolênico.

**Fonte.** Adaptado de da Silva e Pereira, 2008

### 2.3.3.1 HIDROXIALQUENASIS $\alpha$ , $\beta$ - INSATURADOS

Os hidroxialdeídos  $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturados, como produtos secundários da oxidação lipídica, representam um grupo de aldeídos que têm despertado grande interesse devido a seus efeitos citotóxicos e mutagênicos. Diferentes hidroxialquenas que já foram identificados e quantificados como produtos da oxidação de óleos vegetais aquecidos a temperatura típica de fritura, como o 4-hidroxi-2-*trans*-hexenal (HHE), 4-hidroxi-2-*trans*-nonenal (HNE), 4-hidroxi-2-*trans*-octenal (HOE) e 4-hidroxi-2-*trans*-decenal (HDE). A toxicidade destes compostos decorre da alta reatividade de seus grupos funcionais (o grupo carbonila a hidroxila e a dupla ligação  $\alpha$  -  $\beta$  entre carbonos) (Seppanen e Csallany, 2004). A estrutura genérica dos hidroxialquenas pode ser observada na Figura 11.

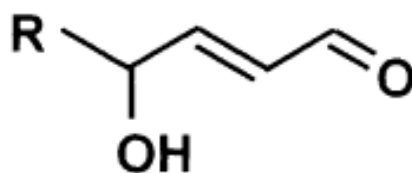
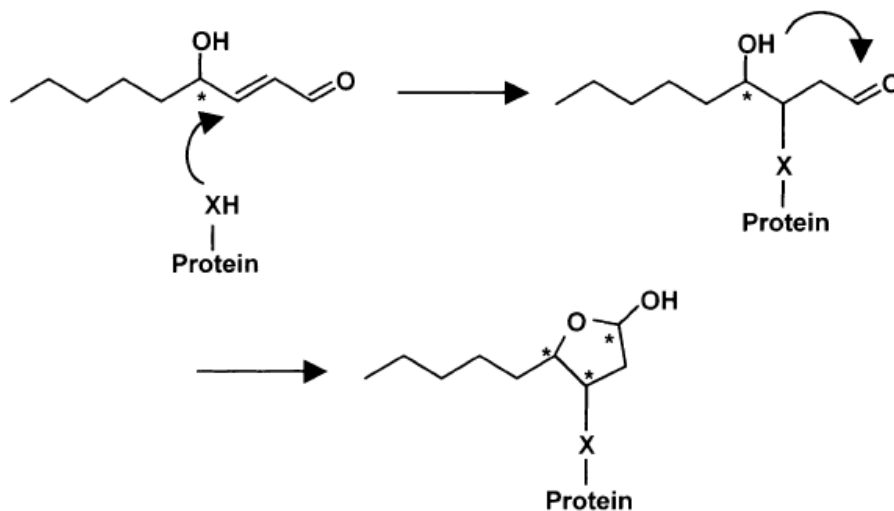


Figura 11 : Estrutura geral dos hidroxialquenas

Os hidroxialquenas  $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturados podem interferir em uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo a inibição de proteínas e a síntese de DNA, pois o  $\beta$ - carbono pode reagir com os grupamentos tiol (SH) e amino (NH<sub>2</sub>) presentes em proteínas e no DNA, resultando em suas modificações (Seppanen e Csallany, 2004). Estudos têm demonstrado que em concentrações celulares entre 1 e 20  $\mu$ M, os hidroxialquenas inibem parcialmente o DNA e a síntese de proteínas, enquanto em concentrações maiores que 100  $\mu$ M seus efeitos são mais agudos, podendo provocar a inibição de funções catabólicas, tais como respiração mitocondrial, podendo levar a célula à morte. Concentrações, como estas podem surgir nas células por causa de estresse oxidativo *in vivo* ou devido ao consumo de alimentos que contenham produtos de oxidação (Han e Csallany, 2008; Seppanen e Csallany, 2006).

Entre os hidroxialquenas insaturados é possível destacar o HNE e o HHE por serem uns dos mais abundantes e tóxicos, entre os hidroxialquenas. O HNE pode

reagir com as quatro bases do DNA (adenina, citosina, guanina e timina) e formar adutos (produto da adição direta entre duas ou mais moléculas diferentes, resultando em um único produto contendo todos os átomos de todos os componentes) que podem levar à inibição da síntese do DNA ou a sua recombinação, ocasionando mutações. A maioria dos efeitos biológicos do HNE é atribuída à sua capacidade em reagir com proteínas para formar biomoléculas modificadas que podem interromper importantes funções celulares e induzir mutações (Uchida, 2003). Na Figura 12 é representada a formação de um aduto a partir da interação entre o HNE e uma proteína.



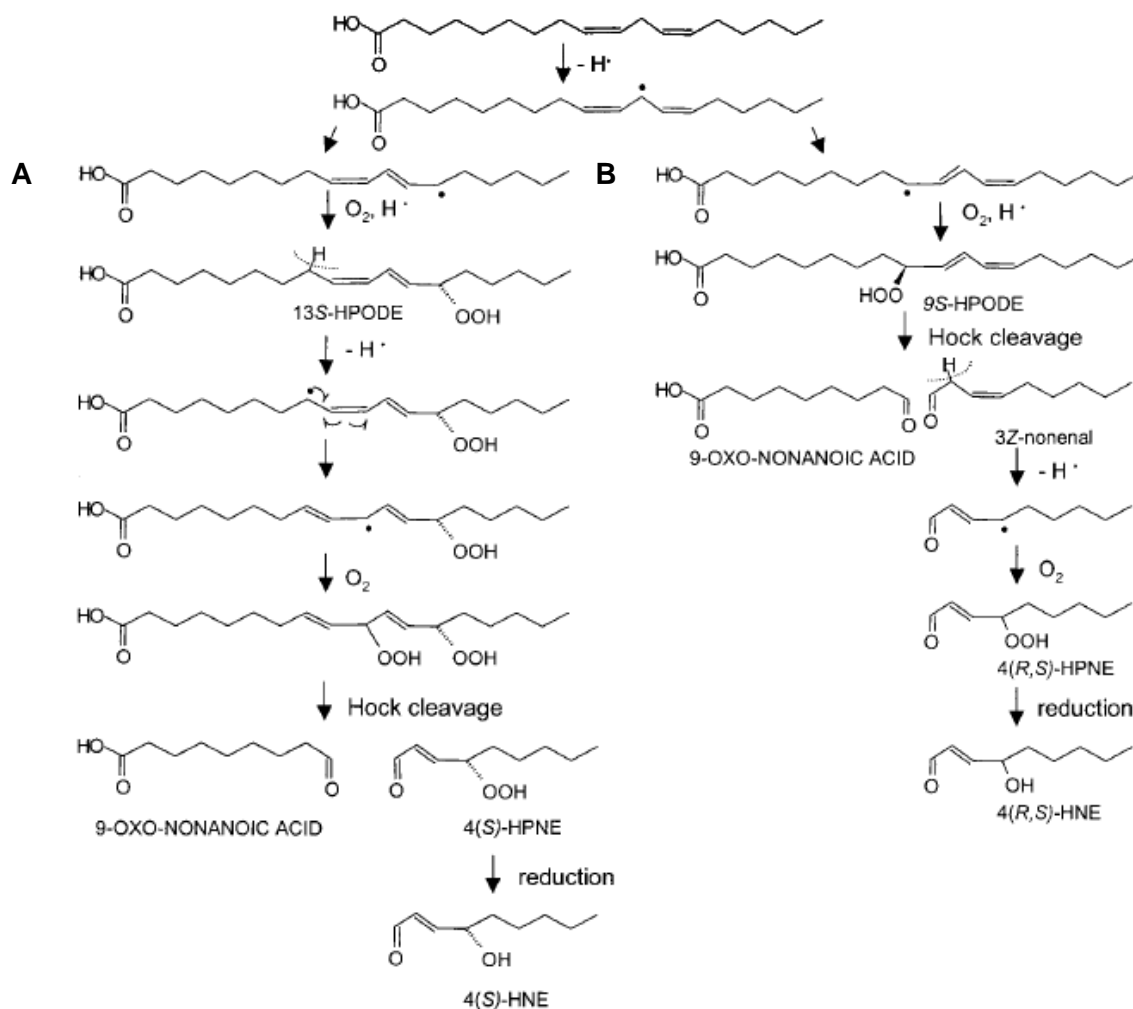
**Figura 12.** Formação de aduto a partir da interação do HNE e uma proteína

**Fonte.** Uchida, 2003

Experimentos têm relatado que o HNE pode estar relacionado a diferentes estados patológicos, entre os quais doenças prematuras, doenças cardiovasculares, aterosclerose, distrofia muscular, artrite reumatóide, doenças do fígado, oxidação do LDL e doenças neurodegenerativas (doença de Alzheimer, doença de Parkinson, e isquemia cerebral) entre outras (Schneider *et al.*, 2001; Uchida 2003; Seppanen e Csallany, 2006; Han e Csallany, 2008).

O HNE pode ser formado durante a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados, como o ácido araquidônico e o ácido linoléico. Uma rota de

formação do HNE através da oxidação lipídica do ácido linoléico foi proposta por Schneider e colaboradores (2001), conforme mostrado na Figura 13.



**Figura 13.** Esquema de formação do HNE, a partir da oxidação do ácido linoléico.

**Fonte:** Schneider *et al.*, 2001

O ácido linoléico é susceptível a reações dos radicais livres no sistema bis-álíco, para formar um radical alil, o qual pode ser estabilizado por ressonância. Esse radical pode reagir com o oxigênio molecular e gerar diferentes hidroperóxidos. A abstração de um hidrogênio alílico no C-8 do ácido (13S,9Z,11E)-13-hidroperóxido-9,11-octadecadienóico (13S-HPODE) forma um radical intermediário, que após oxigenação gera um di-hidroperóxido instável, que por clivagem produz dois fragmentos de aldeídos, ácido 9-oxo-nonanóico e 4-hidroperóxido-2-E-nonenal (4S-HPNE). Este último composto é o precursor imediato da HNE. Um mecanismo alternativo de formação do HNE, segue o caminho b da Figura 13 em que ocorre a



clivagem do 9S-HPODE e a formação de dois fragmentos, o ácido 9-oxo-nonanoico e o 3Z-nonenal; este último é oxigenado levando a formação de uma mistura racêmica de 4-(R-S)-HPNE, que é o precursor imediato do HNE (Schneider *et al.*, 2001).

É possível destacar também o 4-hidroxi-2-*trans*-hexenal (HHE), por apresentar elevada toxicidade, assim como o HNE. O HHE pode ser formado a partir da oxidação do ácido linolênico, já foi identificado em diferentes tipos de óleos vegetais, como o óleo de soja, girassol e milho (Guillen e Goicoechea, 2008; Han e Csallany, 2008; Goicoechea e Guillen, 2014).

Sendo os aldeídos  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturados, aqueles que apresentam uma ligação C=C conjugada com o grupo carbonila, os epoxialdeídos, assim como os 4-hidroxi-2-*trans*-hexenal, seriam uma das variantes estruturais do mesmo (Loureiro *et al.*, 2002). Epoxialdeídos têm sido identificados como um dos produtos da oxidação de óleos vegetais, assim como na oxidação de pigmentos naturais, como o  $\beta$ -caroteno (Benevides *et al.*, 2011; Guillen e Uriarte, 2012; Guillen e Goicoechea, 2008; Goicoechea e Guillen, 2014). Por terem a capacidade de se ligarem covalentemente a grupos nucleofílicos presentes em DNA, peptídeos e proteínas, provocando alterações nas funções dessas moléculas, os epoxialdeídos são considerados citotóxicos e mutagênicos (Loureiro *et al.*, 2002). Dentre os epoxialdeídos é possível destacar o 4,5-epoxi-2-decenal, por ter sido identificado como um produto na oxidação lipídica de óleos vegetais. O 4,5-epoxi-2-decenal pode ser formado através da oxidação do ácido linoléico (Pryor e Porter, 1990) e por epoxidação do 2,4-decadienal, catalisada por peróxidos (Loureiro *et al.*, 2002).

## 2.4 PRINCIPAIS MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS ÓLEOS

A combinação de variáveis, como tipos de alimentos, de óleo, de fritadeiras e de condições de operação, determina a taxa em que as reações de degradação ocorrem e, portanto, um método analítico pode ser bom para avaliar a qualidade em determinado sistema e não se aplicar a outros sistemas (Lima e Gonçalves 1994).

No Brasil, como em muitos outros países, não existem leis e regulamentos que estabeleçam limites para as alterações em óleos utilizados em frituras. Em 2003, foi requerida à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), pela

Associação de Defesa do Consumidor, a criação de Normas Brasileiras para a utilização e descarte de óleos e gorduras utilizadas em frituras, no sentido de determinar limites para o descarte dos mesmos, como: quantidade de ácidos graxos livres inferior a 0,9% e teores máximos de 25% para compostos polares totais e 2% para ácido linolênico (Brasil, 2004a).

A Anvisa, através do informe técnico nº 11, publicou que, tendo em vista as dificuldades encontradas para as análises de óleo vegetais, como metodologias demoradas e falta de equipamentos e funcionários capacitados e treinados, não foi possível estabelecer um regulamento técnico específico. Entretanto, a ANVISA elaborou recomendações sobre boas práticas para utilização e descarte de óleos utilizados em frituras, com objetivo de atingir o uso doméstico, pequenos comerciantes e restaurantes, dentre outros (Brasil, 2004b).

A Europa e os Estados Unidos têm estabelecido regulamentos para o controle da qualidade dos óleos e gorduras utilizados para fritura, fixando limites máximos para os compostos polares (de 24 a 27%), índice de peróxidos de 15meq/kg e acidez (de 1,0% a 2,5%, expressa em ácido oleico). Na América do Sul, o Chile foi pioneiro na regulamentação em óleo de fritura, estabelecendo limites de 2,5% para ácidos graxos livres (expressos em ácido oleico), 25,0% para CPT. Nota-se que ainda não há um consenso entre os países, principalmente quanto aos limites de ácidos graxos livres, com uma variação entre 0,9% e 2,5% (Freire *et al.*, 2013).

Na Tabela 4 estão apresentados os principais parâmetros utilizados para avaliar a qualidade de óleos e gorduras, os produtos de alteração mais relacionados a estes e as metodologias oficiais mais utilizadas, podendo-se encontrar outras metodologias para essas determinações. Na maioria trata-se de parâmetros clássicos na análise de óleos e gorduras.

**Tabela 4:** Parâmetros analíticos utilizados para avaliação da qualidade de óleo, baseados em mudanças físicas e químicas.

<b>Parâmetros analíticos</b>	<b>Compostos relacionados</b>	<b>Métodos de referência*</b>
<b>Viscosidade</b>	Polímeros, aumento de saturação	DGF C-IV 7
<b>Cor</b>	Compostos carbonílicos $\alpha$ - $\beta$ -insaturados	AOCS Cc 13b-45
<b>Espuma</b>	Polímeros, surfactantes	----
<b>Absorção no ultravioleta</b>	Dienos e trienos conjugados	DGF C-IV 6
<b>Constante dielétrica</b>	Compostos polares	----
<b>Avaliação organoléptica</b>	Compostos voláteis e/ou oxidados	AOCS Cg 2-83
<b>Ponto de fumaça</b>	Compostos voláteis, ácidos graxos livres	AOCS Cc 9A-48
<b>Compostos polares</b>	Compostos polares	AOCS Cd 20-91
<b>Índice de acidez</b>	Ácidos graxos livres	AOCS Ca 5a-40
<b>Índice de iodo</b>	Duplas ligações	AOCS Tz 1c-85
<b>Índice de peróxido</b>	Peróxidos	AOCS Cd 8-53
<b>Índice de anisidina</b>	Aldeídos	AOCS Cd 8-53
<b>Reações colorimétricas</b>	Ácidos graxos oxidados	DGF C-IV 6e

\*AOCS: American Oil Chemist' Society;  
DGF: German Society for Fat Research

Para alguns parâmetros, como viscosidade, constante dielétrica, ponto de fumaça e índice de iodo, é necessário ter um valor de referência de um óleo não aquecido, o qual depende da composição em ácidos graxos e cujo valor é diferente para cada tipo de óleo. Por esta razão, a eficiência destes índices condiciona-se ao valor da variação em relação ao valor inicial (Lima e Gonçalves, 1995). Já o índice de acidez é dependente das contribuições do alimento, podendo-se encontrar óleos com o mesmo índice de acidez em diferentes níveis de alterações. A absorção ultravioleta, que avalia a formação de duplas e triplas ligações conjugadas, sofre

uma variação maior em óleos mais insaturados. O índice de peróxido depende do tempo entre a interrupção do processo de fritura e a realização da determinação (Lima e Gonçalves, 1995).

O índice de acidez é definido como a massa, em miligramas de hidróxido de potássio, necessária para neutralizar os ácidos graxos livre em um grama de amostra de óleo (Mendonça et al. 2008). A acidez pode revelar o estado de conservação dos óleos; conforme o aumento de frequência de frituras pode ocorrer maior hidrólise do óleo, devido às altas temperaturas e à troca de umidade do alimento com o meio de fritura. Como consequência, há aumento no conteúdo de ácidos graxos (Almeida *et al.*, 2006; Mendonça *et al.*, 2008). Apesar do índice de acidez não ser o melhor índice analítico para avaliar a qualidade do óleo ou gordura, é o parâmetro escolhido pela norma brasileira, que regulamenta a adequação de um óleo para consumo no Brasil. Seu valor máximo de 0,3% de ácido oleico para os óleos refinados (Sanibal e Mancini-Filho, 2002)

O índice de peróxido é um método que determina todas as substâncias, em termos de miliequivalentes de peróxido por 1000 g de amostra, que oxidam o iodeto de potássio (Mendonça *et al.*, 2008). O índice de peróxido está relacionado com a degradação oxidativa dos óleos, caracterizando-se como os produtos iniciais desse tipo de reação. A partir de determinado período de aquecimento, a taxa de degradação dos peróxidos torna-se superior à taxa de formação originando inúmeros compostos secundários no meio (Vergara *et al.*, 2006). Esse índice é aplicável em estágios iniciais da oxidação, o valor de peróxido atinge um pico e depois declina; assim não é o melhor parâmetro analítico para ser usado em óleos e gorduras utilizados em frituras (Sanibal e Mancini-Filho, 2002)

O índice de iodo é uma medida do grau de insaturação dos ácidos graxos presentes na gordura e é expresso em termos de % de iodo absorvido por grama da amostra. Sob determinadas condições, o iodo pode ser quantitativamente introduzido nas duplas ligações dos ácidos graxos insaturados e triglicerídeos. O índice de iodo depende da composição do óleo, sendo que quanto maior o número de insaturações de um ácido graxo, maior será a sua capacidade de absorção de iodo e, conseqüentemente, maior será o índice de iodo. Óleos hidrogenados têm seus índices de iodo alterados, de modo que a caracterização do óleo através do

índice de iodo torna-se difícil, sendo necessários ajustes na metodologia para cada tipo de óleo (Mendonça *et al.*, 2008).

A determinação de compostos polares totais (CPT) é um parâmetro bastante utilizado para avaliação da qualidade de óleos de fritura, servindo de base para as recomendações e regulamentos que limitam a qualidade destes produtos para consumo humano (Cella *et al.*, 2002; Sanibal e Mancini-Filho, 2002). CPT são todos aqueles compostos que tem uma polaridade maior que a dos triacilgliceróis, e que correspondem aos não voláteis resultantes da alteração oxidativa, térmica e hidrolítica. A metodologia de referência é baseada em uma separação em coluna cromatográfica, usando sílica como adsorvente. O método é rápido, fácil de ser realizado e permite boa separação entre triglicerídeos não alterados e o material polar (Sanibal e Mancini-Filho, 2002).

Outra forma de avaliação da qualidade de óleos é através dos Kits de teste rápido, que fornecem resultados imediatos para o monitoramento da qualidade e ponto de descarte de óleos ou gorduras de fritura. Esses testes são baseados em uma mudança química que ocorre no óleo e gordura durante o processo de fritura, normalmente relacionada com a quantidade de compostos polares. Os testes mais utilizados são baseados em métodos colorimétricos, estando relacionado a compostos polares na concentração de 25 a 27% como ponto de descarte (Sanibal e Mancini-filho, 2002).

A avaliação correta dos óleos e momento ideal para descartá-los é extremamente importante, uma vez que implica na otimização dos processos de fritura e, conseqüentemente, na garantia da qualidade dos produtos para consumo. Óleos descartados, antecipadamente podem acarretar em prejuízos econômicos ao estabelecimento e por outro lado, se descartado tardiamente implicará na perda de qualidade do produto e, portanto em problemas à saúde do consumidor (Cella *et al.*, 2002).

#### 2.4.1 PRINCIPAIS MÉTODOS DE ANÁLISE DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS EM ÓLEOS VEGETAIS

Os compostos carbonílicos (CC) têm despertado grande interesse dos pesquisadores devido a vários fatores, entre eles por serem os principais poluentes atmosféricos de ambientes internos, não industriais, sendo responsáveis por diversos efeitos danosos à saúde de trabalhadores desses ambiente, juntamente com outros compostos voláteis. Diferentes métodos analíticos, sob diferentes condições de oxidação e experimentais, têm sido usados para a determinação de CC, oriundos da oxidação térmica dos óleos vegetais.

Alguns autores (Bastos e Pereira, 2010; Katragadda *et al.*, 2010 e da Silva e Pereira, 2008) estudaram a emissão de CC, por óleos vegetais aquecidos a temperatura típica de fritura, utilizando métodos analíticos similares, que consistiam da amostragem dos produtos secundários da oxidação, através de cartuchos de sílica funcionalizados com C18, impregnados com 2,4-dinitrofenilidrazina (2,4-DNPH) como agente derivatizante. Alguns compostos, como acetaldeído, acroleína, butanal, hexanal e 2-heptenal foram identificados nos três.

Zhu e colaboradores (2008) também estudaram a fração volátil de óleos vegetais. O método consistiu em condensar vapores do óleo e mantê-los sob refrigeração até ser analisada por espectrofotometria no ultravioleta e por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. Essa metodologia não se mostrou eficiente na determinação de compostos de baixa massa molar, como formaldeído, acetaldeído e acroleína, que já tinham sido identificados e quantificados em outros estudos.

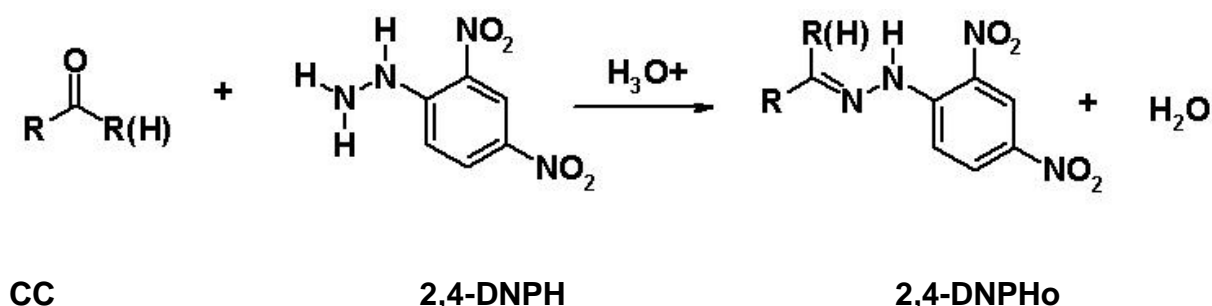
Um outro método que vem sendo utilizado para a determinação de compostos voláteis na fração gasosa dos óleos vegetais aquecidos, é a partir da microextração em fase sólida seguida de análise por cromatografia em fase gasosa (Guillén e Goicoechea, 2008; Guillén e Uriarte 2012). Segundo os autores, por meio deste método foi possível identificar a presença de diferentes classes de compostos como: aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres, álcoois, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. Guillén e Uriarte (2012) destacam a identificação de compostos policíclicos aromáticos e de alguns aldeídos insaturados, de alta toxicidade, tais como: 4-

hidroxi-2-nonenal, 4-oxo-2-nonenal e 4,5-epóxi-2-decenal em amostras com alto grau de oxidação.

Diferentes métodos também têm sido aplicados na análise da fração líquida de óleos comestíveis. Dentre estes, o mais aplicado consiste na derivatização direta dos CC com a 2,4-DNPH, seguida por extrações em uma mistura de solventes. Os derivados lipofílicos são então separados em grupos através de placas de sílica, eluídos das placas com solvente, e o extrato evaporado até um volume específico, seguido de análise por cromatografia líquida (Seppanen e Csallany, 2001; Seppanen e Csallany, 2004; Seppanen e Csallany, 2006).

A 2,4-DNPH é uma das melhores alternativas de agente derivatizantes para a determinação de CC, tanto em amostras líquidas como gasosas. Os principais motivos de sua ampla aplicação são determinação simultânea de aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos, rapidez na reação com os CC a temperatura ambiente e alta estabilidade dos derivados (Andrade *et al.*, 2002; Bastos e Pereira, 2010; Vieira *et al.*, 2012).

A reação de derivatização dos CC com a 2,4-DNPH ocorre por adição nucleofílica à carbonila, catalisada por ácidos, seguida de eliminação de água e formação das 2,4-dinitrofenilidrazonas (2,4-DNHPo) (Andrade *et al.*, 2002). Esta reação está representada na Figura 14.



**Figura 14.** Reação geral de compostos carbonílicos com a 2,4 dinitrofenilidrazina, formando as hidrazonas das carbonilas

Outros agentes derivatizantes têm utilizado, como o fluoral-p, o-benzil-hidrolilamina, pentafluorfenilidrazina, 5-dimetilaminaftaleno-1-sulfoidrazida, N-metil-4-

hidrazino-7-nitrobenzofurazan entre outros, entretanto o mais o amplamente empregado é a 2,4-DNPH (Vieira *et al.*, 2012)

A espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) também tem sido utilizada para determinação dos comportos secundários da oxidação de óleos. Através desta técnica é possível identificar os produtos primários da oxidação como os hidroperóxidos e dienos conjugados, e distinguir seus isômeros. Além disso, é possível também identificar os produtos secundários da oxidação como alquenais, alcenais, alcadienais e compostos oxigenados como os aldeídos (Guillén e Ruiz, 2004).

Devido à complexidade do processo de fritura, não há um único método capaz de avaliar com precisão todos os tipos de deteriorações dos óleos. (Freitas *et al.*, 2013). Diferentes métodos e condições experimentais têm sido utilizados para investigar produtos primários e secundários, formados na fase vapor e na fase líquida, durante a oxidação térmica de óleos vegetais, a fim de se obter uma maior compreensão desse importante processo de degradação tornando de grande importância o desenvolvimento de pesquisas associadas a esse contexto.



### 3.0 JUSTIFICATIVA

O consumo de frituras é significativo nos hábitos dos brasileiros. Entretanto, são grandes as evidências de que óleos e gorduras, ao passarem por processos de aquecimento, podem sofrer modificações, devido à formação ou aumento nas concentrações de diferentes substâncias. Durante o processo de aquecimento diferentes tipos de compostos são formados, através de reações como, por exemplo a oxidação,. Dentre esses, os CC são de grande importância devido à sua maior abundância, quando comparada à dos outros produtos possíveis.

Entre os CC gerados no processo de oxidação térmica de óleos vegetais é possível destacar os hidroxialdeídos  $\alpha$ -,  $\beta$ - insaturados por sua elevada toxicidade, a exemplo do 4-hidroxi-2- trans-nonenal (HNE) e do hidroxi-2- trans-hexenal (HHE), os quais devido à sua alta reatividade são capazes de promover mudanças *in vivo* em proteínas, ácidos nucleicos e outras biomoléculas.

Devido a sua pouca volatilidade, os hidroxialdeídos  $\alpha$ -,  $\beta$ - insaturados tendem a permanecer na fração líquida dos óleos. Considerando que parte do óleo utilizado na fritura é absorvida pelo alimento, tornando-se parte da nossa dieta, é de grande importância a avaliação das alterações, identificação e quantificação dos compostos formados na fração líquida de óleos submetidos a aquecimento, para os consumidores, indústrias de alimentos e serviço de inspeção sanitária.

O óleo de soja foi escolhido em virtude do seu uso frequente nos hábitos culinários, visto que é o um dos óleos mais populares e o segundo óleo vegetal comestível mais consumido mundialmente, e devido a sua alta porcentagem de ácidos graxos poliinsaturados. Quanto aos íons metálicos, estes atuam como catalisadores de reações oxidativas, tendo sido escolhidos três dos mais presentes em níveis traço na maioria dos óleos vegetais, podendo ser originários do próprio solo onde as sementes são cultivadas, dos equipamentos utilizados no processo de refino, dos procedimentos de estocagem e de utensílios culinários usados durante o processo de fritura dos alimentos.

## 4.0 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Essa pesquisa teve como objetivo estudar a formação de compostos carbonílicos, com ênfase nos hidroxialdeídos  $\alpha$ -,  $\beta$ - insaturados, na fração líquida do óleo de soja, quando aquecido por diferentes intervalos de tempo à temperatura típica utilizada na fritura de alimentos, em presença de oxigênio e de íons metálicos em diferentes concentrações.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Desenvolver método analítico para determinação, no próprio óleo, de compostos carbonílicos, com ênfase nos hidroxialdeídos  $\alpha$ -,  $\beta$ - insaturados, formados durante processo de oxidação do óleo de soja;
- ✓ Validar o método desenvolvido;
- ✓ Identificar e quantificar compostos carbonílicos, especialmente os hidroxialdeídos  $\alpha$ -,  $\beta$ - insaturados nas amostras de óleo à temperatura ambiente (25 °C) e após o aquecimento contínuo, por diferentes intervalos de tempo, e na presença de íons metálicos em diferentes concentrações, comparando os seus perfis nas diferentes condições;
- ✓ Comparar os resultados com os obtidos em outros trabalhos do grupo, conduzido com a fração vapor de óleos de soja e canola aquecidos sob condições semelhantes.

## 5.0 EXPERIMENTAL

### 5.1 REAGENTES E SOLVENTES

- ✓ Ácido fosfórico concentrado, P.A.(85%) – Merck
- ✓ Acetonitrila, grau HPLC – J. T. Baker
- ✓ Álcool etílico, grau HPLC – J. T. Baker
- ✓ Ar sintético grau super-seco – AGA
- ✓ Cloreto Cúprico dihidratado – P.A. (97%), Vetec
- ✓ Cloreto Férrico hexahidratado – P.A. (97%), Vetec
- ✓ Cloreto Manganês II tetrahidratado– P.A. (98%), Vetec
- ✓ Tetrahidrofurano - HPLC – J. T. Baker
- ✓ Diclorometano, grau HPLC. – J. T. Baker
- ✓ 2,4-Dinitrofenilidrazina, P.A. – Aldrich
- ✓ Água para limpeza de vidrarias – deionizada e isenta de compostos orgânicos

### 5.2 MATERIAIS

- ✓ Balão de decantação de 500 mL
- ✓ Balão de vidro de fundo redondo de três vias
- ✓ Balão volumétrico (5,0; 10,0 e 25,0 mL)
- ✓ Béqueres (25; 50 e 100 mL)
- ✓ Bastão de vidro
- ✓ Coluna cromatográfica C18 (Kinetex 2,6 $\mu$ m; 2,1x 50 mm; Phenomenex)
- ✓ Filtros de celulose, Whatman 41
- ✓ Filtros para seringa de 25 mm, com membrana de PTFE de 0,2 microns
- ✓ Medidor de vazão (rotâmetro) – Cole Parmer, modelo G11K859
- ✓ Micropipeta (2-20, 20-200 e 100-1000mL, eppendorf, Hamburg, Alemanha)
- ✓ Pipetas (5 e 10 mL)
- ✓ Seringa de vidro tipo *luer* de 5 mL
- ✓ Termômetro
- ✓ Tubo de centrifuga cônico de 15 mL

Os materiais utilizados durante todos os procedimentos experimentais foram lavados seguindo o seguinte procedimento:

- Enxágue em água corrente;
- Lavagem com solução de potassa alcoólica;
- Enxágue em água corrente;
- Sonicação com solução de potassa alcoólica por 10 min;
- Enxágue em água corrente;
- Lavagem com solução de extran neutro a 2%;
- Enxágue em água corrente;
- Enxágue com água ultra-pura;
- Enxágue com acetonitrila e secagem;
- Cobrir com papel filme as extremidades abertas e guardar em armários fechados.

### 5.3 EQUIPAMENTOS

- ✓ Centrifuga (FANEM, modelo Excelsa 2, São Paulo, Brasil)
- ✓ Proveta (100 mL)
- ✓ Agitador mecânico com haste de vidro e teflon - Nova Ética, modelo 103
- ✓ Balança analítica – Sartorius Analytic, modelo A120S (Alemanha)
- ✓ Indicador de temperatura, termopar – COEL, modelo LWI/J
- ✓ Manta de aquecimento – QUIMIS, modelo Q.321.A.14
- ✓ Banho de ultra-som - Arruda, modelo SX-10
- ✓ Cromatógrafo a líquido, composto por sistema de bombeamento e programação de gradientes binários (LC 20AD), injetor automático (SIL-20A) e detector DAD (SPD-M20A) – Shimadzu, modelo Prominence (Japão)
- ✓ Espectrômetro de massas com fonte de ionização por eletrospray e analisador quadrupolo – Shimadzu, modelo LCMS-2020 (Japão)

### 5.4 PREPARO DA SOLUÇÃO DE 2,4-DNPH

A pureza da solução de 2,4-DNPH é extremamente importante, pois dela dependem os níveis dos brancos e, conseqüentemente, os limites de detecção e

quantificação do método analítico. Para o preparo da solução ácida de 2,4-DNPH é necessário que toda a vidraria a ser utilizada e a capela, sejam previamente limpas com acetonitrila, com o intuito de minimizar possíveis contaminações.

A solução ácida de 2,4-DNPH a 0,8 % (m/v) foi preparada pesando-se a 0,8g do sólido puro em balança analítica e dissolvendo em 60 mL de acetonitrila, 39 mL de água ultra-pura e 1 mL de ácido fosfórico concentrado. Em seguida, realizou-se duas extrações com 2 mL de diclorometano por vez, a fim de remover as hidrazonas de compostos carbonílicos que pudessem estar presentes como contaminantes. Antes de utilizar a solução, era feita uma análise da mesma pelo método utilizado para as análises das amostras e padrões, para avaliar a presença de contaminação. Duas extrações foram em geral suficientes. Entretanto, havendo picos referentes a CC, eram feitas novas extrações até que a solução estivesse em condições adequadas para o uso, sem a presença de impurezas.

A solução foi estocada em frasco âmbar, vedado com fita teflon para evitar contaminação por CC presentes na atmosfera e mantido sob refrigeração a 4°C. A solução era estocada por um período máximo de 48h.

## **5.5 SÍNTESE DAS HIDRAZONAS DOS COMPOSTOS CARBONÍLICOS**

Os padrões de acroleína, 2-heptenal, 2,4-heptadienal, 2-octenal, 2,4-decadienal, 2-decenal e 2-undecenal foram adquiridos da Sigma Aldrich (Missouri, USA). O 4-hidroxi-2-hexenal, 4-hidroxi-2-nonenal e 4,5-epoxi-2-decenal foram adquiridos da Cayman Chemical (Michigan, USA).

As 2,4-DNPHo dos aldeídos correspondentes foram sintetizadas de acordo com o método descrito na literatura (Andrade, 2001), segundo o procedimento a seguir:

- Em erlenmeyer de 100 mL dissolvem-se 0,8 g de 2,4-DNPH em 4 mL de ácido sulfúrico concentrado, através da adição lenta deste último. Em seguida, acrescentou-se, lentamente e sob agitação, 6 mL de água ultra-pura. À solução quente, adicionou-se lentamente 20 mL de etanol grau HPLC.
- A hidrazona de cada composto carbonílico foi preparada dissolvendo-se 1g do mesmo em 50 mL de etanol. A esta solução, foi adicionada a solução de 2,4 DNPH recém preparada e deixou-se a mistura em repouso por cerca de 30 minutos, à

temperatura ambiente. A mistura foi filtrada e os cristais de 2,4-DNPHo foram submetidos a processo de recristalização.

- A recristalização das 2,4-DNPHo foi feita dissolvendo-se os cristais em 60 mL de etanol previamente aquecido. Quando houve a solubilização imediata das 2,4-DNPHo sólidas, acrescentou-se aproximadamente 5 mL de água ultra-pura até obter o ponto de turbidez. A solução ainda quente foi filtrada a vácuo, e os recipientes contendo os filtrados foram fechados e deixados em repouso, à temperatura ambiente, até completar a recristalização (cerca de 12 horas).

- As 2,4-DNPHo foram filtradas, secas em dessecador à vácuo e protegidas da luz, e finalmente estocadas em recipientes bem fechados e devidamente identificadas.

## **5.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO DAS HIDRAZONAS**

Para o preparo das soluções das 2,4-DNPHo, foi inicialmente pesada uma massa dos cristais de 2,4-DNPHo de cada CC, que era a seguir diluída em ACN, e aferido o volume final para 25 mL em balão volumétrico. As massas pesadas e as concentrações corrigidas de cada hidrazona encontram-se na Tabela 5. Estas soluções foram armazenadas sob refrigeração em frasco âmbar, lacrados com filme de teflon e envolvidos em papel alumínio para evitar contaminação e degradação pela luz. A cada abertura do frasco, fazia-se passar gás nitrogênio puro sobre a superfície da solução contida no frasco, a fim de remover o ar. As soluções estoque foram utilizadas para preparar uma solução de trabalho com concentração de 50 µg/mL, empregada no preparo dos padrões usados para construção das curvas analíticas e demais testes.

A faixa de concentração utilizada nas curvas analíticas para acroleína, 2-heptenal, 2,4-heptadienal, 2-octenal, 2-decenal, 2-undecenal, 4-hidroxi-2-hexenal e 4,5-epoxi-decenal foi de 0,2 a 10 µg/mL; para o 2,4-decadienal e 4-hidroxi-2-nonenal foi de 0,2 a 15 µg/mL. Todas as soluções-padrão foram armazenadas sob refrigeração a 4°C em frascos de vidro âmbar.

**Tabela 5.** Concentrações reais das hidrazonas e dos compostos carbonílicos.

Composto Carbonílico	MM <sub>CC</sub>	MM <sub>DNPHo</sub>	F <sub>C</sub>	m <sub>DNPHo</sub> (mg)	C <sub>DNPHo</sub> (µg/mL)	C <sub>CC</sub> (µg/mL)
Acroleína	56,06	236,2	0,2373	11,3	452	107,26
2-Heptenal	112,17	292,3	0,3837	11,9	476	182,68
2,4-Heptadienal	110,15	290,2	0,3796	10,8	432	163,99
2-Octenal	126,20	306,3	0,4120	11,7	468	192,82
2-Decenal	154,25	334,4	0,4613	10,7	428	197,44
2,4-decadienal	152,23	332,3	0,4581	11,5	460	210,73
2-undecenal	168,28	348,4	0,4830	11,1	444	214,45
4-hidroxi-2-hexenal	114,1	294,2	0,3878	10,6	424	164,42
4-hidroxi-2-nonenal	156,2	336,3	0,4645	10,8	432	200,65
4,5-epoxi-2-decenal	168,2	348,3	0,4829	10,3	412	198,95

MM<sub>CC</sub> = massa molar do CC

MM<sub>DNPHo</sub> = massa molar da hidrazona

f<sub>C</sub> = fator de correção de massa = MM<sub>CC</sub>/MM<sub>DNPHo</sub>

m<sub>DNPHo</sub> = massa da hidrazona pesada

C<sub>DNPHo</sub> = concentração da solução da hidrazona

C<sub>CC</sub> = concentração correspondente do CC na solução = C<sub>DNPHo</sub> × f<sub>C</sub>

As curvas analíticas dos padrões das 2,4-DNPH foram obtidas por regressão linear e construídas com sete pontos (0,2; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µg.mL<sup>-1</sup>). Foram construídas curvas analíticas de dois modos: dissolvendo-se os padrões das hidrazonas dos CC diretamente em solvente (acetonitrila) e a partir da adição dos padrões das hidrazonas dos CC ao extrato da matriz. As curvas foram repetidas a cada 15 dias e checadas diariamente a partir da análise de um ponto de concentração intermediária.

## 5.7 OBTENÇÃO E PREPARO DA AMOSTRA DE ÓLEO UTILIZADA NOS EXPERIMENTOS

Com o intuito de minimizar a heterogeneidade natural existente entre as diferentes marcas de óleo de soja, foi feita uma mistura de aproximadamente 1 litro, de quatro marcas adquiridas em supermercados locais em Salvador-Bahia, que eram retiradas sempre do fundo das prateleiras (protegidas da luz).

A amostra foi armazenada em frasco âmbar de 1L, a temperatura ambiente, em local de baixa luminosidade. A cada abertura do frasco, fazia-se passar nitrogênio puro sobre a superfície do óleo contido no frasco, a fim de remover o ar.

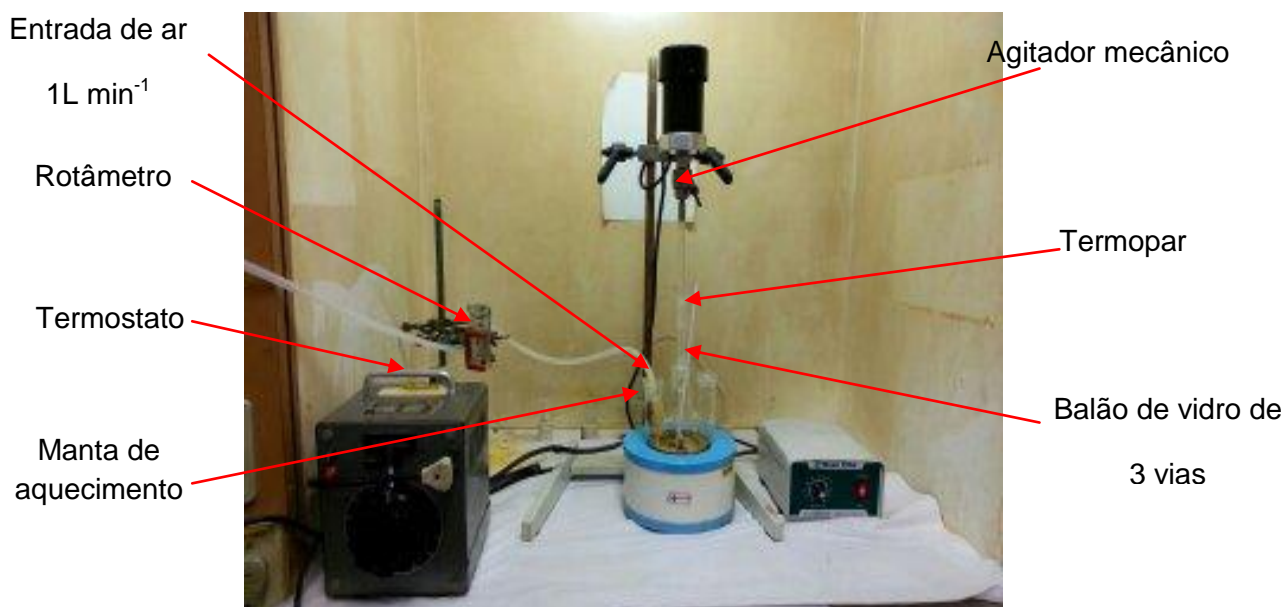
## 5.8 DESCRIÇÃO DO SISTEMA EXPERIMENTAL

O sistema experimental usado é mostrado na Figura 15, e consistia de um balão de vidro de três vias de fundo redondo, aquecido por uma manta a uma temperatura de 180°C, sob fluxo de entrada de ar seco purificado, na vazão de 1 L min<sup>-1</sup>, contendo ainda agitador mecânico com haste de vidro e um termopar para registrar a temperatura. O processo de aquecimento foi realizado de maneira contínua durante 8 horas, e as amostras coletadas em 1, 2, 4, 6 e 8 horas de aquecimento, em uma relação superfície/volume de 0,43 cm<sup>-1</sup>, condições previamente testadas (da Silva e Pereira, 2008; Bastos e Pereira, 2010). Foram analisadas amostras de óleos submetidas a aquecimento sem a adição de íons metálicos e com adição de íons Fe (III), Cu (II) e Mn (II), em três diferentes concentrações.

No estudo da influência dos íons metálicos, foram utilizadas soluções de cloreto férrico, cloreto cúprico e cloreto de manganês em etanol/água (4:1) na concentração de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>. No início do aquecimento, um volume da solução do íon metálico, a ser estudado, era adicionado ao óleo com o uso de micropipetas calibradas para as faixas de 2-20 µL e de 10-100 µL. Assim, para o Fe (III) eram adicionados volumes de 19,6 µL; 58,7 µL; e 97,8 µL para concentração final 10,0; 30,0 e 50,0 µg.kg<sup>-1</sup> do íon metálico em óleo, respectivamente; para o Cu (II) foram usados volumes de 10,8 µL; 32,5 µL e 54,3 µL para concentração final 10,0; 30,0 e 50,0 µg.kg<sup>-1</sup> do íon metálico em óleo, respectivamente; e para o Mn (II) foram



usados volumes de 14,4  $\mu\text{L}$ ; 43,3  $\mu\text{L}$  e 72,0  $\mu\text{L}$  para concentração final 10,0; 30,0 e 50,0  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  do íon metálico em óleo, respectivamente.



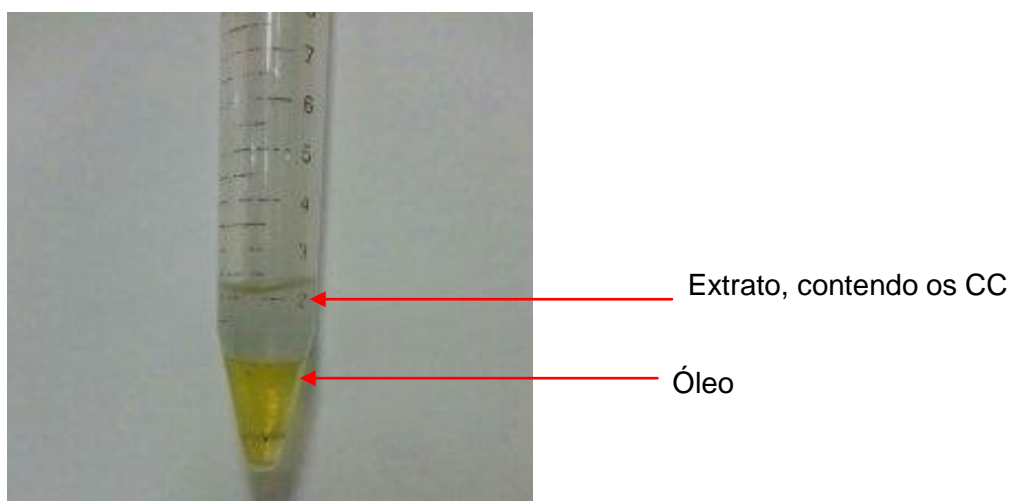
**Figura 15:** Foto do sistema experimental

## 5.9 PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS CARBONÍLICOS NAS AMOSTRAS DE ÓLEO

A técnica de extração ELL empregada neste trabalho teve como objetivo a extração dos CC de amostras de óleo antes e após aquecimento, utilizando acetonitrila como solvente extrator. O procedimento descrito a seguir, foi otimizado com intuito de se obter uma extração eficiente.

Inicialmente amostras foram coletadas, em triplicata, nos tempos de 1, 2, 4, 6 e 8 horas de aquecimento. Na primeira etapa do procedimento uma massa de cerca de 1g da amostra foi pesada em um tubo Falcon, sendo em seguida adicionado 1,5 mL do solvente extrator. O frasco contendo a mistura óleo/acetonitrila foi agitado manualmente por 3 minutos, e em seguida levado para centrifugação, por 10 minutos, a 4000 rpm, sendo este procedimento necessário para acelerar a separação de fases. Logo após, com as fases claramente separadas, Figura 16, a fase sobrenadante (ACN) foi coletada com auxílio de uma micropipeta e transferida

para um balão volumétrico de 5 mL. A segunda etapa do procedimento envolveu o processo de derivatização dos CC, com a adição da 2,4 DNPH ao balão contendo o extrato, para um volume final de 5 mL de solução. A solução foi sonicada por 30 min, com objetivo de acelerar a velocidade de reação entre os CC e a 2,4DNPH. Em seguida, a solução foi filtrada para retirada de qualquer material em suspensão, e analisada em sistema UFLC-DAD-ESI-MS. Todos os experimentos foram realizados dentro de uma capela de exaustão, que antes do início dos trabalhos era limpa com acetonitrila.



**Figura 16.** Separação da fase extratora da matriz

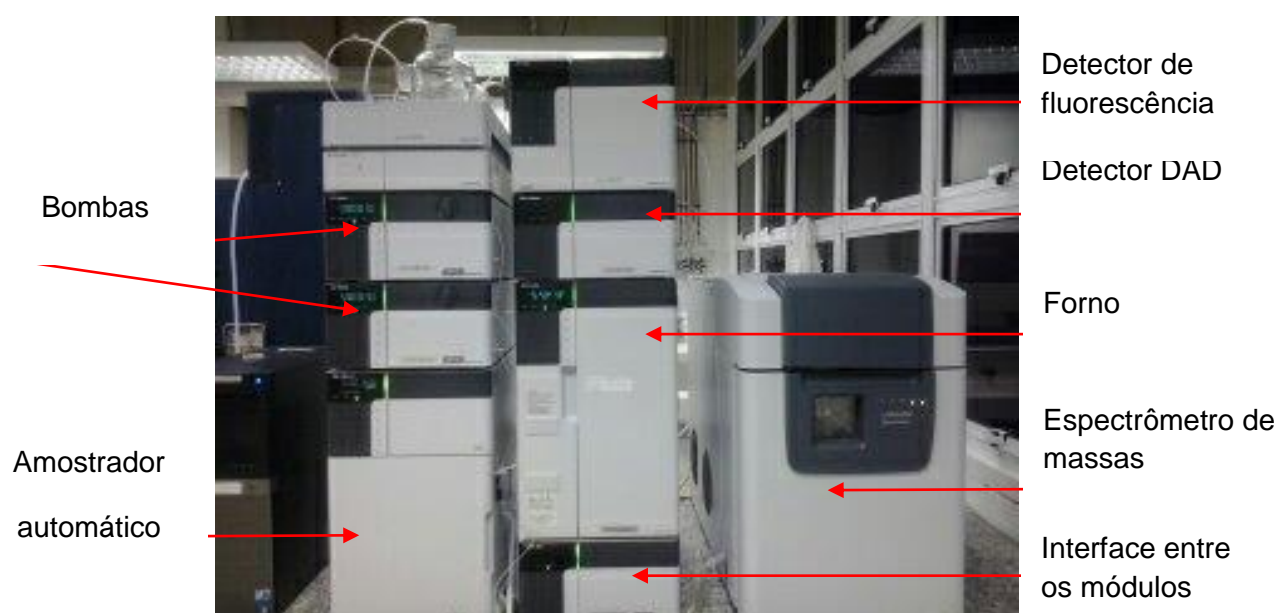
### 5.10 MÉTODO CROMATOGRÁFICO (UFLC-DAD-ESI-MS)

A técnica analítica utilizada na separação, identificação e quantificação dos CC em estudo foi a Cromatografia Líquida Ultrarrápida de Alta Performance acoplada a detector de arranjo de fotodiodos e espectrômetro de massas (UFLC-DAD-ESI-MS).

A separação cromatográfica das 2,4DNPHo foi feita em uma coluna C18 (Kinetex 2,6 $\mu$ m; 2,1x 50 mm; Phenomenex) a uma vazão de 0,5 mL min<sup>-1</sup>, usando como fase móvel “A” água/THF (80/20%) e fase móvel “B” acetonitrila pura. O gradiente utilizado para eluição foi de 30 a 70% B (5 min.); 70 a 30% B (10 min.); 30% B (3 min.), com tempo total de corrida de 18 minutos. A identificação das hidrazonas foi feita por comparação com os tempos de retenção de padrões e

confirmada por espectrometria de massas, nas seguintes condições de análise: fonte de ionização de eletrospray; polaridade: negativa; temperatura do gás de secagem (N<sub>2</sub>): 300°C; vazão do gás de secagem (N<sub>2</sub>): 15,00 L.min<sup>-1</sup>; pressão do nebulizador: 22.00 psi; voltagem do capilar: 4000 V.

A detecção no DAD foi feita por medida da absorvância em 365 nm e a quantificação dos CC foi realizada empregando-se o método de padronização externa. A Figura 17 mostra o sistema UFLC-DAD-ESI-MS utilizado.



**Figura 17.** Sistema UFLC-DAD-ESI-MS utilizado na análise das amostras

## 6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

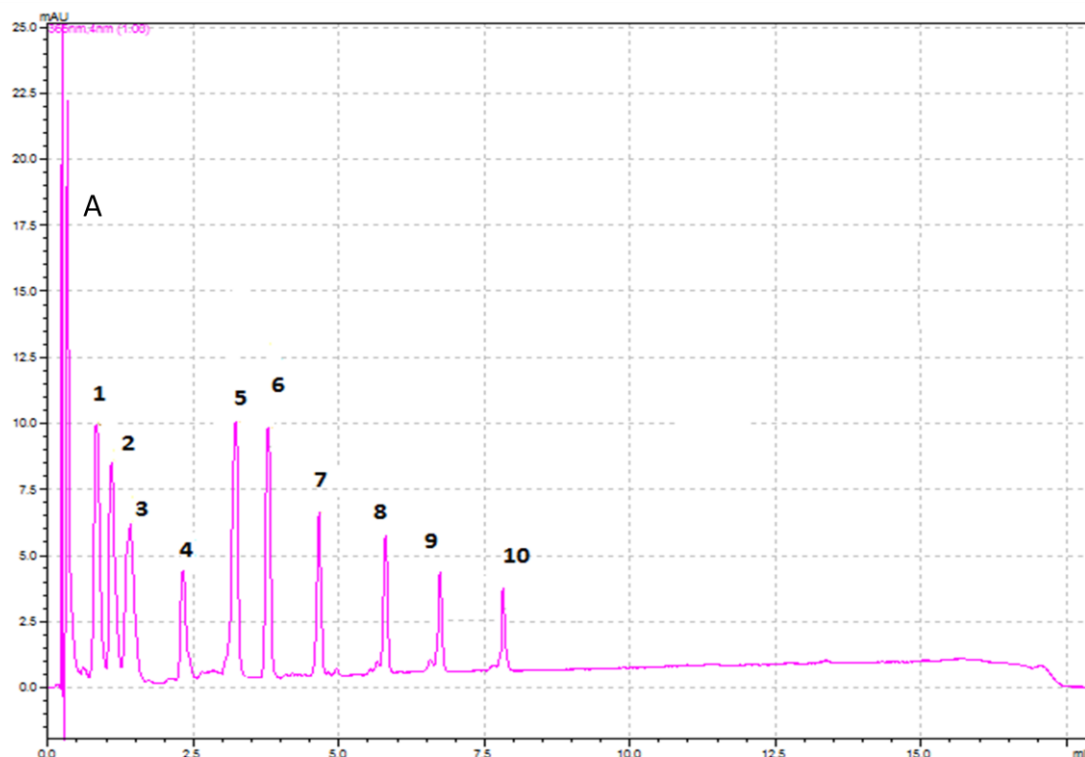
### 6.1 DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DE SEPARAÇÃO

No desenvolvimento das condições de separação dos CC no sistema UFLC-DAD-ESI-MS, buscou-se utilizar condições reprodutíveis, com boa resolução dos picos e o menor tempo de corrida possível. As condições cromatográficas iniciais foram baseadas em trabalhos presentes na literatura, principalmente no que diz respeito às condições do detector ESI-MS, e determinadas experimentalmente por método de tentativa (Bastos e Pereira, 2010; da Silva e Pereira 2008).

A otimização dos tempos de retenção dos CC foi realizada com injeção de 5,0 µL da solução padrão de cada CC na concentração de 1,0 µg.mL<sup>-1</sup> no modo SCAN, no detector de massas. Após a identificação dos tempos de retenção de cada composto, foi avaliada a resolução na separação da mistura. Várias programações de gradiente, de eluentes, vazão de eluentes e temperatura do forno foram testadas, a fim de se obter um resultado satisfatório para a separação das substâncias de interesse.

A separação cromatográfica otimizada, segundo mostrado na Figura 18, é realizada em cerca de 8 minutos, sendo necessários mais 10 minutos para o reequilíbrio da coluna nas condições iniciais do gradiente, resultando em um tempo total de análise de 18 minutos.

As condições cromatográficas utilizadas na determinação das hidrazonas da acroleína, 2-heptenal, 2,4-heptadienal, 2-octenal, 2,4-decadienal, 2-decenal, 2-undecenal, 4-hidroxi-2-hexenal, 4-hidroxi-2-nonenal e 4,5-epoxi-2-decenal, estão descritas no item 5.10. A Figura 18 mostra a separação da mistura padrão dos CC.



**Figura 18.** Cromatograma obtido por UFLC-DAD na injeção de 5,0  $\mu\text{L}$  de uma mistura padrão dos CC na concentração de 1,0  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Identificação dos picos: A: 2,4 DNPH; 1: 4-hidroxi-2-hexenal; 2: acroleína; 3: 4,5-epoxi-2-decenal; 4: 4-hidroxi-2-nonenal; 5: 2,4-heptadienal; 6: 2-heptenal; 7: 2-octenal; 8: 2,4-decedienal; 9: 2-decenal; 10: 2-undecenal.

## 6.2 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO DOS CC DO ÓLEO

A extração líquido-líquido (ELL) com solventes é uma das técnicas clássicas mais utilizadas em amostras líquidas, por ser simples, não exigir instrumentação sofisticada e por ser de fácil execução. Ela consiste na separação do analito da matriz pela distribuição do(s) analito(s) entre dois líquidos pouco miscíveis. As principais vantagens da ELL são a facilidade de operação manual, o custo relativamente baixo, boa reprodutibilidade e a variedade de solventes orgânicos que podem ser utilizados. Já as desvantagens estão associadas ao uso relativamente grande de solventes orgânicos, a formação de emulsão e a dificuldades de automação (Mior *et al.*, 2013).

Alguns trabalhos, presentes na literatura, utilizam ELL e derivatização com 2,4-DNPH para a determinação dos CC presentes na fração líquida em amostras de óleos vegetais. Seppanen e Csallany (2006) utilizam um método, de relativa complexibilidade, que envolve reação de derivatização direta e lenta (aproximadamente 12h) dos CC presentes na amostra de óleo com a 2,4-DNPH,

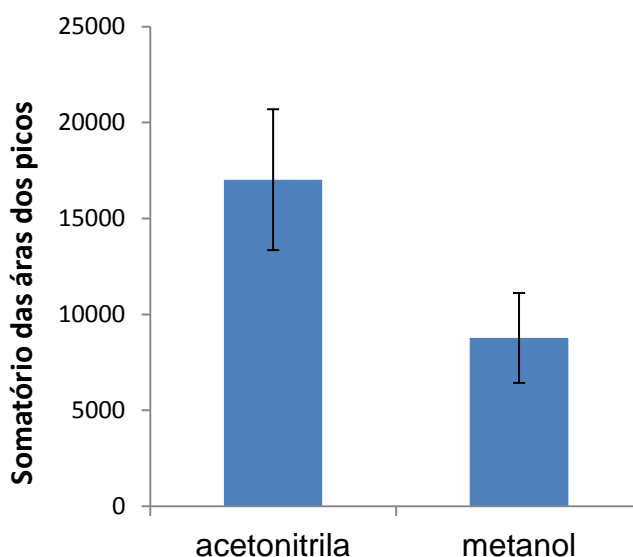
seguida de extrações com solventes, e separação dos grupos (CC polares derivatizados, CC apolares derivatizados) por cromatografia de camada delgada; os CC polares são extraídos das placas e pré-concentrados com evaporação do solvente e finalmente analisados. Neste trabalho optou-se por se utilizar a ELL, entretanto com o desenvolvimento de um método de simples execução, rápido e com o uso de baixos volumes de solvente. Para tanto, as condições experimentais foram otimizadas.

O processo de otimização das condições de extração e derivatização dos CC, envolveu a seleção do tipo de solvente extrator, volume do solvente extrator, modo, velocidade e tempo de agitação, e tempo de sonicação. A otimização destas variáveis foi realizada com a adição dos CC na matriz, em diferentes concentrações. Considerando-se que quatro variáveis foram avaliadas, optou-se pelo estudo univariado para uma melhor interpretação química da influência de cada variável.

### **6.2.1 SELEÇÃO DO SOLVENTE EXTRATOR**

O tipo de solvente extrator é um dos principais parâmetros que deve ser otimizado em um procedimento de extração. O solvente extrator deve ser escolhido com base na sua densidade, polaridade, capacidade de extração dos analitos de interesse e adequação à técnica analítica escolhida ( Zang *et al.*, 2009)

Com base em trabalhos presentes na literatura, que utilizam acetonitrila como eluente em cartuchos C18 impregnados com 2,4 DNPH, para determinação de CC (Anunciação *et al.*, 2012; Bastos e Pereira, 2010; da Silva e Pereira, 2008) e levando-se em consideração características como densidade (0,786g/L, inferior a do óleo de soja) e polaridade, a acetonitrila foi testada como solvente extrator nas amostras de óleo. Além da acetonitrila, foi também testado o metanol, com base em trabalhos da literatura (Seppanen e Csallany, 2006). Os resultados são mostrados em função do somatório das áreas dos picos na Figura 19.



**Figura 19.** Variação do sinal analítico em função do tipo do solvente extrator (acetonitrila e metanol)

A partir da Figura 19 é possível verificar que a acetonitrila teve uma capacidade de extração dos CC cerca de 50% maior que o metanol

A avaliação da acetonitrila com solvente extrator também foi realizada através de testes de eficiência de recuperação, descritos na seção 6.3.7.

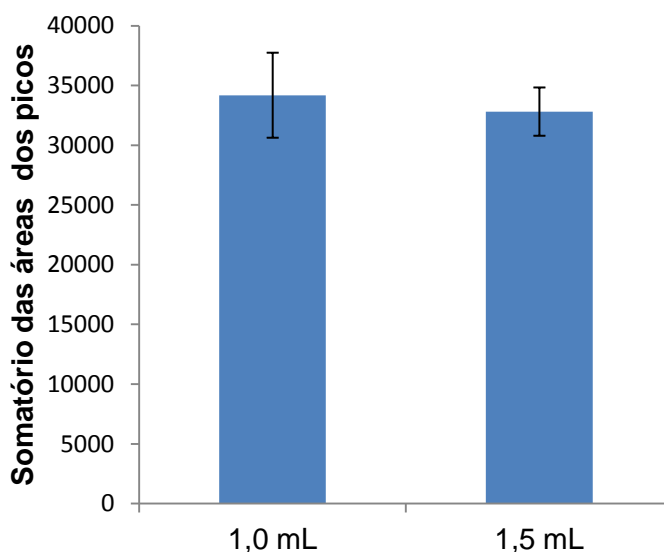
## 6.2.2 SELEÇÃO DO VOLUME DE SOLVENTE EXTRATOR

O volume do solvente extrator é uma importante variável a ser analisada, visto estar associado ao fator de pré-concentração e à eficiência da extração. Em geral, na ELL, usam-se grandes volumes de solvente, o que pode acarretar problemas ambientais, devido à grande quantidade de resíduo gerado. Contudo, como neste trabalho foram usadas pequenas massas de amostra (1g) os volumes de solvente testados também foram pequenos.

Para o teste de seleção do volume do solvente extrator, foram realizadas duas extrações sequenciais para cada volume testado. Para extração em aproximadamente 1 g de amostra fortificada com uma mistura padrão de  $8,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , que eram equivalentes a uma concentração no óleo de  $2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , foram usados volumes de 1 mL e 1,5 mL de acetonitrila. Na análise dos resultados, mostrados na Figura 20, sendo que os resultados expressos para o volume de 1 mL representa o somatórios das duas extrações sequências, e para o volume de 1,5 mL os resultados são apenas da expressos em termos da primeira extração, uma vez que

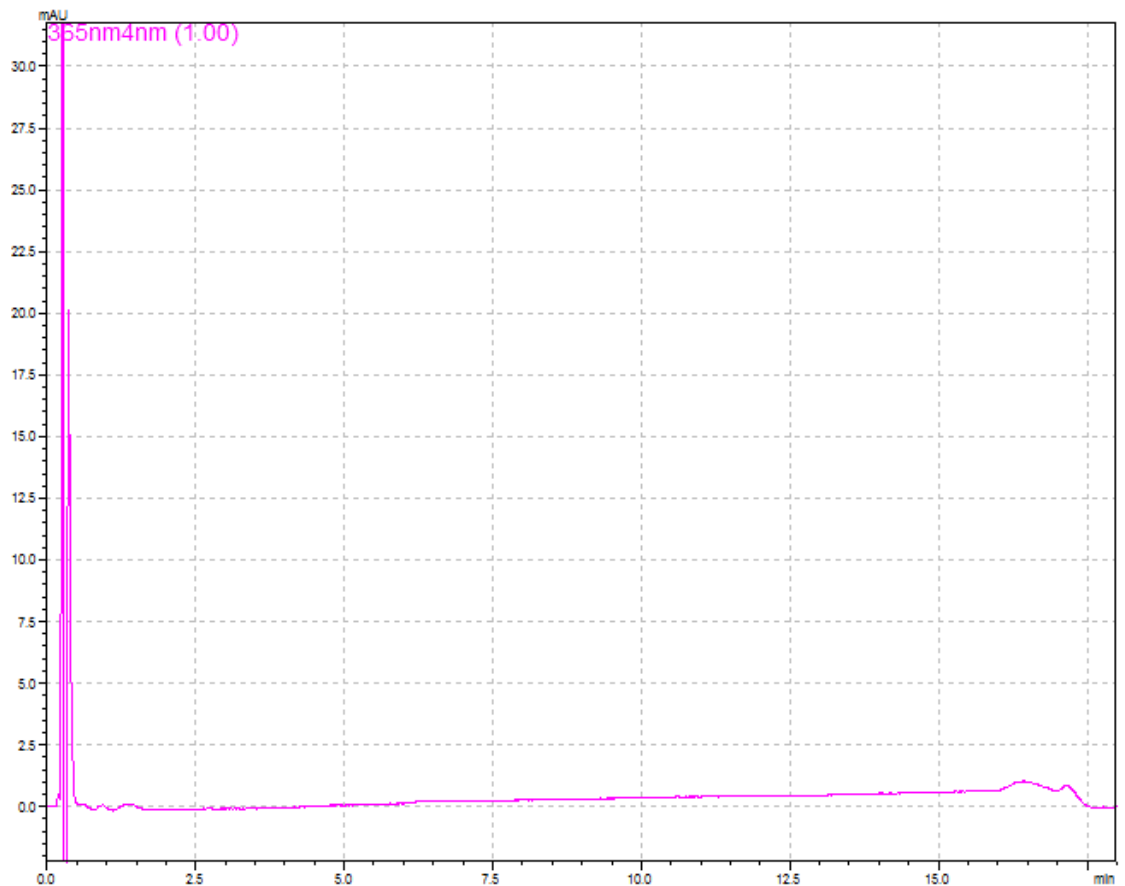
não foi identificados analitos na segunda extração. Verificou-se que não houve uma diferença significativa no somatório geral das áreas dos picos dos CC. Entretanto, a extração foi mais eficiente com o volume de solvente de 1,5 mL, visto que com o volume de 1mL do solvente extrator, na primeira extração foi possível verificar a presença de todos os analitos de interesse, enquanto que na segunda extração foi verificada a presença de alguns analitos, com baixa intensidade. A presença de alguns analitos na segunda extração pode ter ocorrido em função da saturação do solvente extrator na primeira extração. Entretanto, quando foi usado o volume de 1,5 mL do solvente extrator, para a mesma massa de amostra testada anteriormente, não foi identificada a presença dos analitos na segunda extração.

Com o intuito de reduzir o número de etapas no processo de extração, e evitar possíveis contaminações da amostra, optou-se por usar uma única extração, com 1,5 mL do solvente extrator. A Figura 21 mostra o cromatograma da segunda extração com volume de 1,5 mL de acetonitrila em uma amostra de óleo fortificada.



**Figura 20.** Variação do sinal analítico em função do volume do solvente extrator (acetonitrila)





**Figura 21.** Cromatograma da segunda extração (1,5 mL de acetonitrila) de uma amostra de óleo fortificada com uma mistura padrão de  $8,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

### 6.2.3 SELEÇÃO DO MODO, VELOCIDADE E TEMPO DE AGITAÇÃO

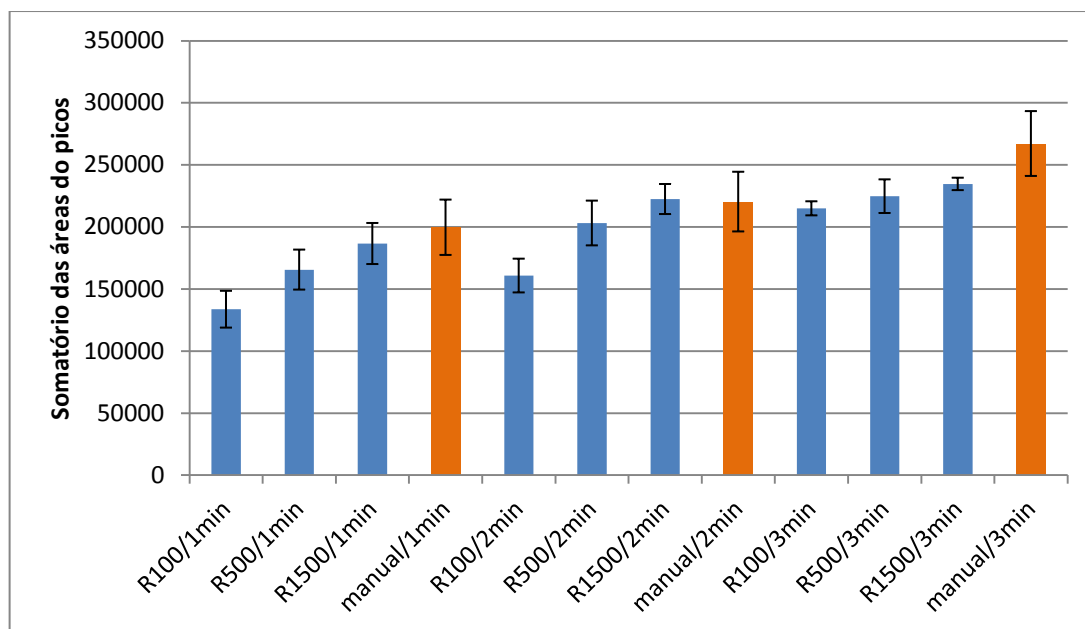
A otimização do procedimento de agitação é fundamental para a eficiência da extração, uma vez que influencia diretamente na velocidade na qual o processo alcança o equilíbrio, através da taxa de transferência de massa. Usualmente essa taxa de transferência de massa pode ser melhorada através da agitação (Menezes et al., 2010).

A agitação pode ser efetuada de forma mecânica ou manual, sendo que a agitação manual é a mais comumente utilizada em função de não haver custo e simplicidade. Outras técnicas, como a sonicação e vibração também são utilizadas, mas demandam dispositivos de custo mais elevado.

Neste estudo foram avaliados os modos de agitação manual e mecânica, com diferentes tempos de agitação (1, 2 e 3 minutos). Para o modo mecânico foi utilizado um aparelho de agitação do tipo vortex, que promove agitação através de

movimentos circulares. Neste modo de agitação, além dos diferentes tempos de agitação, também foram testadas diferentes velocidades (100, 500 e 1500 rpm). Para realização do teste de seleção do modo, velocidade e tempo de extração inicialmente foi adicionada acetonitrila à amostra, fortificada com uma alíquota da mistura dos padrões. Em seguida, as misturas foram submetidas aos diferentes modos de agitação e em sequência aplicou-se o procedimento descrito na seção 5.9.

Os resultados são mostrados na Figura 22, na forma de somatório das áreas dos picos dos padrões, em função das condições usadas na agitação.



**Figura 22.** Avaliação do modo, velocidade e tempo de agitação na extração dos CC em amostra de óleo vegetal, sendo R100, R500 e R1500, modo mecânico de agitação às velocidades de 100, 500 e 1500 rpm respectivamente.

A partir da análise da Figura 20 é possível verificar que de forma geral, no modo mecânico, a resposta analítica aumenta tanto com o tempo como com a velocidade, sendo o aumento mais acentuado com a velocidade. Esse fato ocorreu nos três tempos estudados, sendo que o efeito foi menos pronunciado no tempo de maior agitação, 3 minutos. Na agitação manual, também foi possível verificar o aumento da resposta analítica em função do aumento do tempo de agitação.

Comparando-se a eficiência de extração nos dois modos de agitação estudados, verificou-se, através das respostas analíticas, que o modo de agitação

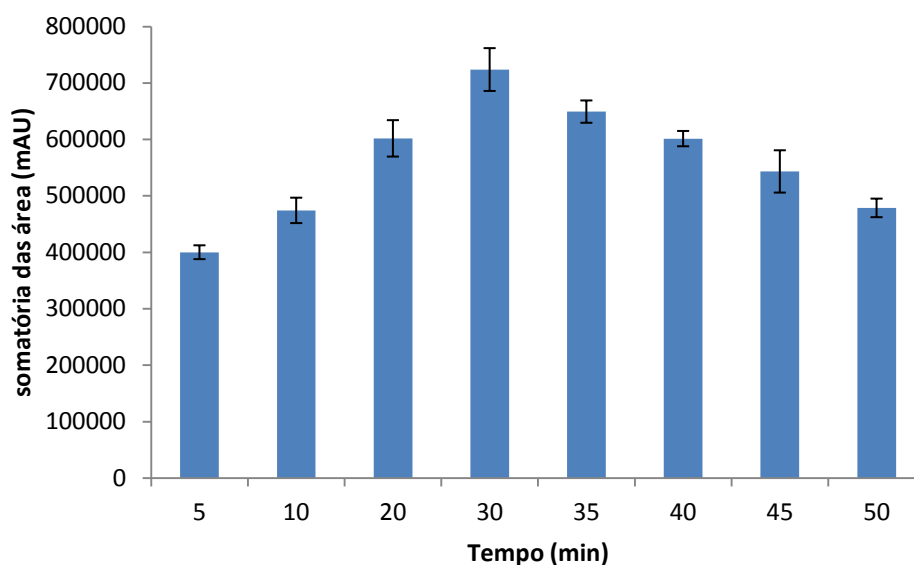
manual apresentou-se mais eficiente na extração dos CC em amostras de óleo que o modo de agitação mecânica. Sendo assim, a agitação manual por 3 minutos foi a selecionada.

#### **6.2.4 SELEÇÃO DO TEMPO DE SONICAÇÃO**

Uma das mais antigas e difundidas técnicas de derivatização de aldeídos e cetonas é a derivatização química utilizando a 2,4-dinitrofenilidrazina como agente derivatizante. Entretanto, um dos problemas associados a essa técnica está no tempo de reação (Vieira *et al.*, 2012). Com o intuito de reduzir o tempo de reação entre os CC presentes na matriz e a 2,4-DNPH, foi utilizada a energia do ultrassom no processo de derivatização.

Ultrassom são ondas mecânicas com frequência maior que 16kHz, que se propagam em ciclos de compressão e expansão através de qualquer meio material. Para fins analíticos, o ultrassom tem sido empregado em diferentes etapas de procedimentos de análise química, entre eles, podendo ser usado para promover o aumento da reatividade no meio reacional (Korn *et al.*, 2003).

Neste trabalho foi avaliada a utilização do ultrassom para acelerar a reação entre os CC e a 2,4-DNPH. Para tanto, amostras fortificadas foram submetidas ao procedimento de extração; em seguida, foi adicionada 2,4-DNPH ao extrato da amostra, sendo a mistura exposta a diferentes tempos de irradiação. Na Figura 23 são mostrados os resultados da variação do sinal do analito em função dos diferentes tempos da sonicação.



**Figura 23.** Variação do sinal analítico para as hidrazonas de CC em função do tempo de sonicação da solução.

De acordo com a Figura 23, fica evidente um aumento do sinal analítico até os 30 minutos, tempo no qual deve ocorrer por completo a reação entre todos os CC e a 2,4-DNHP presentes no meio. Entretanto, a partir de 30 minutos nota-se uma diminuição do sinal analítico, provavelmente em função da degradação das hidrazonas já formadas.

### 6.2.5 CONDIÇÕES OTIMIZADAS PARA A EXTRAÇÃO DOS CC DE ÓLEOS VEGETAIS

Após a avaliação dos resultados obtidos para cada parâmetro que influencia na determinação dos CC na matriz de óleo vegetal, foram estabelecidas as melhores condições, mostradas na Tabela 6 a seguir.

**Tabela 6.** Variáveis otimizadas e seus respectivos valores para a extração dos CC em óleos vegetais.

<b>Parâmetros avaliados</b>	<b>Condições otimizadas</b>
Solvente extrator	Acetonitrila
Volume do solvente extrator	1,5 mL
Modo e tempo de agitação	Manual por 3 minutos
Tempo de sonicação para a reação de derivatização	30 minutos

### 6.3 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação é um conjunto de ensaios que se destinam a verificar se um determinado método analítico é apto a produzir resultados confiáveis e adequados aos objetivos a que se propõe. É através da validação que se tem conhecimento das limitações e da confiabilidade das medidas obtidas na análise, por meio da metodologia desenvolvida (BRITO *et al.*, 2003).

A validação do método de extração, otimizado nas condições cromatográficas estabelecidas, foi realizada com o estudo do efeito da matriz, seletividade, faixas de trabalho, linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão intradia e interdia e a exatidão (RSD) pelo estudo da recuperação em diferentes níveis de fortificação e a recuperação absoluta. O objetivo da validação foi demonstrar que o procedimento analítico desenvolvido é adequado para a determinação de CC em amostras de óleos vegetais, antes e após aquecimento.

#### 6.3.1 EFEITO DA MATRIZ

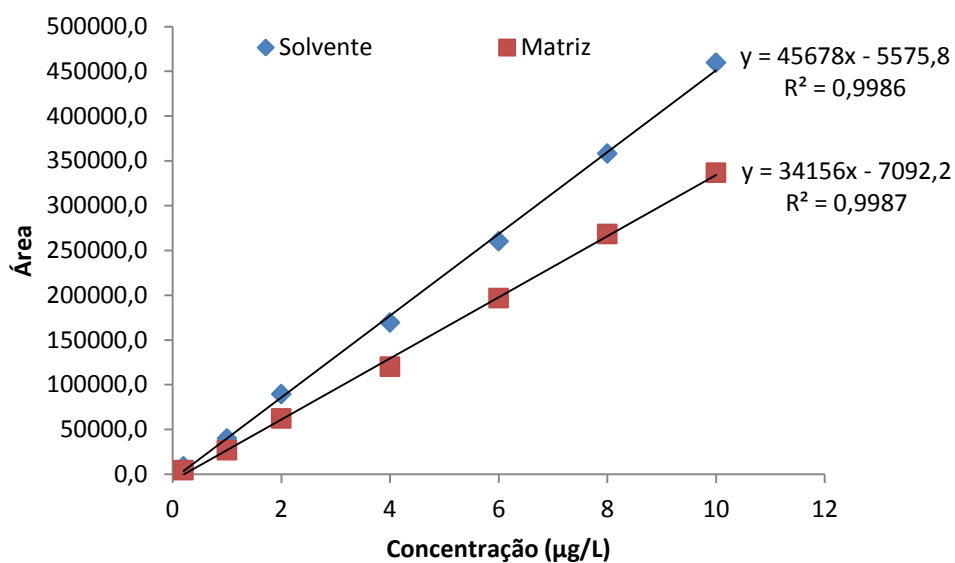
O efeito da matriz é um parâmetro de validação que tem por objetivo avaliar se os componentes da matriz interferem no sinal analítico. Essas interferências podem aumentar ou diminuir a resposta do detector ao analito, assim como também podem acarretar outros problemas na análise da amostra, como: mascaramento do pico de interesse, gerando resultado falso negativo ou falso positivo; erro na identificação do analito, pois componentes da matriz podem ser erroneamente

identificados como o analito de interesse; aumento no sinal do detector, levando a superestimação do resultado, ou diminuição no sinal do detector, levando a subestimação do resultado. O efeito de matriz pode ser pronunciado em amostras complexas, como frutas, vegetais, mel e óleos vegetais, entre outros (Kruve *et al.*, 2009; Pinto *et al.*, 2009)

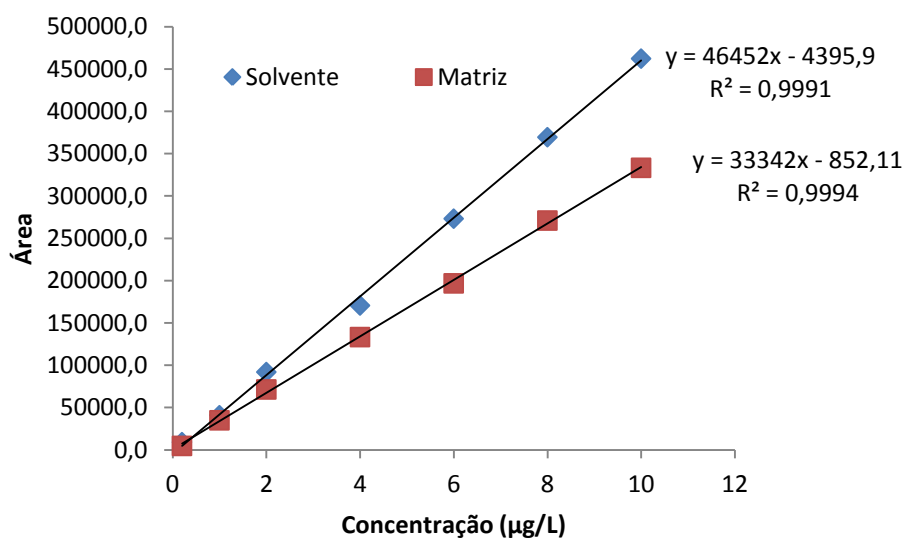
O efeito da matriz foi avaliado para todos os compostos de interesse identificados na amostra de óleo. Nas Figuras 24 e 25 são mostrados exemplos da influência da matriz na resposta analítica, para o HHE e acroleína. A diferença na inclinação das curvas analíticas, obtidas com soluções-padrão preparadas diretamente em solvente (acetonitrila) e preparadas no extrato da matriz foi em média de 24,3%, variando entre 33% (4,5-epoxi-2-decenal) e 20% (2-undecenal).

A natureza lipídica da matriz pode estar relacionada ao efeito da matriz, visto que algumas substâncias presentes nos óleos, tais como triacilgliceróis, fosfolipídios, clorofila, carotenoides e outros, podem ser solubilizados no extrato e interferir na resposta analítica (Hajslová e Zrostlpikova, 2003).

A construção da curva de calibração com os padrões dos analitos adicionados diretamente no extrato em branco da matriz, pode eliminar ou reduzir a sua influência por compensação. Portanto, todos os outros parâmetros de validação e as análises qualitativas e quantitativas, foram realizadas comparando-se com as curvas analíticas obtidas pela adição dos padrões diretamente no extrato em branco da matriz.



**Figura 24.** Variação da resposta analítica do HHE em solvente puro (ACN) e em extrato da matriz.

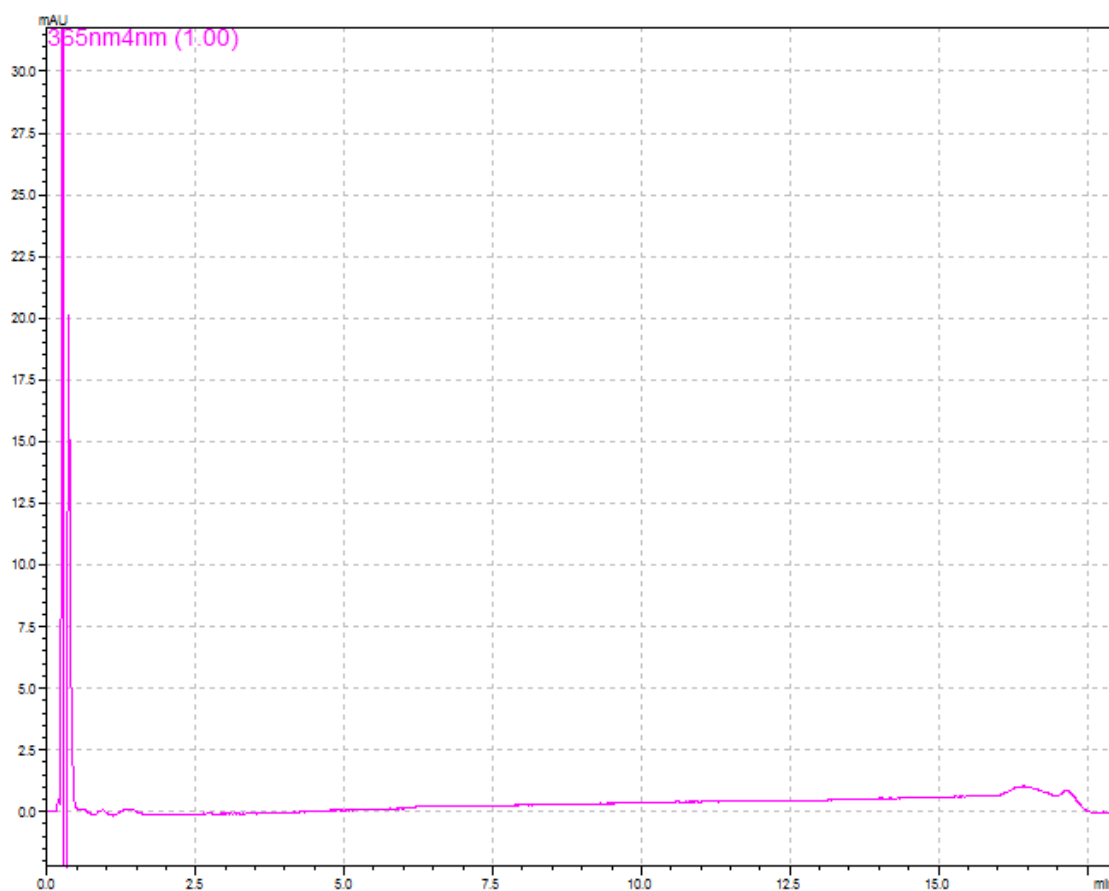


**Figura 25.** Variação da resposta analítica da acroleína em solvente puro (ACN) e em extrato da matriz.

### 6.3.2 SELETIVIDADE

Seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de outros componentes que possam interferir na determinação. A espécie de interesse deve ter o sinal analítico isento de interferências, que possam levar a erros na identificação ou dar margem à não confiabilidade dos resultados (Ribani, 2004; Leite, 2008).

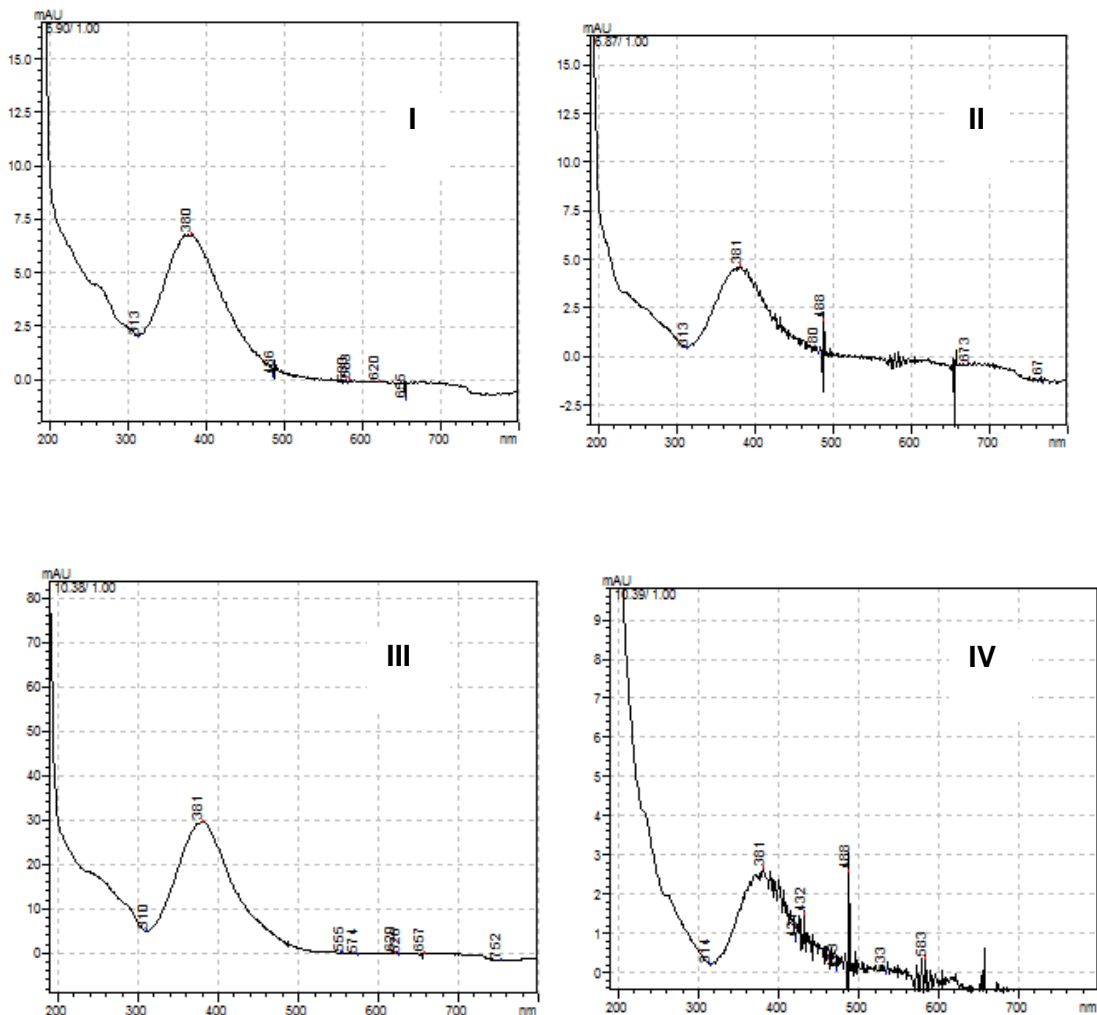
Neste trabalho a seletividade foi avaliada comparando-se um extrato da matriz sem adição dos compostos com um de matriz fortificada. Foi constatado que a matriz antes do aquecimento não apresentava substâncias interferentes, nos tempos de retenção dos compostos de interesse, o que pode ser observado no cromatograma da Figura 26, atestando assim, a seletividade do método analítico.



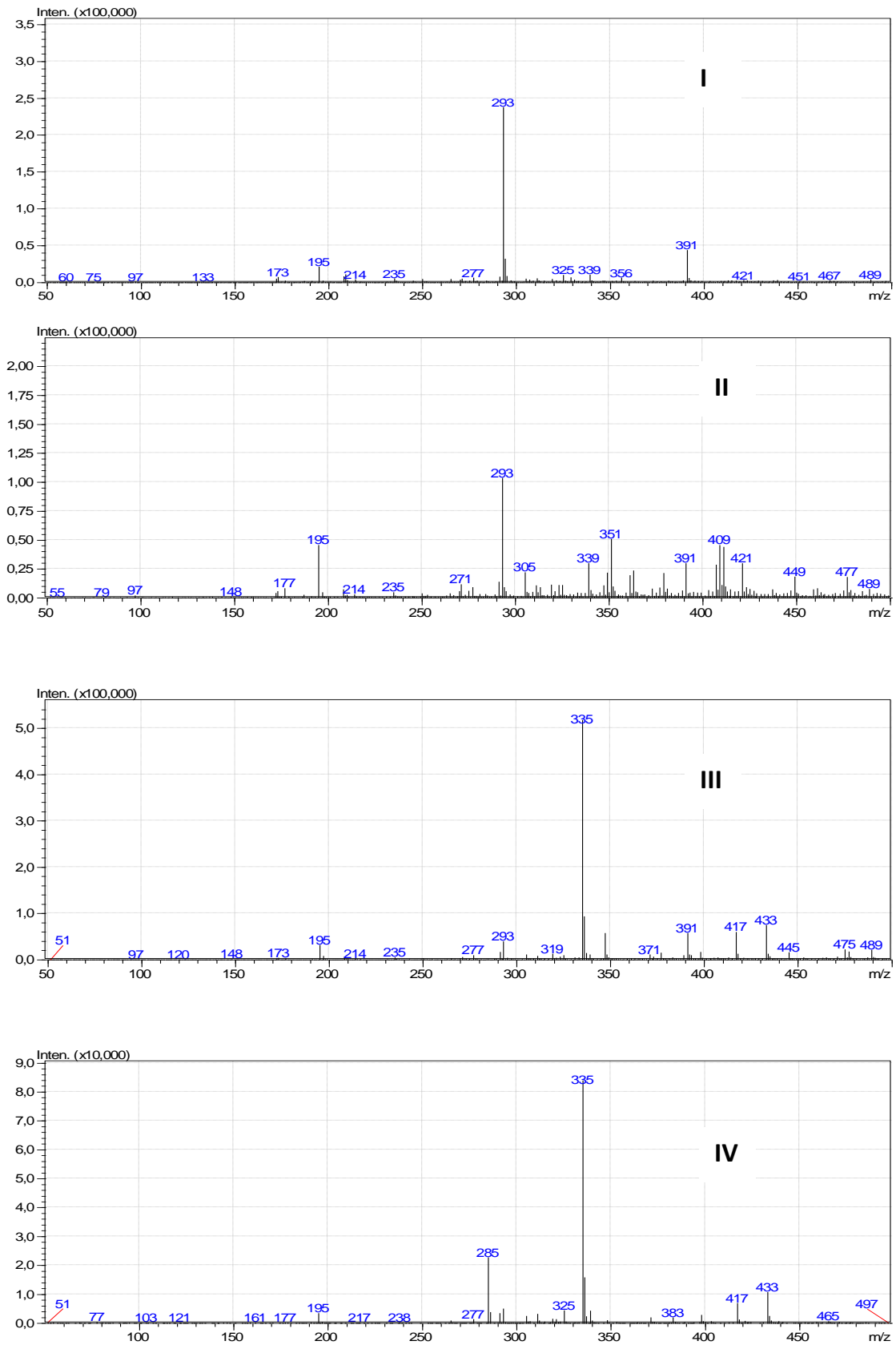
**Figura 26.** Cromatograma de uma amostra de óleo sem aquecimento isenta dos analitos de interesse.



Além da comparação entre a matriz isenta dos compostos de interesse e a matriz fortificada com os padrões, pode-se avaliar a seletividade pela “pureza” dos picos cromatográficos, isto é, comparando-se os espectros de absorção no UV, obtidos para os padrões puros, com os espectros obtidos para amostra. Essa comparação também pode ser feita com os espectros de massas. Por meio da similaridade entre os espectros, tanto de UV-visível como de massas, pode-se confirmar a seletividade do método para todos os analitos de interesse. Como exemplo, nas Figuras 27 e 28 são mostradas as comparações entre os espectros UV-visível e de massas para o 4-hidroxi-2-trans-hexenal e 4-hidroxi-2-trans-nonenal, obtidos no padrão puro e em uma amostra.



**Figura 27.** Espectros no UV-vis, sendo: I e III, espectros dos padrões de 4-hidroxi-2-trans-hexenal e 4-hidroxi-2-trans-nonenal, respectivamente; II e IV, espectros referentes aos picos do 4-hidroxi-2-trans-hexenal e 4-hidroxi-2-trans-nonenal em amostra de óleo aquecido.



**Figura 28.** Espectros de massas, sendo: I e III, espectros dos padrões de 4-hidroxi-2-trans-hexenal e 4-hidroxi-2-trans-nonanal, respectivamente; II e IV, espectros referentes aos picos do 4-hidroxi-2-trans-hexenal e 4-hidroxi-2-trans-nonanal em amostra de óleo aquecido.

### 6.3.3 LINEARIDADE E FAIXAS DE TRABALHO

Segundo Ribani e colaboradores (2004), linearidade é a capacidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. O alcance de um procedimento analítico pode ser determinado pela faixa ou intervalo de trabalho, que é a faixa entre a maior e menor concentração de analito no qual o método pode ser aplicado com boa precisão, exatidão e linearidade. A faixa de trabalho é normalmente expressa na mesma unidade do resultado obtido pelo método analítico.

Na construção da curva de analítica foram usadas concentrações de 0,2; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo feitas análises em triplicata para cada concentração. As curvas analíticas eram refeitas a cada 15 dias e a validade destas checada a cada jornada de trabalho a partir da injeção do padrão intermediário, com critério de aceitação de até 10% de desvio em relação à curva. Para isso, os padrões de hidrazonas foram adicionados a extratos obtidos do óleo sem a presença dos CC (primeira etapa do procedimento de extração descrito no item 5.10).

A partir das curvas analíticas foram obtidas as equações de retas e os coeficientes de determinação ( $R^2$ ), que se encontram descritos na Tabela 7. Todos os coeficientes de determinação obtidos foram superiores a 0,99, confirmando a linearidade do método de acordo com as normas da ANVISA. O método da padronização externa foi aplicado para a quantificação dos CC

**Tabela 7.** Equações das curvas de calibração, coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e faixas lineares de trabalho de cada CC para o método de determinação empregado.

CC	Equação de Regressão linear	$R^2$	Faixa e trabalho ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
HHE	$y = 34156x - 7092,2$	0,9987	0,2 -10
Acroleína	$y = 33342x - 8561,1$	0,9994	0,2 -10
4,5-Epoxi-2-decenal	$y = 28717x - 3771,1$	0,9991	0,2 -10
HNE	$y = 29926x - 1777,1$	0,9988	0,2 -15
2,4Heptadienal	$y = 21872x - 5920,4$	0,9975	0,2 -10
2-Heptenal	$y = 26024x - 6235,4$	0,9976	0,2 -10
2-Octenal	$y = 25257x - 6146,4$	0,9980	0,2 -10
2,4-Decadienal	$y = 29080x - 5231,1$	0,9988	0,2 -15
2-Decenal	$y = 12561x - 1974,8$	0,9993	0,2 -10
2-Undecenal	$y = 18344x - 1099,1$	0,9987	0,2 -10

#### 6.3.4 SENSIBILIDADE

De acordo com o INMETRO (2007), a sensibilidade é um parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito e que pode ser expressa pela inclinação da curva de calibração. A sensibilidade varia de um analito para outro em função da eficiência do método de extração, da própria natureza do analito e do sistema de detecção.

A sensibilidade é expressa pela inclinação da reta, obtida por regressão linear no estudo da linearidade. A sensibilidade foi calculada pela relação  $S = dx/dc$ , onde  $S$  é a sensibilidade,  $dx$  é a variação da resposta analítica e  $dc$  é a variação da concentração (Brito *et al.*, 2003). A sensibilidade foi avaliada para um intervalo de concentração de 0,2 a 10,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A Tabela 8 mostra os valores obtidos para  $S$  no intervalo de concentração estabelecido.

**Tabela 8.** Estudo da sensibilidade do método empregado.

<b>CC</b>	<b>S</b>
HHE	33890,4
Acroleína	33523,1
4,5-Epoxi-2-decenal	28654,2
HNE	29273,9
2,4Heptadienal	21270,7
2-Heptenal	26205,3
2-Octenal	24812,5
2,4-Decadienal	28820,2
2-Decenal	12514,4
2-Undecenal	18420,2

De acordo com a Tabela 8 os valores obtidos para **S** variaram de 12514,4 (2-decenal) a 33890,4 (HHE). O método apresenta melhor sensibilidade para o HHE e acroleína, fato concordante com coeficientes angulares das equações de reta que são maiores para estes compostos. Isto significa que pequenas variações na concentração (x) geram maiores variações no sinal analítico medido (Y) para esses compostos.

### **6.3.5 LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO (LOD E LOQ)**

Segundo Ribani (2004) O limite de detecção se refere à menor concentração do analito em uma amostra que é capaz de gerar um sinal analítico detectável, mas que não necessariamente possa ser quantificado, a partir da utilização de uma metodologia analítica. O LD pode ser calculado através de diferentes técnicas: método visual, método sinal-ruído ou método baseado em parâmetros da curva analítica. O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. O LQ também pode ser calculado através dos mesmos critérios adotados para o LD (Ribani *et al.*, 2004).

Neste trabalho os limites de detecção e quantificação foram determinados com base no método visual, utilizando-se uma solução padrão preparada no extrato, em que foi possível distinguir ruído e sinal analítico pela visualização da menor concentração detectável. Para os cálculos de LD e LQ, foram utilizadas as expressões I e II a seguir, em que  $s$  é o desvio padrão do coeficiente linear da equação da curva analítica, e  $S$  é o coeficiente angular da curva analítica. Os limites de quantificação, calculados de acordo com a equação II, são mostrados na tabela 9. Todavia, na prática, os LQ foram assumidos como o menor nível de concentração na curva analítica para cada composto. Os limites de detecção e de quantificação obtidos pelo método proposto são mostrados na Tabela 9.

$$LD = \frac{3,3 s}{S} \quad \text{I}$$

$$LQ = \frac{10 s}{S} \quad \text{II}$$

**Tabela 9.** Limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ).

CC	LD ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	LQ Teórico ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	LQ Prático ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
HHE	0,06	0,20	0,2
Acroleína	0,07	0,23	0,2
4,5-Epoxi-2-decenal	0,08	0,26	0,2
HNE	0,1	0,33	0,2
2,4Heptadienal	0,05	0,18	0,2
2-Heptenal	0,08	0,27	0,2
2-Octenal	0,05	0,18	0,2
2,4-Decadienal	0,06	0,19	0,2
2-Decenal	0,03	0,14	0,2
2-Undecenal	0,07	0,22	0,2

### 6.3.6 PRECISÃO DO MÉTODO

Segundo Leite (2008), a precisão de um método pode ser definida como sendo a concordância entre os valores experimentais obtidos, ou seja, quanto menor a amplitude destes valores em relação à média entre eles, maior a sua precisão. Para se determinar a precisão de um conjunto de dados, podemos calcular o desvio destes em relação à sua média aritmética, ou seja, a estimativa do desvio-padrão relativo (RSD) ou coeficiente de variação (CV) (LEITE, 2008):

As duas formas mais comuns de expressar a precisão são por meio da repetibilidade e a reprodutibilidade. A repetibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas, efetuadas sob as mesmas condições de medição, que podem ser realizadas no mesmo dia (repetibilidade intradia) ou em dias diferentes (repetibilidade interdias). A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados de medidas efetuadas sob condições variadas de medição, tais como, resultados de ensaios obtidos com o mesmo método, variando-se laboratórios, operadores ou equipamentos (INMETRO, 2007).

Neste trabalho, a precisão do método foi avaliada com o estudo da repetibilidade, realizando-se cinco extrações em três níveis de concentração: 0,2, 4,0 e 10,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  no mesmo dia (precisão intradia) e durante cinco dias consecutivos (precisão interdias). Os coeficientes de variação obtidos no estudo da precisão intradia e interdia podem ser verificados nas Tabelas 10 e 11, respectivamente.

**Tabela 10.** Coeficientes de variação (%) obtidos no estudo da precisão intradia

CC	Nível de fortificação 0,2 µg.mL <sup>-1</sup>	Nível de fortificação 4,0 µg.mL <sup>-1</sup>	Nível de fortificação 10,0 µg.mL <sup>-1</sup>
HHE	3,2	3,3	3,2
Acroleína	6,5	5,5	5,8
4,5-Epoxi-2-decenal	3,7	7,0	3,1
HNE	5,6	3,3	4,9
2,4Heptadienal	6,2	3,9	3,8
2-Heptenal	4,4	4,6	4,2
2-Octenal	5,5	6,3	5,3
2,4-Decadienal	7,9	9,5	7,4
2-Decenal	4,7	7,0	8,7
2-Undecenal	7,3	9,2	9,1

Os CV na precisão intradia variaram de 3,1% (4,5-epoxi-2-decenal) a 9,5% (2,4-decadienal) e para a precisão interdia variaram de 4,8% (acroleína) a 13,6% (2-undecenal). Os CV determinados neste estudo denotam uma boa precisão da técnica, visto que os valores estão abaixo dos critérios de validação descritos por Ribani *et al.*, (2004) que estabelecem CV de até 20% para traços, dependendo da complexidade da amostra. Tanto para a precisão intradia como a interdia, foram obtidos coeficientes de variação menores que 14%, comprovando assim que o método é preciso, e não somente quando os ensaios são realizados no mesmo dia.



**Tabela 11.** Coeficientes de variação (%) obtidos no estudo da precisão interdia

CC	Nível de fortificação 0,2 µg.mL <sup>-1</sup>	Nível de fortificação 4,0 µg.mL <sup>-1</sup>	Nível de fortificação 10,0 µg.mL <sup>-1</sup>
HHE	6,7	4,9	9,3
Acroleína	4,8	5,4	7,8
4,5-epoxi-2-decenal	7,7	9,5	6,5
HNE	6,2	8,6	7,6
2,4Heptadienal	11,5	13,2	10,7
2-Heptenal	8,1	8,4	12,1
2-Octenal	9,8	7,0	8,2
2,4-Decadienal	9,8	8,9	7,2
2-Decenal	9,1	12,1	10,2
2-Undecenal	13,6	12,9	9,1

### 6.3.7 EXATIDÃO

A exatidão de um método pode ser definida como o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência, aceito como verdadeiro (Ribani *et al.*, 2004). Dentre os procedimentos mais empregados para determinar a exatidão de um método, podemos citar o emprego de materiais de referência, a determinação da recuperação dos analitos, quando adicionados em uma concentração conhecida à matriz e a comparação com um método padrão de referência.

A exatidão do método desenvolvido foi avaliada realizando-se o estudo da recuperação, que foi feito a partir da comparação das respostas da curva analítica (obtida através da adição dos padrões ao extrato do óleo) com a resposta da extração de amostras fortificadas com padrões de aldeídos (exceto para HHE, acroleína e 4,5-epoxi-2-decenal, em que o padrão adicionado à amostra já estava na forma de hidrazona). As recuperações foram avaliadas em três níveis de fortificação (0,2; 4,0 e 10,0 µg.mL<sup>-1</sup>).

Na Tabela 12 são apresentados os resultados das recuperações, obtidas nos diferentes níveis concentrações. No menor nível de fortificação as recuperações variaram entre 70,7% (2-Undecenal) e 85,0% (HHE), com desvio padrão relativo variando ente 3,3 a 7,9%. No nível intermediário de fortificação as recuperações variaram de 70,3% (2-Undecenal) a 86,5% (HHE), com desvio padrão relativo variando de 2,9% a 9,8%. E no maior nível de fortificação as recuperações variaram entre 70,4 (2-Octenal) a 87,7% (HHE), com desvio padrão relativo variando ente 2,3 a 9,5%. As recuperações para todos CC analisados nos diferentes níveis de fortificação estão dentro do intervalo de valores aceitáveis, de 70 a 120% (Ribani *et al.*, 2004).

**Tabela 12.** Recuperações relativas e RSD(%) em diferentes níveis de fortificação.

CC	Nível de fortificação ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Recuperação (%) n=3	RSD (%)
HHE	0,2	85,0	5,4
	4,0	86,5	4,7
	10,0	87,7	4,9
Acroleína	0,2	78,1	4,5
	4,0	85,0	3,6
	10,0	87,6	5,2
4,5-epoxi-2-decenal	0,2	81,6	4,7
	4,0	85,7	3,1
	10,0	85,5	6,3
HNE	0,2	76,1	3,3
	4,0	79,8	2,9
	10,0	77,4	2,3
2,4Heptadienal	0,2	74,9	6,2
	4,0	79,7	3,9
	10,0	80,9	3,8
2-Heptenal	0,2	78,1	4,4
	4,0	76,3	4,6
	10,0	74,6	4,2
2-Octenal	0,2	74,5	5,5
	4,0	76,4	6,3
	10,0	70,4	5,3
2,4-Decadienal	0,2	73,1	7,9
	4,0	77,4	9,5
	10,0	72,2	7,4
2-Decenal	0,2	78,8	4,7
	4,0	78,1	7,0
	10,0	74,2	8,7
2-Undecenal	0,2	70,7	7,3
	4,0	70,3	9,8
	10,0	77,9	9,5

## 6.4 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS PRESENTES NO ÓLEO DE SOJA AQUECIDO

A oxidação dos ácidos graxos insaturados dos óleos vegetais resulta na formação de hidroperóxidos que sofrem transformações químicas em uma variedade de rearranjos, formando alcoóis, compostos carbonílicos, hidrocarbonetos e monômeros cíclicos. Dentre os compostos formados na oxidação, aldeídos têm sido descritos como os mais importantes marcadores na determinação da rancidez oxidativa de óleos (Choe e Min, 2007; Araujo, 2008)

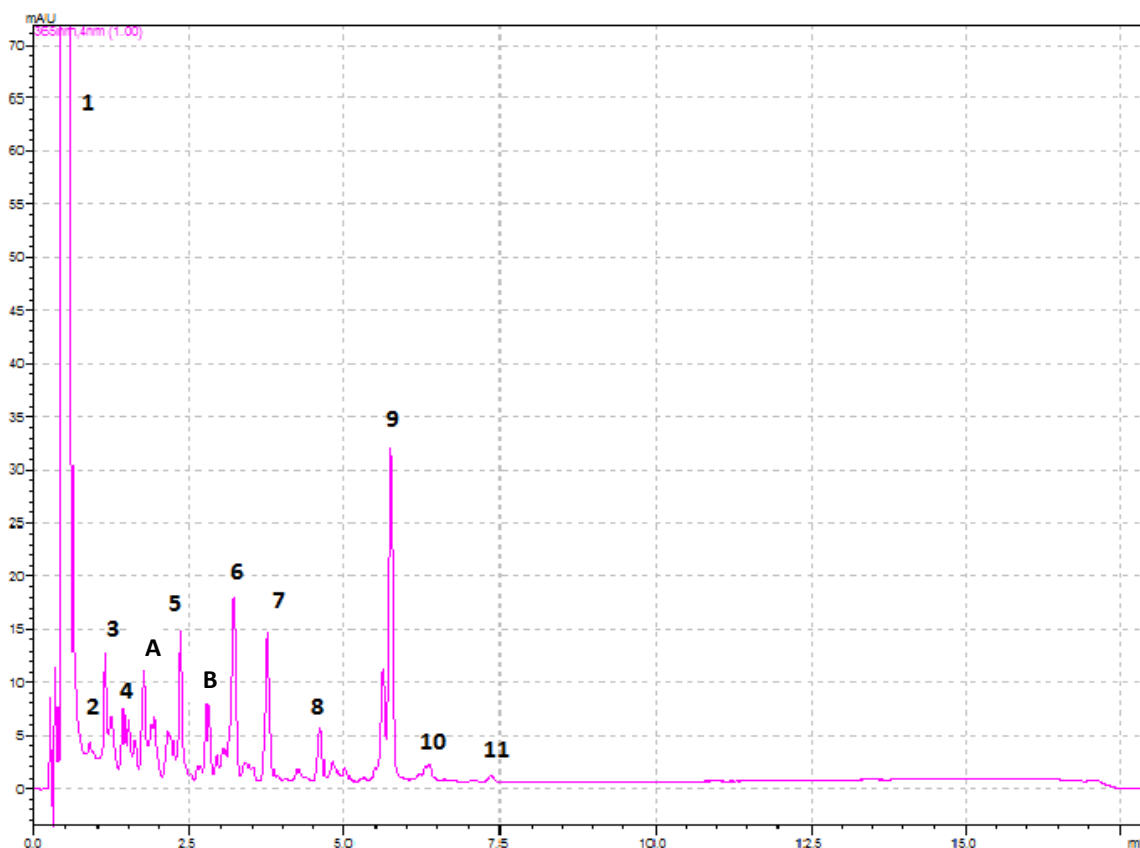
Os compostos carbonílicos, geralmente, não são identificados diretamente em matrizes alimentícias. Ao invés disso, normalmente as análises requerem procedimentos de extração e/ou pré-concentração, seguidos ou não por processos de derivatização (Bastos e Pereira 2010). Os aldeídos de baixa e média massa molar são altamente voláteis e reativos; tais características dificultam sua determinação direta, fazendo com que sua determinação por métodos indiretos, por meio de reações de derivatização, seja mais usada. As principais reações de derivatização são as que envolvem a adição de um agente nucleofílico ao carbono da carbonila para formar produtos estáveis (Vieira et al., 2012)

A 2,4-dinitrofenilidrazina (2,4-DNPH) tem sido um dos derivatizantes mais utilizados, devido à sua alta especificidade, rapidez de reação à temperatura ambiente e alta estabilidade dos produtos formados. As hidrazonas formadas são comumente determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência, com sistema de detecção por UV-visível, ou por espectrometria de massas com ionização por fonte tipo eletrospray (da Silva e Pereira, 2008). Cromatografia gasosa também pode ser usada, porém com limitações no que diz respeito à baixa volatilidade e instabilidade térmica dos derivados. Desta forma, neste trabalho escolheu-se a 2,4-DNPH como reagente derivatizante e procedeu-se a análise das hidrazonas dos CC por cromatografia líquida com detectores de arranjo de fotodiodo e espectrometria de massas.

O método cromatográfico aplicado consistiu em um sistema de eluição com gradiente de solvente, em que foi possível a separação de hidrazonas de CC, formadas durante o processo de aquecimento do óleo.

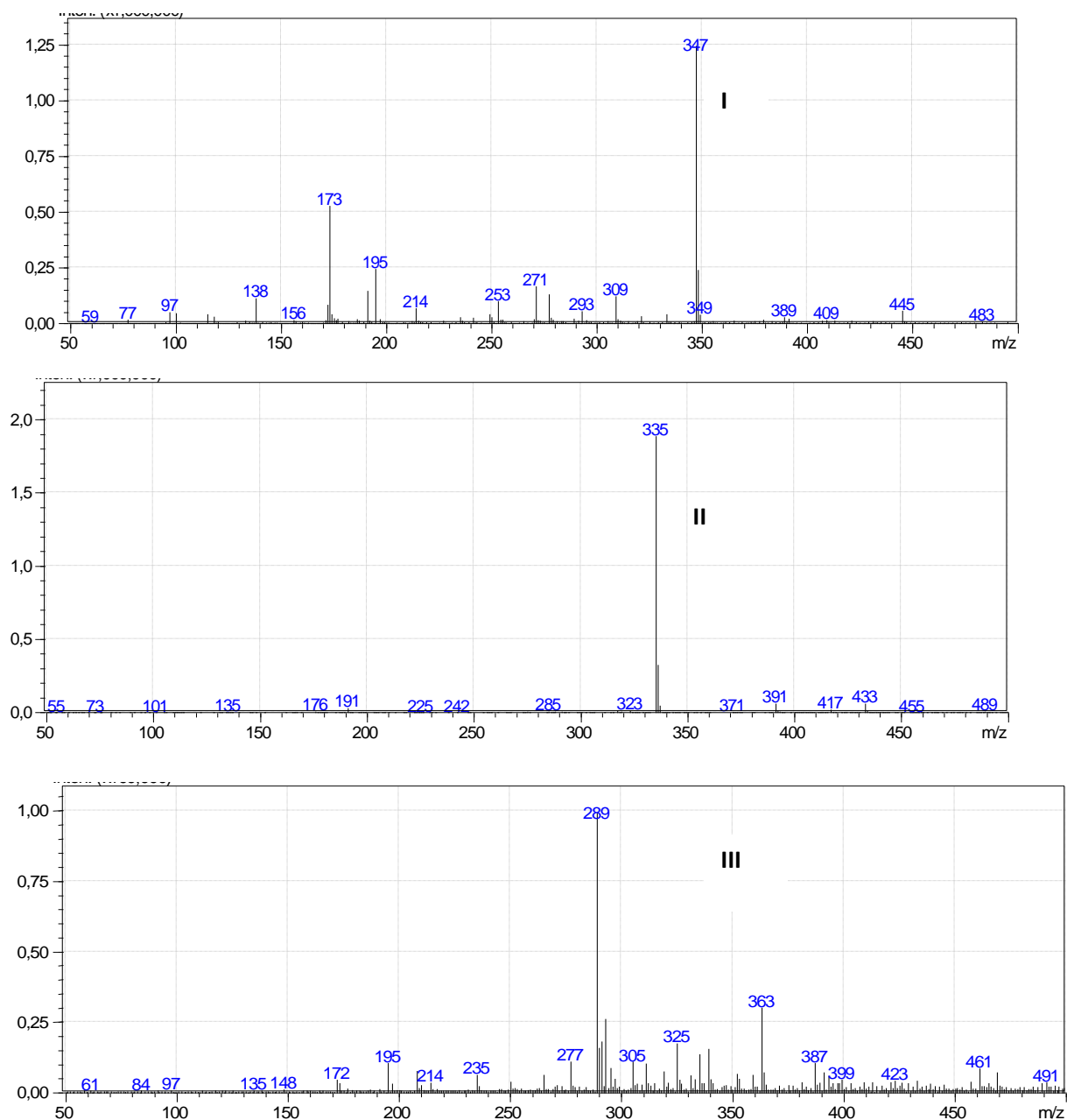
Os CC mais abundantes foram identificados logo na primeira hora de aquecimento e tiveram suas taxas de emissão acompanhadas no decorrer do tempo.

A identidade dos CC assinalados no cromatograma foi confirmada comparando-se os tempos de retenção dos picos cromatográficos nas amostras com aqueles obtidos pela injeção de padrões, em diferentes níveis de concentração, e através da espectrometria de massas no modo de ionização negativa, por confirmação do íon  $[M-H]^-$ . Como exemplo, a Figura 29 a seguir apresenta um cromatograma obtido para amostra de óleo de soja após uma hora de aquecimento contínuo, enquanto a Figura 30 apresenta os espectros de massas de alguns CC determinados no óleo. Os espectros dos demais CC identificados nas amostras, são mostrados no Anexo A, Figura 1.



**Figura 29:** Cromatograma de hidrazonas de CC, referente à amostra de óleo coletada após 1 h de aquecimento contínuo. Identificação dos picos, 1: 2,4-DNPH; 2: 4-hidroxi-2-hexenal; 3: acroleína; 4: 4,5-epoxi-2-decenal; 5: 4-hidroxi-2-nonenal; 6: 2,4-heptadienal; 7: 2-heptenal; 8: 2-octenal; 9: 2,4-decadienal; 10: 2-decenal; 11: 2-undecenal; A: dihidroxi-decenal; B: hidroxi-decadienal

Os compostos assinalados no cromatograma como A e B não puderam ter a sua identificação confirmada por falta de padrões. Entretanto, a partir dos seus íons  $[M-H]^-$  de massas iguais a 365 e 347, supõe-se que os mesmos possam ser um dihidroxi-decenal e um hidroxidecadienal.



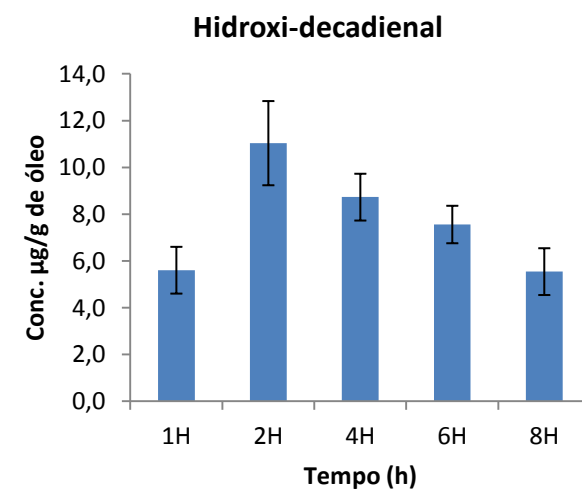
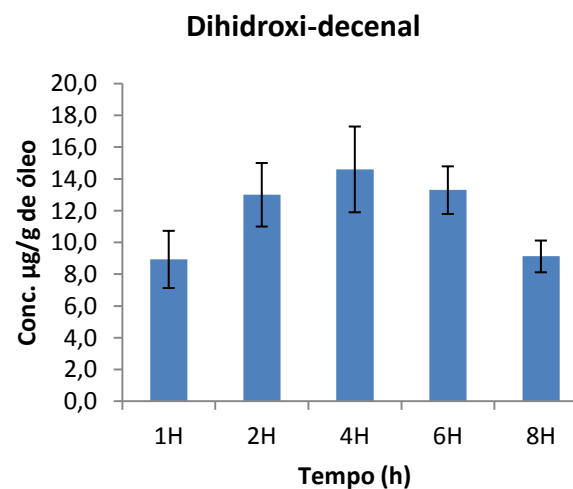
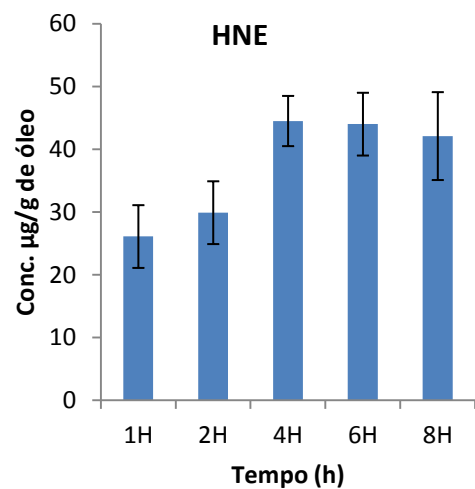
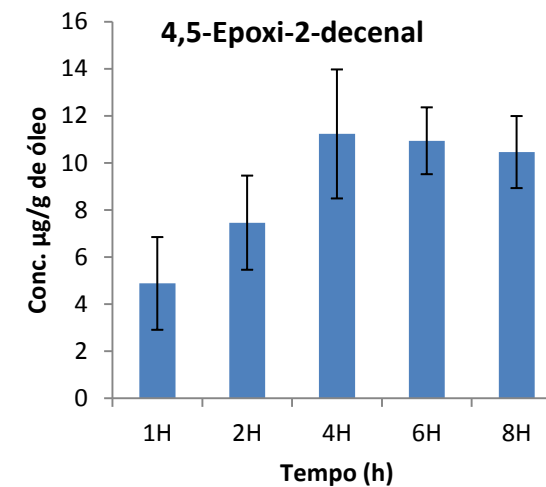
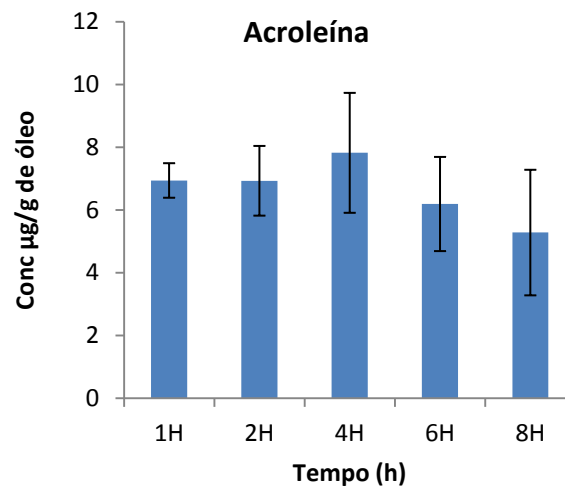
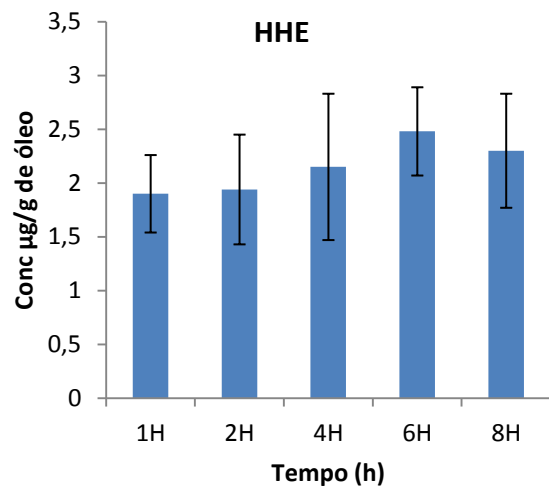
**Figura 30.** Espectros de massas referentes às hidrazonas do 4,5-epoxi-2-decenal (I), HNE (II) e 2,4-heptadienal (III), no modo de ionização negativa. O íon de maior abundância refere-se ao  $[M-H]^-$ .

## **6.5 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS CARBONÍLICOS EM ÓLEO DE SOJA, EM FUNÇÃO DO TEMPO DE AQUECIMENTO (SEM ADIÇÃO DE METAIS)**

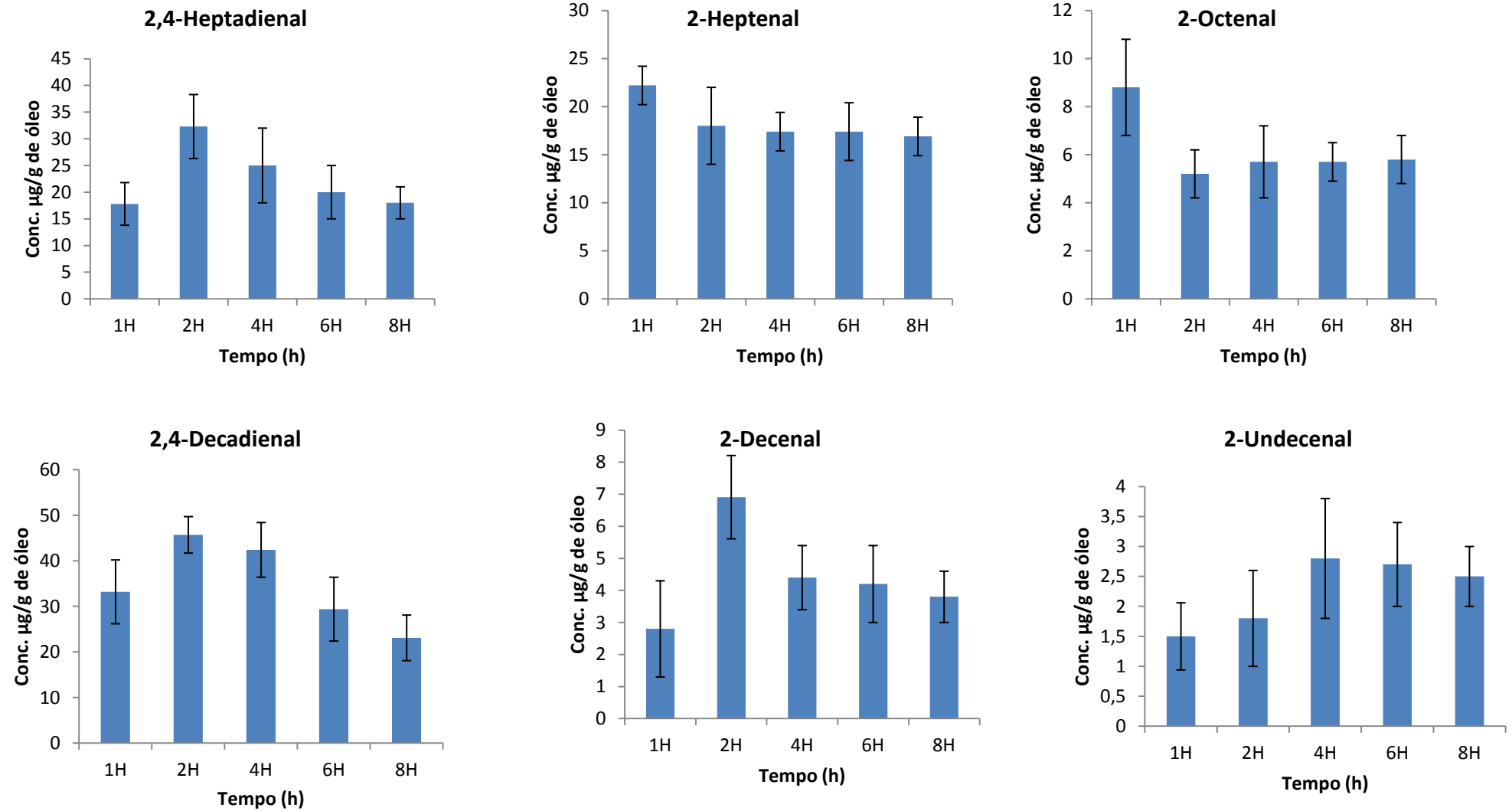
O método proposto neste estudo foi aplicado na análise de amostras de óleo de soja, submetido a aquecimento contínuo em diferentes intervalos de tempo, para determinação de compostos carbonílicos. Os CC identificados e quantificados na fração líquida do óleo aquecido foram: acroleína, 2-heptenal, 2,4-heptadienal, 2-octenal, 2,4-decadienal, 2-decenal, 2-undecenal, 4-hidroxi-2-hexenal, 4-hidroxi-2-nonenal e 4,5-epóxi-2-decenal. Os CC “A” e “B”, os quais supõe-se tratarem-se de um dihidroxi-decenal e um hidroxi-decadienal, foram quantificados com base na curva de calibração do 4-hidroxi-2-nonenal, por tratar-se este também de um hidroxi-aldeído insaturado.

As concentrações dos CC formados, em função dos diferentes tempos de aquecimento, podem ser verificadas na Figura 31 (Tabela 1 do anexo B). Os diferentes perfis de concentração dos CC estão relacionados às suas rotas de formação, a partir da oxidação dos ácidos graxos de que são derivados; e da sua decomposição ao longo do período de aquecimento.

Dos compostos determinados, percebe-se que a maioria teve suas concentrações máximas nos tempos de 2 e 4 horas de aquecimento, seguida da diminuição da concentração (acroleína, 4,5-epoxi-2-decenal, HNE, 2,4-heptadienal, 2,4-decadienal, 2-decenal, 2-undecenal, dihidroxi-decenal e hidroxi-decadienal), com exceção de 2-heptenal e 2-octenal (máximo da concentração em 1 hora de aquecimento) e HHE (máximo da concentração em 6 horas de aquecimento). Isto sugere o intervalo entre 2 e 4 horas de aquecimento como o período crítico para a oxidação térmica dos óleos vegetais. A partir daí, a diminuição da concentração dos CC após o seu máximo pode indicar que estejam ocorrendo reações de degradação ou polimerização dos CC, com formação de outros composto, que podem ter maior toxicidade que os compostos de origem.



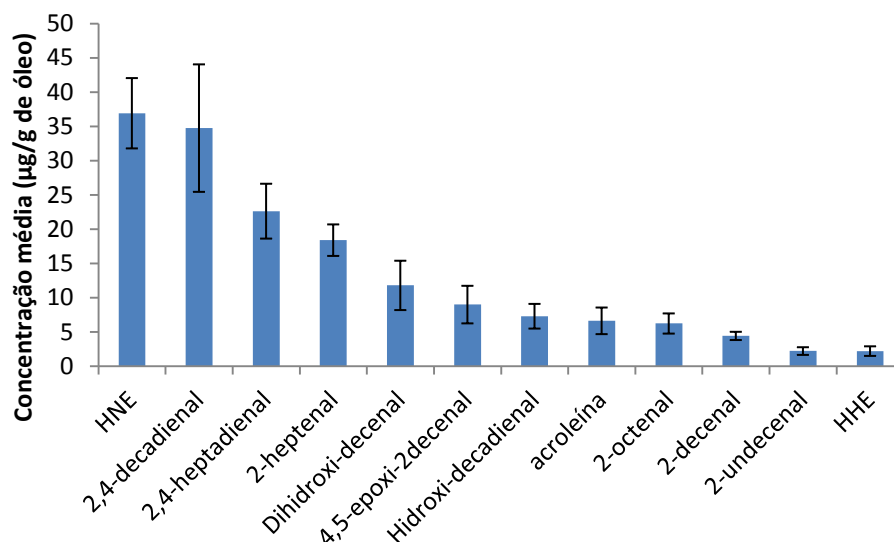
**Figura 31.** Perfis de concentração dos CC formados pelo óleo de soja nos diferentes tempos de aquecimento estudados.



**Figura 31.** Perfis de concentração dos CC formados pelo óleo de soja nos diferentes tempos de aquecimento estudados (continuação).



Na Figura 32 são mostradas as concentrações médias para os CC determinados nesse estudo, sendo os valores referentes às cinco amostragens (em triplicata) realizadas ao longo do experimento.



**Figura 32.** Perfil de concentrações médias dos CC identificados no óleo de soja, referentes à media das cinco amostras coletadas ao longo de oito horas de aquecimento.

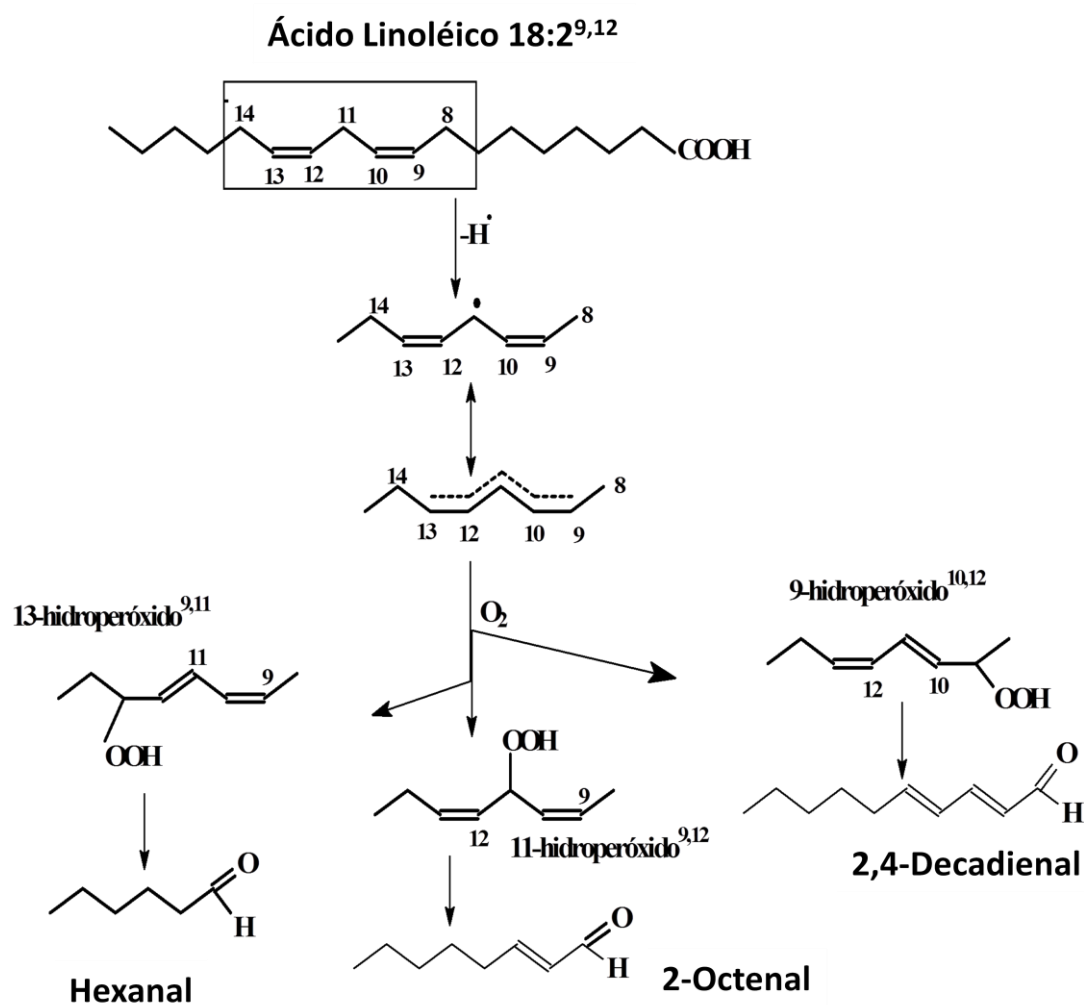
Observa-se que, dentre os CC quantificados o HNE foi o composto que apresentou a maior concentração média ( $36,9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de óleo) seguida por 2,4 decadienal e o 2,4-heptadienal. Chama-se atenção para o fato de que o HHE, outro hidroxialdeído  $\alpha$ ,  $\beta$  - insaturado relatado na literatura como composto de alta toxicidade, apresentou, por outro lado, a menor concentração média ( $2,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de óleo).

O HNE apresentou a maior concentração em 4 horas de aquecimento, cerca de  $44,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de óleo, seguido de uma diminuição nos tempos posteriores. Este resultado está de acordo com os estudos de Seppanen e Csalany (2002), que determinaram HNE em óleo de soja aquecido a  $185^\circ\text{C}$  por 8 horas, encontrando uma concentração máxima de HNE de  $42,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de óleo, em 6 horas de aquecimento, seguido também de uma diminuição da concentração. Segundo Seppanen e Csalany, a diminuição da concentração do HNE ocorre possivelmente devido a degradação do CC por oxidação térmica. O HNE pode ser formado durante a peroxidação do ácido linoléico; uma rota de formação do HNE através da oxidação

lipídica do ácido linoléico foi proposta por Schneider e colaboradores (Figura 13 da seção 2.3.3).

O HNE é um hidroxialdeído que possui alta toxicidade em função da sua alta reatividade, podendo reagir com as quatro bases do DNA e formar adutos que podem levar à inibição da síntese do DNA ou a sua recombinação, ocasionando mutações, o HNE também é capaz de reagir com proteínas para formar biomoléculas modificadas, que podem interromper importantes funções celulares e induzir mutações (Uchida, 2003). Devido ao seu caráter lipofílico e à baixa volatilidade, este composto permanece na fase líquida do óleo, sendo absorvido, posteriormente, pelos alimentos nele preparados. Por ser altamente reativo, pode gerar riscos à saúde do homem, como a pré-disposição à arteriosclerose e a probabilidade de ocasionar mutações e câncer (Uchida 2003; Seppanen e Csallany, 2006).

O 2,4-decadienal foi o composto que apresentou a segunda maior concentração média ( $34,7\mu\text{g.g}^{-1}$  de óleo). O 2,4-decadienal já foi identificado em outros estudos sobre oxidação lipídica em óleos vegetais (Guillen e Uriarte, 2012; Guillen e Giocoechea, 2008 e Boskou *et al.*, 2006), sendo sua identificação motivo de preocupação, visto que estudos tem relatado o seu alto potencial tóxico. O 2,4-decadienal tem sido associado ao desenvolvimento de adenocarcinoma no pulmão de mulheres, devido à sua exposição à fumaça de óleos utilizados em frituras, e adenocarcinoma no trato gastrointestinal, devido ao consumo de alimentos fritos (Boskou *et al.*, 2006 e Chang *et al.*, 2005). O 2,4-decadienal, teve sua concentração máxima determinadas em 2 horas de aquecimento, com  $45,7\mu\text{g.g}^{-1}$  de óleo. Um via de formação para o 2,4-decadienal pode ser verificada na Figura 33.



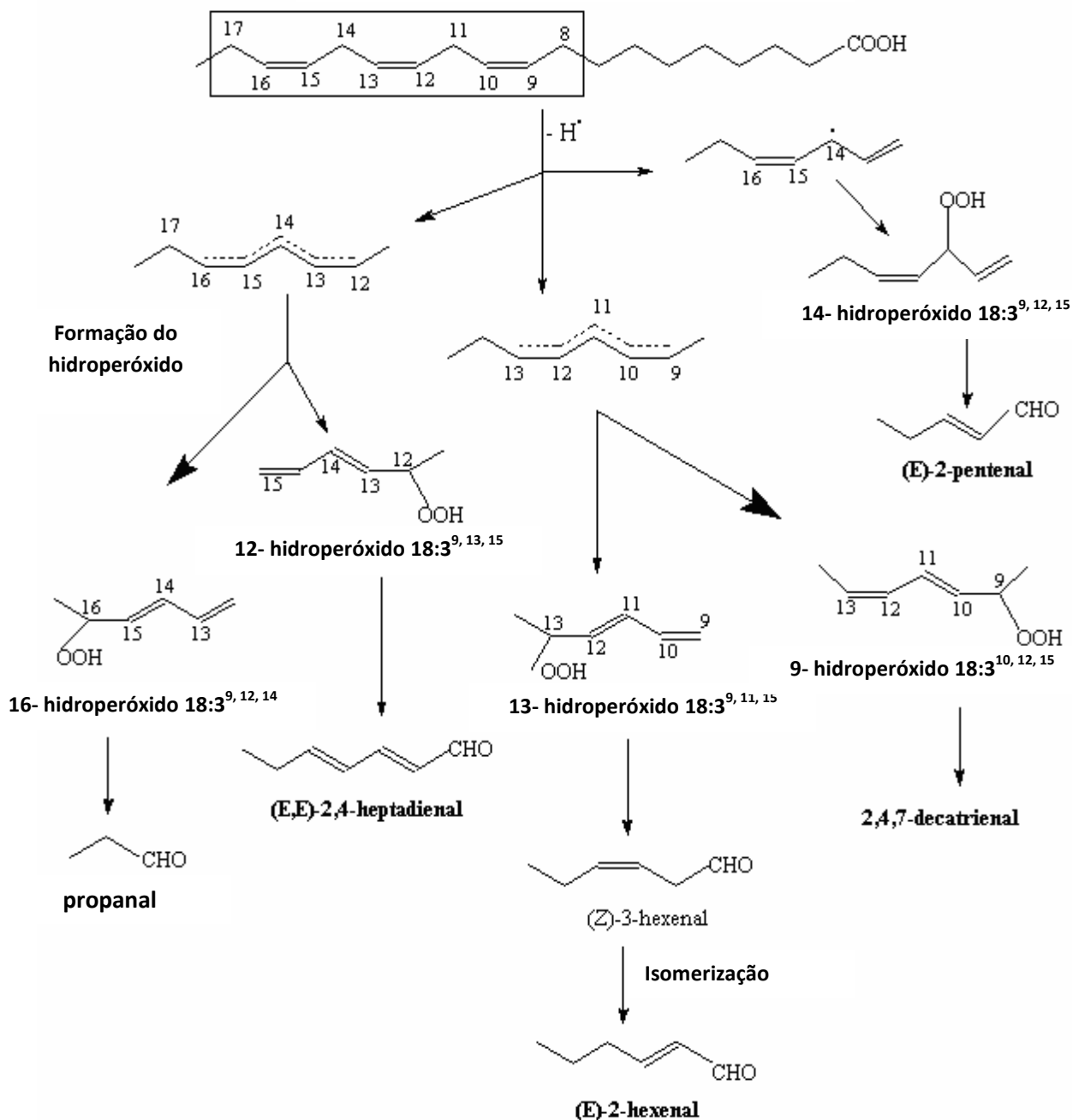
**Figura 33.** Rota de formação do hexanal, 2-octenal e 2,4-decadienal a partir do ácido linoléico

**Fonte:** Frankel, 1980.

O hexanal, composto também derivado da oxidação do ácido linoléico, conforme Figura 33, não foi identificado neste trabalho, possivelmente em função da volatilidade, baixa concentração na fração líquida do óleo ou de sua decomposição na fração líquida.

O 2,4-heptadienal foi o composto que apresentou a terceira maior concentração média ( $22,6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de óleo). O 2,4-heptadienal pode ser formado a partir da oxidação do ácido linolênico, conforme Figura 34.

## ÁCIDO LINOLÊNICO<sup>9,12,15</sup>

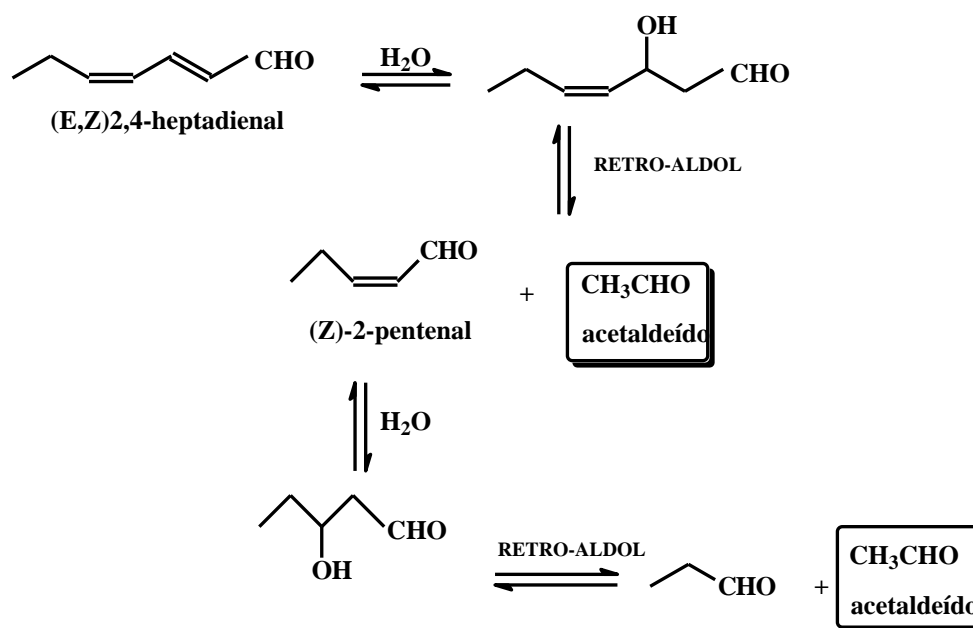


**Figura 34.** Rota de formação do propanal, 2,4-heptadienal, 2-hexenal, 2-pentenal e o 2,4,7-decatrienal a partir do ácido linolênico

**Fonte:** da Silva, 2008.

Propanal, 2-pentenal, 2,4,7-decatrienal e 2-hexenal, compostos também derivados da oxidação do ácido linoléico, conforme Figura 34, não foram identificados neste trabalho, possivelmente em função da volatilidade, baixa concentração na fração líquida do óleo ou de suas decomposições na fração líquida.

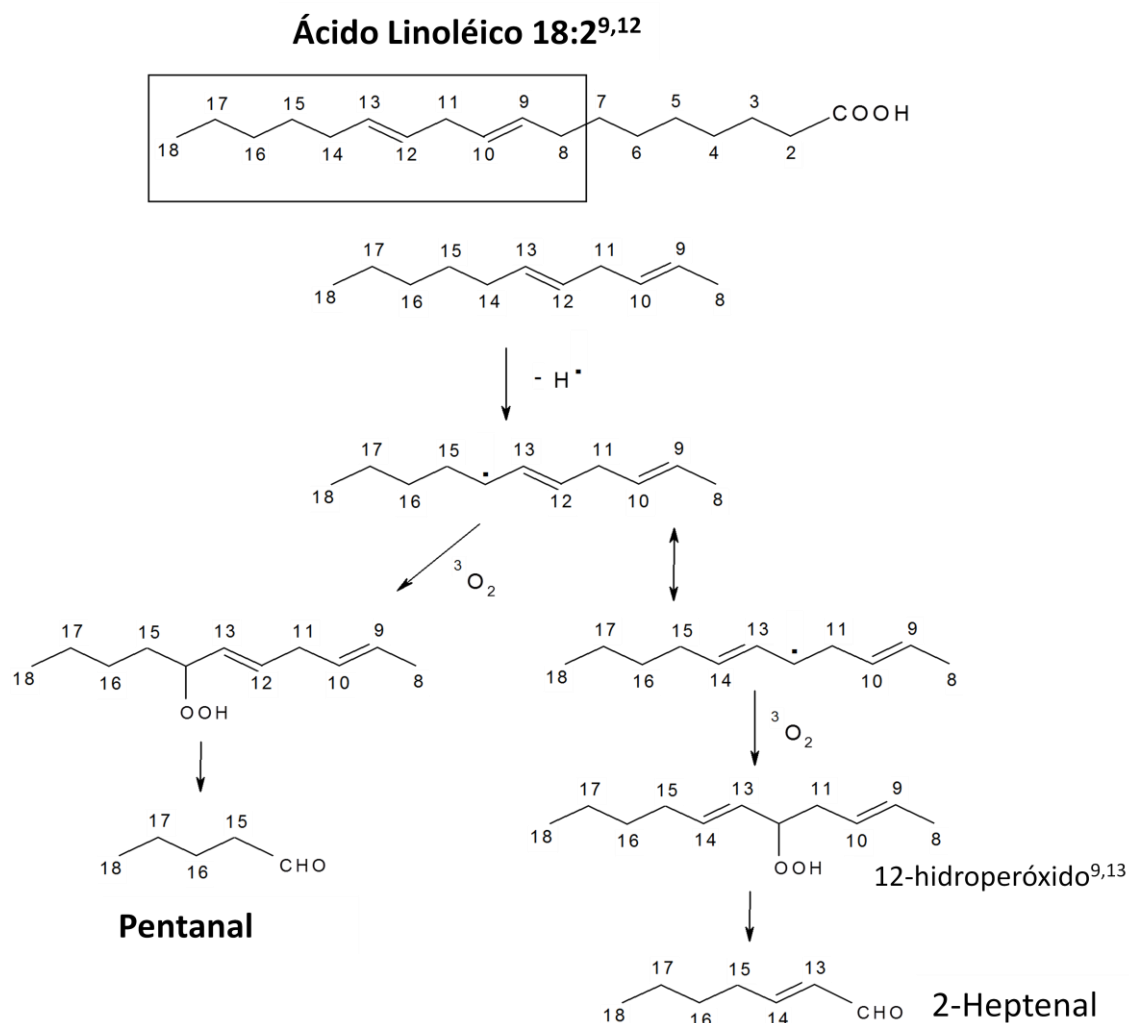
O 2,4-heptadienal apresentou concentração máxima de  $32,3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , em 2 horas de aquecimento, seguido de diminuição nas horas seguintes. A diminuição da concentração 2,4-heptadienal está relacionada com a sua decomposição, sendo uma possível rota a sua condensação retro-aldólica, levando à formação do acetaldeído, conforme a Figura 35 (Frankel, 1980).



**Figura 35.** Rota de decomposição do 2,4-heptadienal, com formação do acetaldeído (adaptado de Frankel, 1980).

O acetaldeído já havia sido determinado em estudos sobre a fração volátil de óleos vegetais, incluindo o óleo de soja (Bastos e Pereira, 2010 e da Silva e Pereira, 2008). Entretanto, neste trabalho ele não foi detectado, possivelmente em decorrência da sua alta volatilidade ou por estar presente na fração líquida do óleo em baixas concentrações.

O 2-heptenal teve concentração média de  $18,4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de óleo, sendo a concentração máxima determinada logo na primeira hora de aquecimento ( $22,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de óleo). O 2-heptenal pode ser formado pela decomposição do 12- hidroperóxido-9,13-octadecadienóico, composto derivado do ácido linoléico, conforme mostrado na Figura 36.



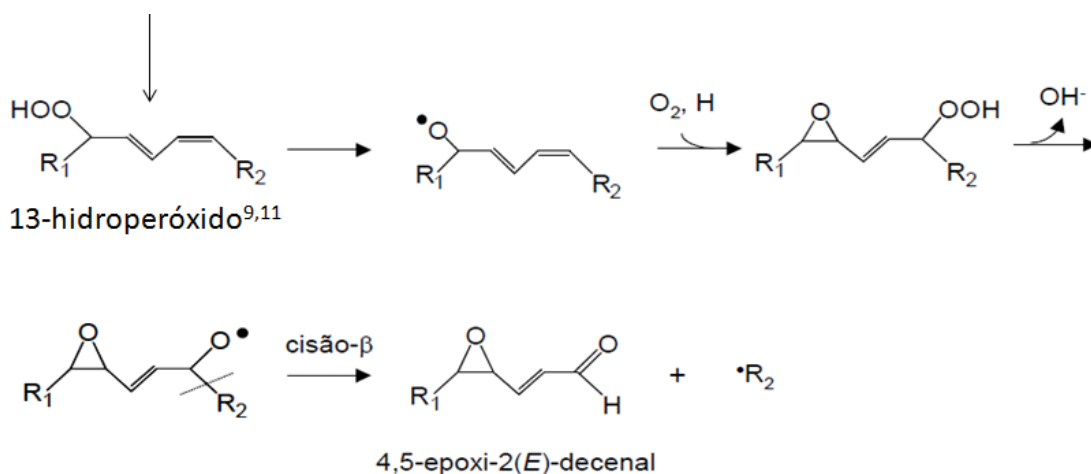
**Figura 36.** Rota de formação do 2-heptenal e do pentanal a partir do ácido linoléico

**Fonte:** da Silva, 2008.

O dihidroxi-decenal apresentou concentração média de  $11,8\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  e máxima determinada em 4 horas de  $14,6\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de óleo. Dihidroxi-decenal, HNE, HHE, e o hidroxi-decadienal pertencem à família dos hidroxi-alquenos e são capazes de produzir uma variedade de efeitos biológicos, por serem mutagênicos e carcinogênicos. Esses efeitos biológicos estão associados à capacidade dos hidroxi-aldeídos reagirem com os grupamentos tiol (SH) e amino ( $\text{NH}_2$ ) presentes em proteínas e no DNA.

O 4,5-epóxi-2-decenal apresentou concentração média de  $9,0 \mu\text{g.g}^{-1}$  de óleo e concentração máxima de  $11,26 \mu\text{g.g}^{-1}$  de óleo em 4 horas. 4,5-epóxi-2-decenal já foi identificado na fração volátil de óleos vegetais (Guillen e Uriarte, 2012). A sua formação ocorre por meio de reações envolvendo o 13-hidroperóxido-9,11-octadecadienóico (derivado do ácido linoléico) com formação de um intermediário epóxi-hidroperóxido, que após decomposição, catalisada por metais, gera um radical epóxi-alcoxil, que sofre cisão- $\beta$  (quebra da ligação C-C adjacente ao radical acoxila) originando o aldeído e um radical de hidrocarboneto que é estabilizado pela abstração de um hidrogênio de outra molécula (Pryor e Porter, 1990). A rota de formação do 4,5-epóxi-2-decenal pode ser observada na Figura 37.

#### DECOMPOSIÇÃO DO ÁCIDO LINOLÉICO 18:2<sup>9,12</sup>



**Figura 37.** Rota de formação do 4,5-epóxi-2-decenal a partir do ácido linoléico

**Fonte:** Pryor e Porter, 1990

O hidroxi-decadienal teve concentração média de  $7,3 \mu\text{g.g}^{-1}$  de óleo, sendo sua concentração máxima determinada em 2 horas de aquecimento ( $11,8 \mu\text{g.g}^{-1}$  de óleo), não há dados na literatura sobre sua rota de formação.

Acroleína teve concentração média de  $6,6 \mu\text{g.g}^{-1}$  de óleo, sendo sua concentração máxima determinada em 4 horas aquecimento ( $7,8 \mu\text{g.g}^{-1}$  de óleo). A acroleína pode ser formada a partir da oxidação do ácido linolênico, que é um ácido graxo poliinsaturado presente no óleo de soja, conforme mecanismo proposto por da Silva e Pereira 2008 (Figura 10 da seção 2.3.3). Chama-se atenção para o fato de

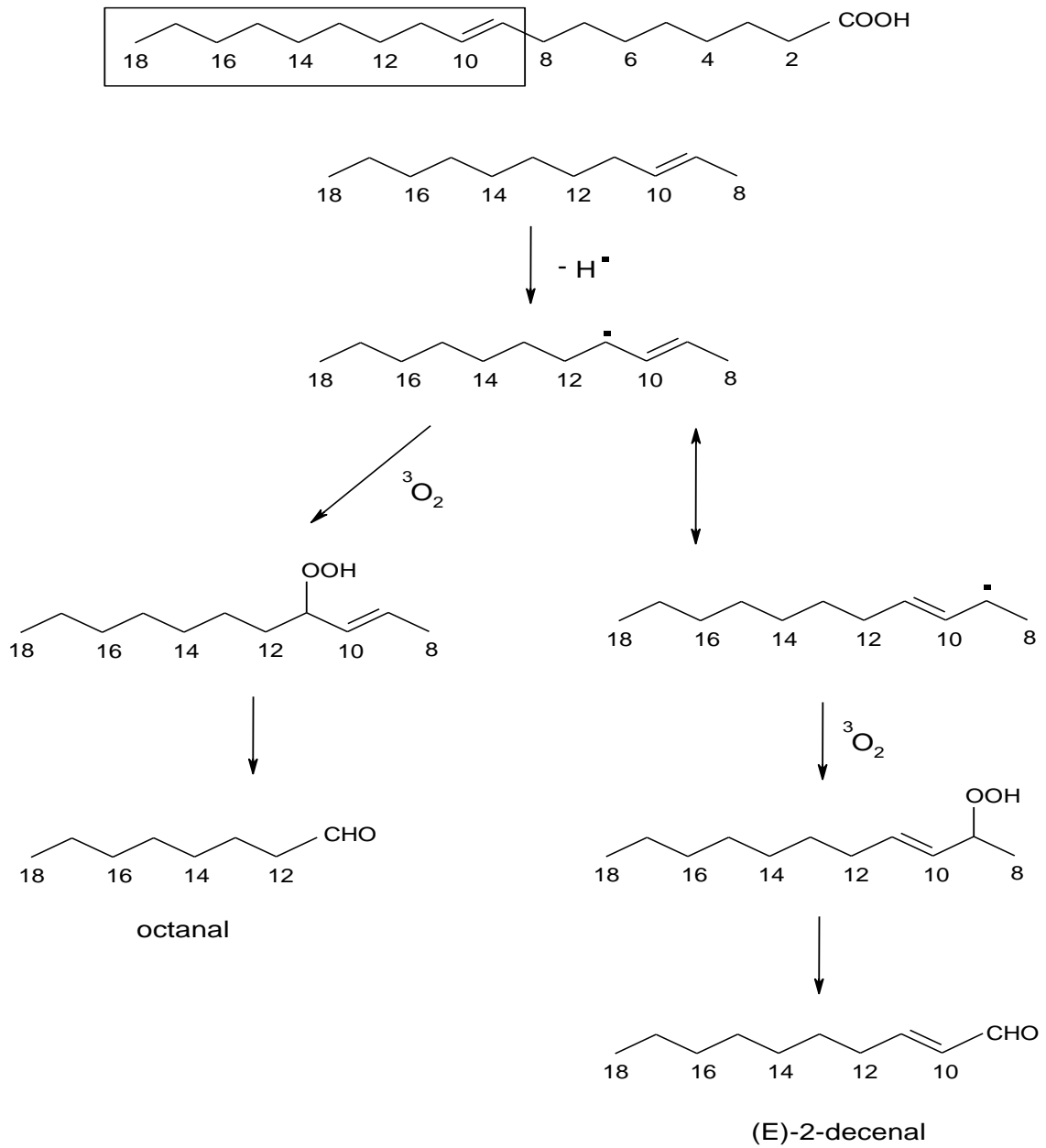
acroleína e o 2-heptenal terem sido determinados na fração volátil dos óleos de soja, dendê e canola (Bastos e Pereira, 2010 e da Silva e Pereira, 2008), sendo que nos três óleos ela apresentou a maior taxa média de emissão. No presente trabalho, em que as determinações foram feitas diretamente na fração líquida do óleo, o 2-heptenal apresentou maior concentração média que a acroleína. Essa inversão pode ser decorrente de uma maior volatilidade da acroleína em relação ao 2-heptenal, o que levaria à sua maior presença na fração volátil do óleo.

O 2-octenal apresentou concentração média de  $6,2 \mu\text{g.g}^{-1}$  de óleo, e concentração máxima na primeira hora aquecimento ( $8,8 \mu\text{g.g}^{-1}$  de óleo), podendo ser formado a partir da oxidação do ácido linoléico, devido à decomposição do 11-hidroperóxido-9,12- octadecadienóico, como mostrado na Figura 33.

O 2-decenal, 2-undecenal e HHE foram os compostos com as mais baixas concentrações médias, 4,4; 2,3 e  $2,2 \mu\text{g.g}^{-1}$  de óleo, respectivamente. O 2-decenal e o 2-undecenal podem ser formados a partir da oxidação de ácido oléico. As rotas de formação podem ser verificadas nas Figuras 38 e 39.



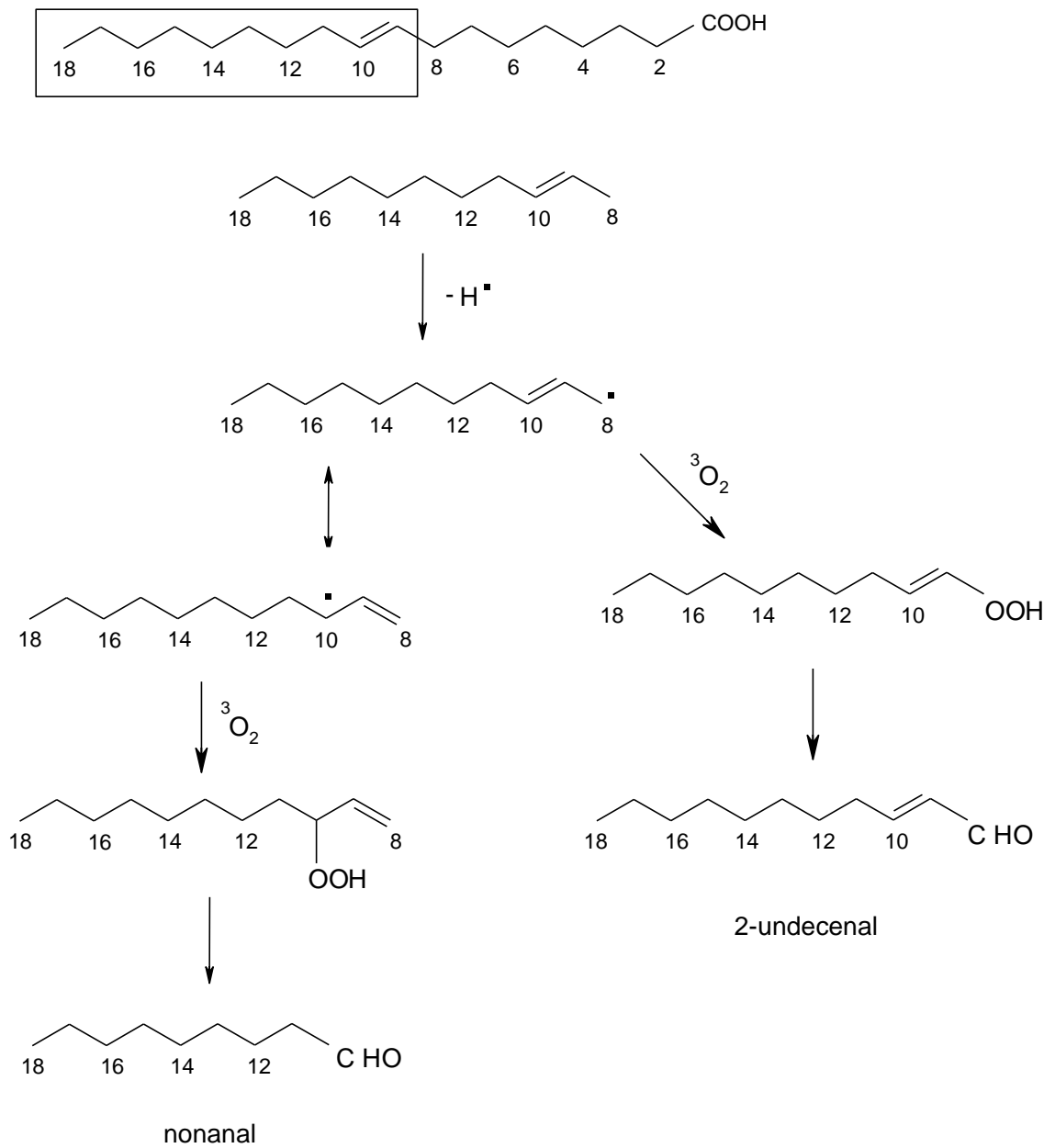
Ácido oléico 18:1<sup>9</sup>



**Figura 38.** Rota de formação do octanal e 2-decenal a partir do ácido oleico.

**Fonte:** da Silva, 2008.

Ácido oléico 18:1<sup>9</sup>



**Figura 39.** Rota de formação do nonanal e 2-undecenal a partir do ácido oleico.

**Fonte:** da Silva, 2008.

O HHE alcançou concentração máxima no óleo em 6 horas de aquecimento, com cerca de  $2,48 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de óleo, seguida de diminuição na hora seguinte. A concentração máxima do HHE neste trabalho, é próxima da determinada por Seppanen e Csallany (2006), no mesmo tipo de óleo, que foi de cerca de  $1,8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de óleo em 2 horas de aquecimento, também seguida de uma diminuição nas horas seguintes, provavelmente devido à sua decomposição ou polimerização, em função do aquecimento. O tempo no qual o HHE chegou ao máximo da concentração é, todavia diferente, possivelmente em função das condições experimentais, como volume do óleo aquecido, relação superfície/volume, quantidade e vazão de ar borbulhado, entre outros. Segundo os mesmos autores, o ácido linolênico é o precursor do HHE ( Seppanen e Csallany, 2001).

Assim como o HNE, outros CC determinados neste estudo também são derivados do ácido linoléico, como o 4,5-epoxi-2-decenal, 2-heptenal, 2-octenal e o 2,4-decadienal. Essa grande quantidade de compostos derivados do ácido linoléico (65,6% em termos da concentração média total) no óleo de soja está relacionada ao fato de ser o ácido presente em maior quantidade (54%), e devido a possuir duas insaturações, o que o deixa mais susceptível à oxidação do que os ácidos graxos monoinsaturados. Os valores das concentrações médias dos CC são mostrados na Tabela 1 do Anexo.

## **6.6 CORRELAÇÃO DE PEARSON ENTRE OS COMPOSTOS CARBONÍLICOS IDENTIFICADOS NO ÓLEO DE SOJA (SEM ADIÇÃO DE METAIS)**

A Correlação de Pearson mensura a direção e o grau de relação linear entre duas variáveis, ou seja, é a medida de associação linear entre variáveis. Neste estudo a correlação de Pearson foi analisada sob dois enfoques: através da correlação entre CC derivados de um mesmo ácido graxo e entre os CC de uma mesma classe. Na Tabela 13 estão listadas todas as correlações de Pearson para os CC Identificados na fração líquida do óleo de soja aquecido.

Entre os compostos carbonílicos que podem ser derivados do ácido linoléico (HNE, 4,5-epoxi-2-decenal, 2-heptenal, 2-octenal e 2,4 decadienal) foi possível verificar que cerca de 70% das correlações tiveram entre alto e médio fator de correlação. Os baixos fatores de correlação foram observados em três casos, sendo

que em todos eles o 2,4-decadienal era uma das variáveis consideradas (HNE x 2,4-decadienal; 2-heptenal x 2,4-decadienal; 2-octenal x 2,4-decadienal) o que sugere que o 2,4-decadienal tenha outra rota de formação, além da rota direta a partir do ácido linoléico. Os compostos derivados do ácido oléico (2-decenal e 2-undecenal) tiveram alto fator positivo de correlação e os compostos derivados do ácido linolênico (acroleína e o 2,4-heptadienal) tiveram médio fator de correlação positiva.

Os valores de correlação encontrados entre os grupos de compostos derivados de um mesmo ácido graxo, de maneira geral corroboram a hipótese de que eles realmente possam ser formados conforme as rotas de formação já descritas. Uma exceção, como já mencionado, poderia ser o 2,4-decadienal, com outra possível rota de formação.

Analisando-se as correlações de Pearson entre o dihidroxi-decenal e hidroxidecadienal, percebe-se uma boa correlação entre eles. Entretanto, verificou-se baixas correlações desses compostos com os outros hidroxialdeídos estudados neste trabalho (HNE e HHE). Dihidroxi-decenal e hidroxidecadienal ainda não possuem uma rota de formação descrita na literatura, mas a alta correlação entre eles indica a provável formação a partir de um mesmo ácido precursor, ou mesmo a formação do dihidroxi-decenal a partir do hidroxidecadienal, por adição de grupo OH a uma das duplas ligações. Outra possível via de formação para o dihidroxi-decenal seria via hidrólise do 4,5-epoxi-2-decenal (Loureiro *et al.*, 2002).

A boa correlação existente entre o dihidroxi-decenal e o 2-decenal, pode indicar que o 2-decenal, além de ser formado pela oxidação do ácido oléico, possua outra rota em comum com o dihidroxi-decenal. O mesmo pode ocorrer para o hidroxidecadienal e o 2,4-decadienal. Para o 4,5-epoxi-2-decenal outra via de formação seria através epoxidação, catalisada por peróxidos, do 2,4-decadienal na dupla ligação no C4 (Loureiro *et al.*, 2002).

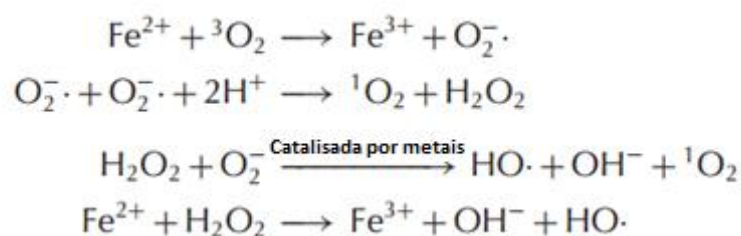
**Tabela 13.** Correlação de Pearson para os CC presentes nas amostras de óleo de soja aquecido a 180°C

	HHE	Acroleína	Epoxi	HNE	2,4-heptadienal	2-heptenal	2-octenal	2,4-decadienal	2-decenal	2-undecenal	Dihidroxi-decenal	Hidroxi-decadienal
HHE		0,73 (-)	0,77	0,82	0,46	0,61 (-)	0,44 (-)	0,76 (-)	0,55	0,65	0,06(-)	0,31 (-)
Acroleína			0,18 (-)	0,21 (-)	0,67	0,13	0,12	0,85	0,07	0,03	0,58	0,52
4,5-epoxi-2decenal				0,97	0,13	0,92 (-)	0,74 (-)	0,94	0,20 (-)	0,96	0,52	0,09
HNE					0,07 (-)	0,80 (-)	0,54(-)	0,36 (-)	0,86	0,96	0,4	0,14 (-)
2,4-heptadienal						0,41 (-)	0,57 (-)	0,92	0,40	0,14	0,76	0,94
2-heptenal							0,92	0,03 (-)	0,93 (-)	0,82 (-)	0,60 (-)	0,37 (-)
2-octenal								0,21 (-)	0,82 (-)	0,60 (-)	0,64 (-)	0,62 (-)
2,4-decadienal									0,10	0,12 (-)	0,65	0,86
2-decenal										0,94	0,78	0,40
2-undecenal											0,63	0,08
Dihidroxi-decenal												0,77
Hidroxi-decadienal												

## 6.7 INFLUÊNCIA DE ÍONS METÁLICOS NA DEGRADAÇÃO DO ÓLEO DE SOJA DURANTE AQUECIMENTO

A qualidade dos produtos alimentares tem recebido grande atenção devido à sua influência na nutrição e saúde humana. Neste sentido, a determinação da influência de metais traço como catalisadores da oxidação lipídica em óleos vegetais é um campo importante na análise da qualidade de alimentos (Benedet e Shibamoto, 2008). Os metais são normalmente encontrados em concentração traço nos óleos vegetais, assim como também na composição de certos alimentos.

A presença de metais no óleo, mesmo em quantidades traço, acelera as reações de oxidação, pois os metais agem como catalisadores através da cisão homolítica de hidroperóxidos, com a formação de radicais hidroxil e alcóxido, e/ou atacando diretamente os lipídios, gerando radicais de ácidos graxos. Os metais também podem produzir espécies reativas do oxigênio e radical hidroxil, a exemplo da ação do ferro, como mostrado na Figura 40 (Choe e Min, 2006).



**Figura 40:** Reações de oxidação envolvendo o íons do ferro

**Fonte.** Adaptada de Choe e Min, 2006

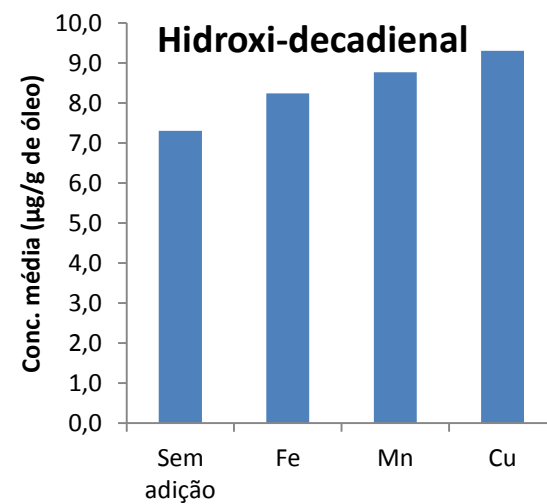
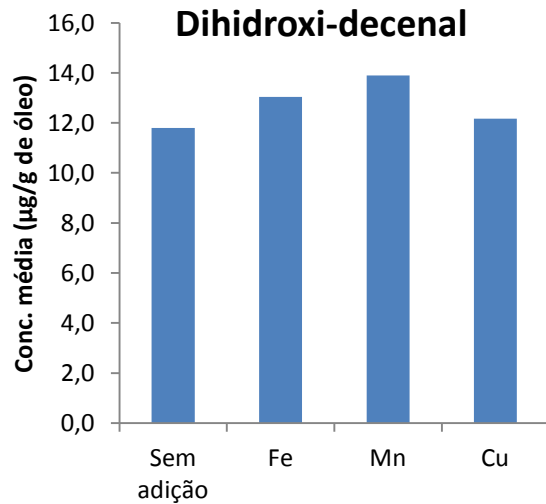
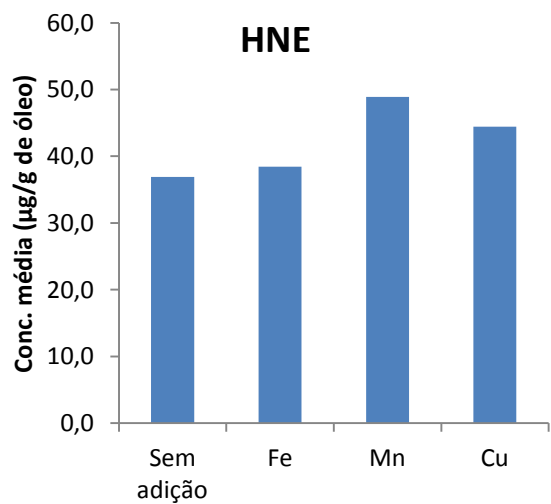
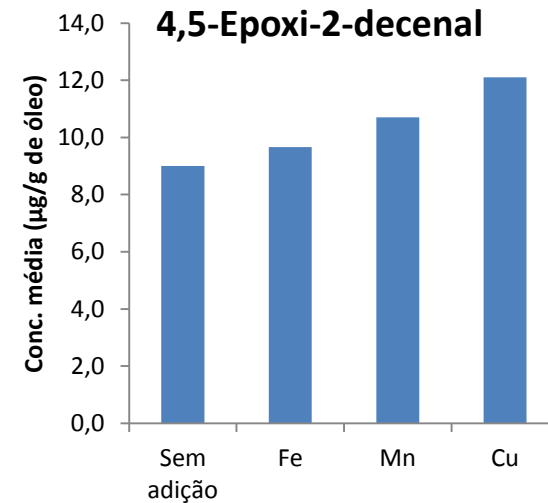
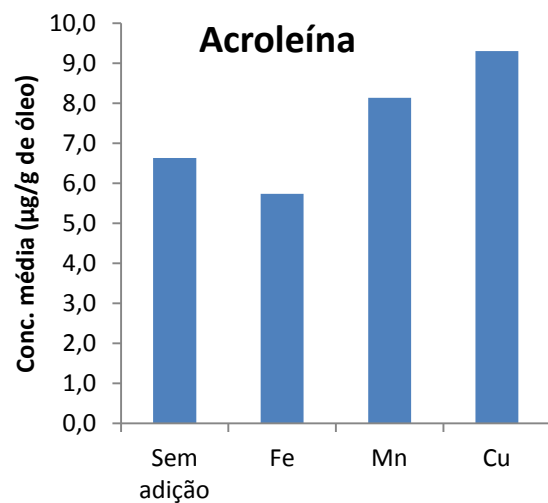
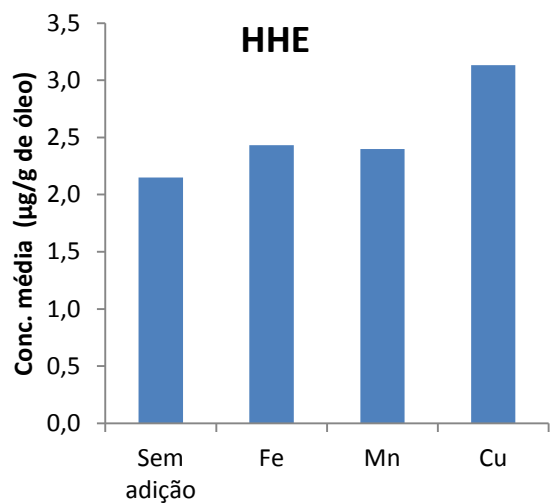
Os pró-oxidantes que apresentam um efeito mais pronunciado, segundo alguns autores, são o cobre e o ferro, que produzem um efeito oxidativo perceptível em baixas concentrações como 5,0 e 3,0 ppb, respectivamente (Anwar *et al.*, 2004). Óleo bruto de soja pode conter metais de transição, como Cu e Fe, em concentrações de 13 ppb e 2,8 ppm, respectivamente. Entretanto, após o refino o teor de metais pode ser reduzido para 2,5 ppb (Cu) e 0,2 ppm (Fe), mas óleos comestíveis fabricados sem o refino podem trazer quantidades elevadas de metais (Choe e Min, 2006).

A Figura 41 mostra a influência dos íons metálicos Fe (III), Cu (II) e Mn (II), sobre as concentrações dos CC estudados na fração líquida do óleo de soja. Os valores expressam as médias calculadas para as três concentrações estudadas (10, 30 e 50 µg.kg de óleo), e os cinco intervalos de aquecimento (1, 2, 4, 6 e 8 horas).

A partir da análise dos gráficos, pode-se inferir que os íons metálicos exerceram diferentes influências no processo de degradação dos óleos, comparando-se com amostras sem adição de íon metálico. Para o HHE, acroleína, 4,5-epoxi-2-decenal, hidroxidecadienal, 2,4-heptadienal e 2-heptenal a adição de cobre foi o que promoveu os maiores incrementos nas concentrações, sendo o maior aumento ocorrido para acroleína (42,4%). Já para o HNE, dihidroxidecadienal 2-octenal e 2-decenal, a adição do manganês foi a que promoveu os maiores incrementos nas concentrações, sendo o maior aumento para 2-decenal (54,5%), enquanto para o 2,4-decadienal e o 2-undecenal os maiores incrementos nas concentrações, foram provocadas por ferro e cobre, no primeiro caso, e por ferro e manganês no segundo.

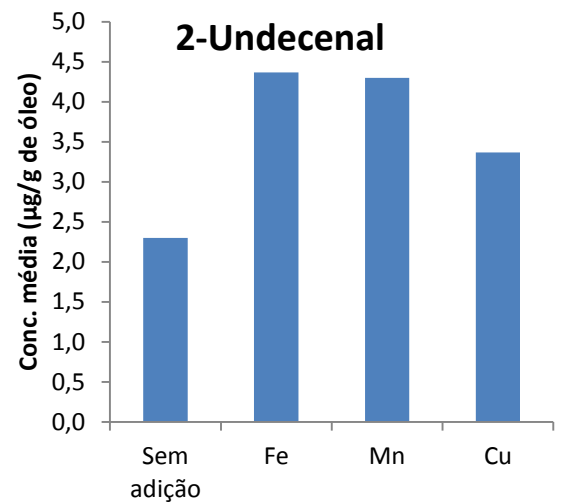
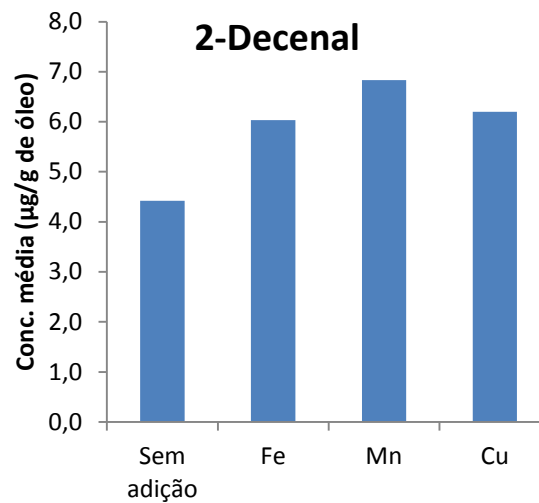
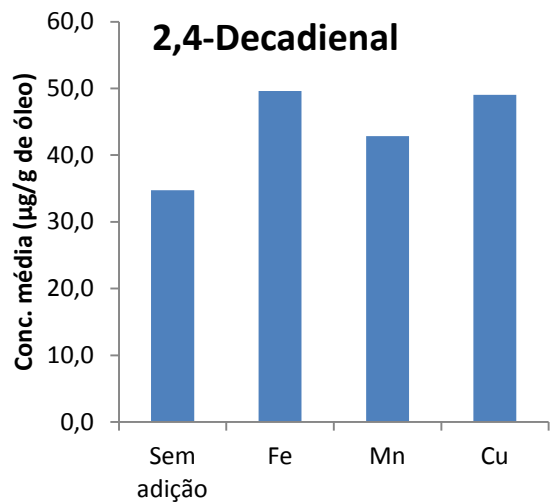
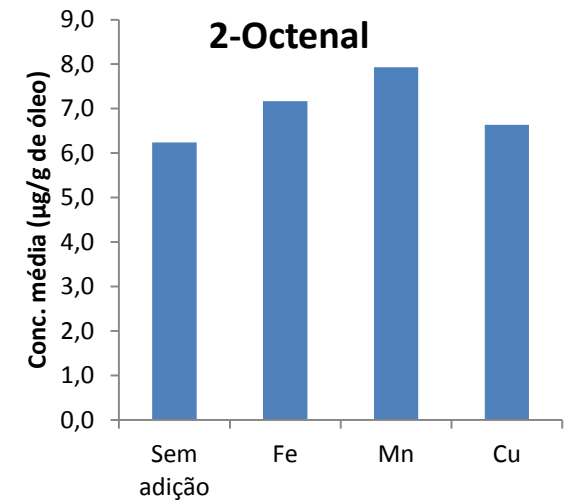
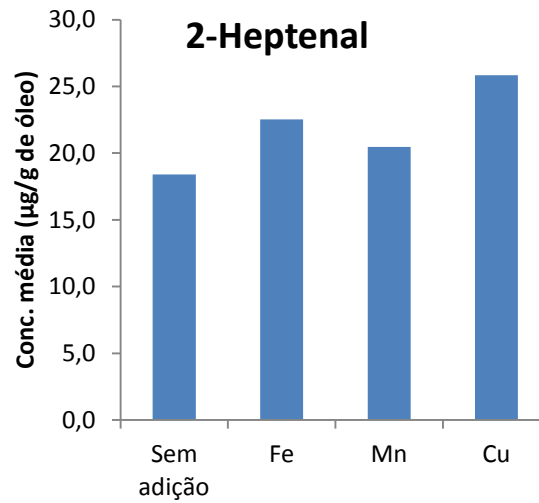
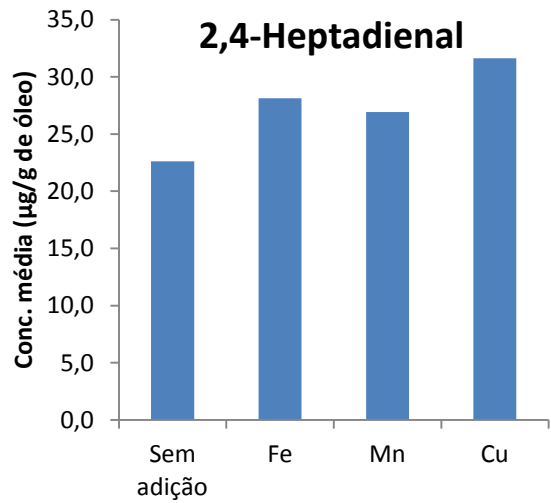
Os hidroxiálquenos, no geral, tiveram um aumento expressivo nas suas concentrações médias com adição dos íons metálicos. HHE e HNE, tiveram acréscimos em suas concentrações, em relação à amostra sem adição, de cerca de 41%, com adição de cobre, e de 32% com adição de manganês, respectivamente. Já o hidroxidecadienal e o dihidroxidecadienal tiveram aumentos de 27%, com adição de cobre, e 18%, com adição de manganês, respectivamente.

Segundo Bastos e Pereira (2010) as diferentes modificações nas concentrações dos CC, causados pela adição do Fe (III), Cu (II) e Mn (II) está relacionada à ação catalítica desses íons metálicos de transição, podendo estar associada à sua tendência em formar complexos, estabilizando assim espécies intermediárias, possivelmente formadas durante a oxidação térmica dos óleos; é associada também à capacidade deles reagirem com os hidroperóxidos formados, transformando-os em radicais hidroperóxil, que são capazes de propagar as reações de oxidação.



**Figura 41.** Variação da concentração dos CC, em função da adição de íons Fe (III), Cu (II) e Mn (II); média das três concentrações estudadas.

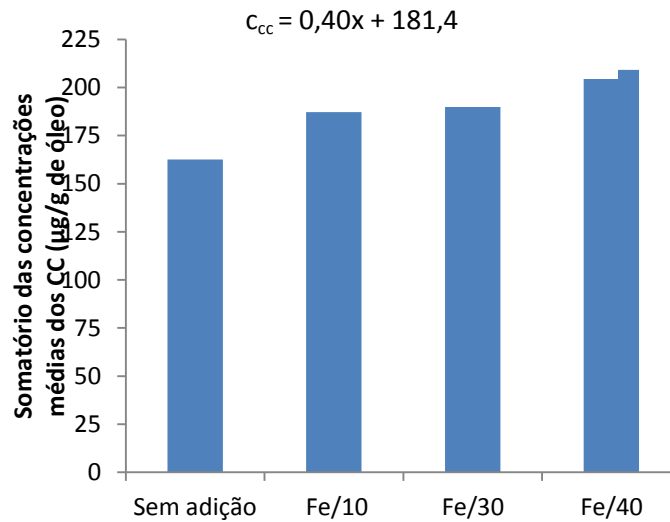
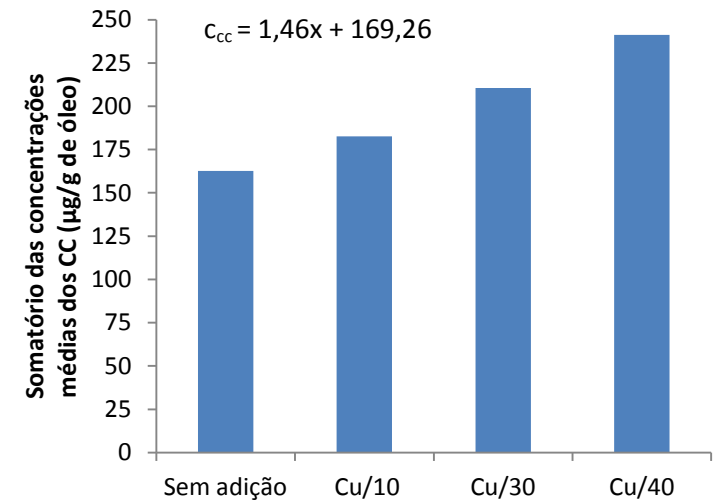
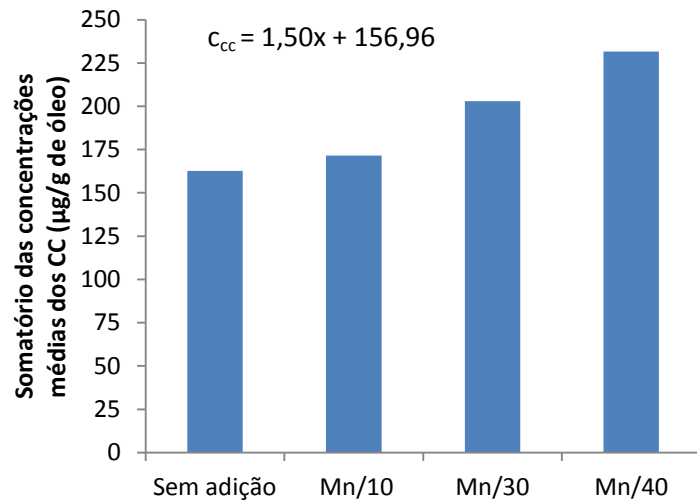




**Figura 41.** Variação da concentração dos CC, em função da adição de íons Fe (III), Cu (II) e Mn (II); média das três concentrações estudadas (continuação)

A Figura 42 mostra, por outro lado, a influencia dos íons Fe (III), Cu (II) e Mn (II), nas concentrações de 10, 30 e 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de óleo, sobre o somatório das concentrações médias dos CC. De modo geral, o aumento da concentração dos três íons metálicos avaliado promoveu aumento na concentração total dos CC, presentes na fração líquida do óleo. O cobre foi quem promoveu o maior aumento, seguido pelo manganês. O aumento na concentração total dos CC, nas amostras com a adição de Cu/50, em relação às amostras sem adição de íons metálicos, foi de cerca de 48%. Já para o Mn/50 e o Fe/50 eles foram de 42% e 28%, respectivamente. Esses resultados concordam com os estudos de Bastos e Pereira (2010), no fato do íon  $\text{Cu}^{2+}$  ser o íon, entre  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$ , que promoveu o maior aumento nas concentrações dos aldeídos emitidos para a fase vapor, através da oxidação térmica do óleo de canola, e concorda também com Choe e Min (2006), que afirmam que o cobre tem maior capacidade que o  $\text{Fe}^{3+}$  e o  $\text{Fe}^{2+}$  em acelerar a decomposição de peróxidos de hidrogênio. Deve-se observar, contudo, que o  $\text{Mn}^{2+}$  atuou também como um importante catalisador, na formação dos CC.

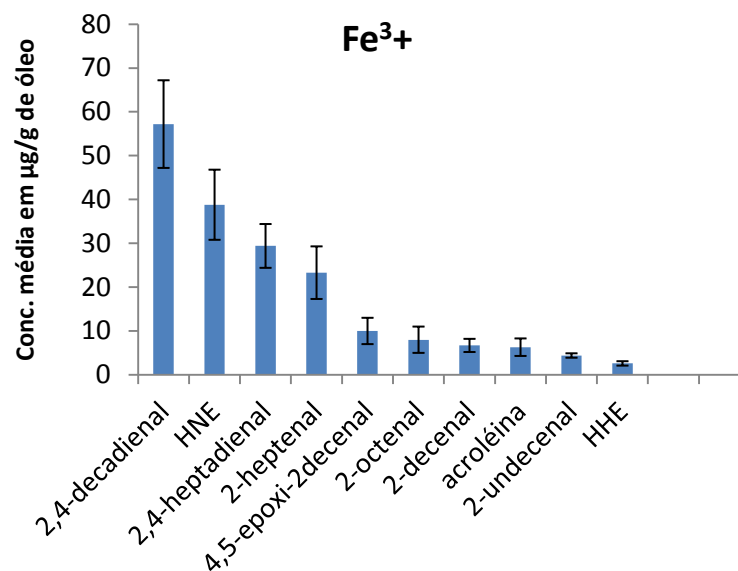
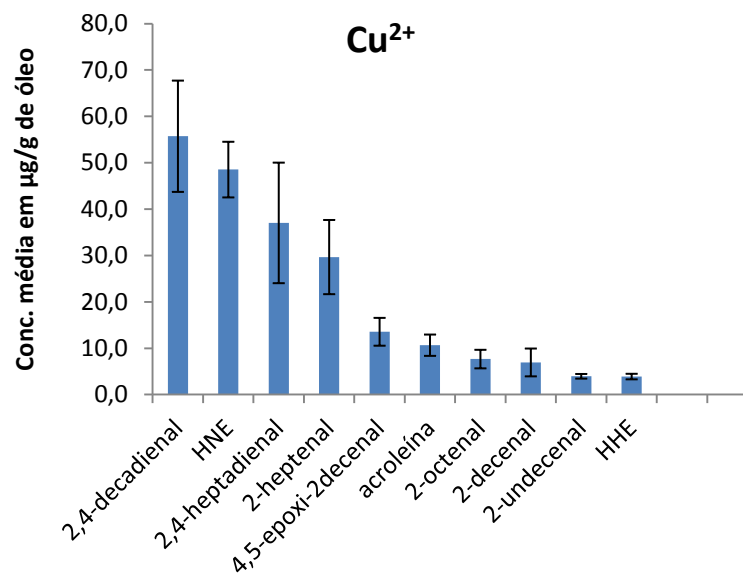
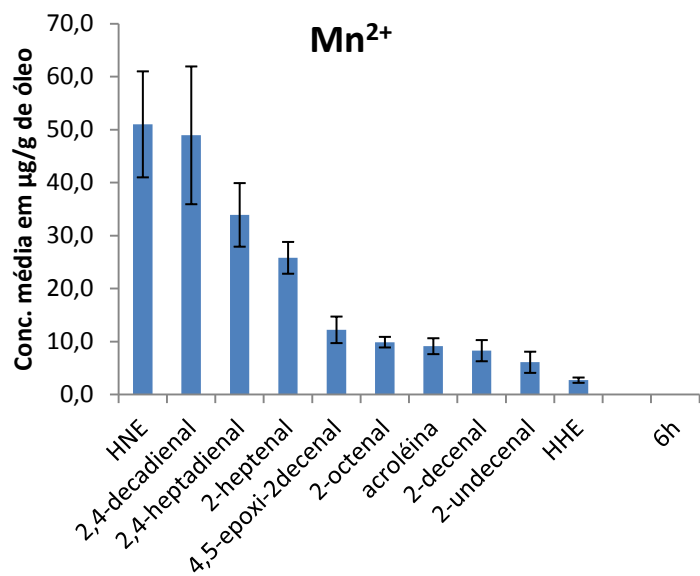
A partir da relação entre a concentração total dos CC nas três concentrações estudadas para cada metal, foram estabelecidas equações em que se pode perceber, de acordo com os coeficientes angulares, que as concentrações crescem mais acentuadamente com o aumento da concentração de  $\text{Mn}^{2+}$ , embora, em termos de concentração final atingida para o total do CC, o  $\text{Cu}^{2+}$  na concentração de 50  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  gere os maiores valores. Nas tabelas 3, 4 e 5 do Anexo B são mostradas as concentrações médias para cada CC, para os diferentes tipos de íon metálicos estudados, em função das suas concentrações. Na Figura 2 do anexo A são mostrados os gráficos das concentrações médias dos CC em função do tipo e da concentração de cada íon metálico.



**Figura 42.** Variação no somatório das concentrações dos CC, em função da adição de íons Fe (III), Cu (II) e Mn (II), nas diferentes concentrações estudadas.

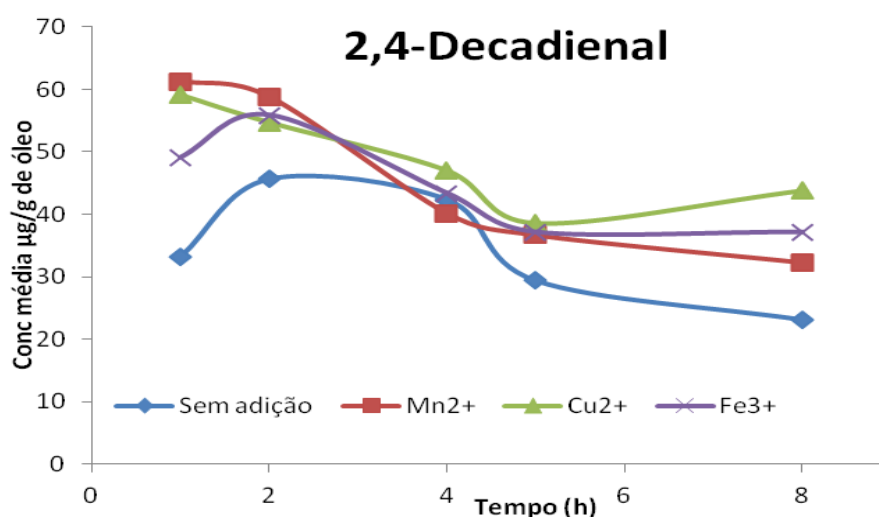
Visto que a concentração de  $50\mu\text{g.kg}^{-1}$  de íon metálico no óleo foi a que promoveu os maiores aumentos nas concentrações dos CC presentes na fração líquida, ela foi utilizada para verificar se há alteração no perfil de concentrações médias dos CC em função da adição e do tipo de metal. Na Figura 43 são mostrados os perfis em função de cada íon metálico.

Quando se comparam os perfis com obtido sem a adição dos íons metálicos (Figura 39), nota-se uma similaridade, quando estes são organizados em ordem decrescente de concentração. Isto mostra que a adição de diferentes íons metálicos ao óleo de soja não interfere de maneira significativa na ordem de importância em que os CC são formados, mas apenas nos valores médios das concentrações.

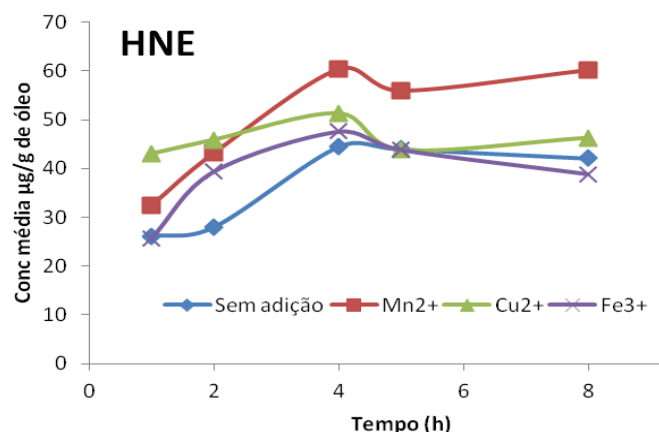


**Figura 43.** Concentrações médias dos CC presentes em amostra de óleo de soja com adição dos íons de Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> na concentração de 50µg.kg<sup>-1</sup> de óleo.

O 2,4-decadienal e o HNE foram os CC que apresentaram as maiores concentrações na fração líquida do óleo de soja, em todas as condições estudadas (sem e com adição dos íons metálicos). Esse fato se relaciona à composição de ácidos graxos do óleo de soja, visto que o 2,4-decadienal e o HNE são derivados do ácido linoléico, que possui maior proporção no óleo de soja (65,6% em termos da concentração média total). As Figuras 44 e 45 mostram a variação, em função do tempo de aquecimento do óleo, nas concentrações do 2,4-decadienal e HNE, em função do tipo de íon metálico presente. Foi escolhida, para a construção dos gráficos, a concentração intermediária do metal ( $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$ ). Os gráficos para os demais CC encontram-se na Figura 3 do Anexo A.



**Figura 44.** Perfil de concentração do 2,4-decadienal, em função do tempo de aquecimento do óleo, sem e com adição dos íons de  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ , e  $\text{Cu}^{2+}$  na concentração de  $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de óleo.



**Figura 45.** Perfil de concentração do HNE em função do tempo de aquecimento do óleo, sem e com adição dos íons de  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , e  $Cu^{2+}$  na concentração de  $30 \mu g.kg^{-1}$  de óleo.

Para um mesmo tipo de composto é possível perceber similaridades nos perfis de formação ao longo das oito horas de aquecimento, sob influência dos diferentes íons metálicos. Para o 2,4-decadienal em todas as condições estudadas percebe-se um aumento da concentração até duas horas, seguido de diminuição nas horas seguintes. Essa diminuição da concentração pode estar associada à sua decomposição durante o processo de degradação do óleo, uma vez que o 2,4-decadienal é um composto que possui duas insaturações, o que o torna mais susceptível a oxidação. Já no perfil do HNE, em todas as condições estudadas houve um aumento da sua concentração até cerca de quatro horas aquecimento, seguido de diminuição, que também deve estar associada à sua decomposição. Para o HNE é possível destacar a curva sob influência do íon manganês, em vista da elevada concentração entre quatro e oito horas de aquecimento, quando comparada com as demais curvas.

Diante dos resultados expostos sobre a influência dos íons metálicos no processo de oxidação do óleo de soja aquecido, observou-se que os íons metálicos estudados não afetam significativamente na ordem de importância em que os CC são formados. Entretanto, como já esperado, eles atuam como catalisadores de reações oxidativas, acelerando o processo de degradação dos óleos vegetais e com isso aumenta a formação de compostos secundários, como os compostos carbonílicos.

## 7.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método desenvolvido para a determinação de compostos carbonílicos em amostra de óleos vegetais aquecidos, baseado na extração líquido-líquido e análise por cromatografia líquida, acoplada a detectores de arranjo de fotodiodos e espectrometria de massas com ionização por fonte tipo eletrospray, mostrou-se simples, eficiente, seletivo e sensível, apresentando bons resultados de precisão, sensibilidade e exatidão.

A otimização das condições de extração foi executada com êxito através de um planejamento univariado. Os fatores e as melhores condições determinadas foram: solvente extrator – acetonitrila; volume de solvente extrator – 1,5 mL; modo e tempo de agitação – manual por 3 minutos e tempo de sonicação – 30 minutos.

A linearidade foi testada no intervalo de 0,2 a 15  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  apresentando coeficientes de determinação ( $r^2$ ) superiores a 0,9970. A precisão do método, avaliada através do coeficiente de variação foi de 3,1% (4,5-epoxi-2-decenal) a 9,5% (2,4-decadienal) na precisão intradia e de 4,8% (acroleína) a 13,6% (2-undecenal) na precisão interdia. A exatidão foi avaliada através da recuperação, que no menor nível de fortificação variou entre 70,7% (2-Undecenal) e 85,0% (HHE), no nível intermediário entre 70,3% (2-Undecenal) e 86,5% (HHE), e no maior nível de fortificação entre 70,4 (2-Octenal) e 87,7% (HHE).

Dentre os compostos carbonílicos presentes na matriz foram identificados e quantificados dez: 4-hidroxi-2-trans-hexenal, 4-hidroxi-2-trans-nonenal, 4,5-epoxi-2-decenal, acroleína, 2-heptenal, 2,4-heptadienal, 2-octenal, 2,4-decadienal, 2-decenal e 2-undecenal. Além destes, o hidroxi-decadienal e o dihidroxi-decenal estão sendo propostos como também sendo formados, baseados na análise dos espectros de massas dos picos cromatográficos. Durante as oito horas de aquecimento, 4-hidroxi-2-trans-nonenal, 2,4-decadienal e 2,4-heptadienal foram os CC formados em maiores concentrações médias, sendo que entre uma e duas horas o 2,4-decadienal foi o composto cuja concentração mais cresceu, enquanto que entre quatro e oito horas o HNE foi o que apresentou o maior crescimento.

Vale resaltar a identificação inequívoca dos hidroxialdeídos insaturados HHE e HNE, e a sua quantificação na fase líquida do óleo, assim como a detecção e quantificação dos compostos sugeridos como sendo o dihidroxi-decenal e hidroxi-



decadienal, igualmente tóxicos para o organismo, com ênfase especial no HNE, por ser o CC que apresentou a maior concentração média em oito horas de aquecimento.

Dos doze compostos determinados neste estudo, nove deles apresentaram concentrações máximas entre duas e quatro horas de aquecimento, o que sugere que esse intervalo de tempo seja o mais crítico para a degradação lipídica no óleo de soja.

No estudo da influência dos metais, de um modo geral com a sua adição às amostras, houve um aumento nas concentrações de todos os CC identificados. Em termos de efeito catalítico, o cobre foi o metal que mostrou-se mais eficiente em promover um aumento das concentrações, seguido do manganês, sendo que, em geral, este efeito era superior na concentração de  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$ . Para o HHE, acroleína, 4,5-epoxi-2-decenal, hidroxidecadial, 2,4-heptadienal e 2-heptenal a adição de cobre promoveu os maiores incrementos nas concentrações, em relação às amostras sem adição de metal. Já para o HNE, dihidroxidecenal, 2-octenal e 2-decenal a adição do manganês promoveu os maiores incrementos e para o 2,4-decadial e o 2-undecenal os maiores incrementos nas concentrações, foram provocadas por ferro e cobre, no primeiro caso, e por ferro e manganês no segundo.

Finalmente, observou-se que a espécie metálica adicionada ao óleo não afeta de maneira significativa a ordem de concentração com que os CC são formados.

## 8.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE (Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais). Disponível em: <http://www.abiove.org.br/site/index.php>. Acesso em maio de 2014

ALMEIDA, D. T. ARAÚJO, M. P. N.; FURTUNATO, D. M. N.; SOUZA, J. M.; MORAES, T. M. Revisão de literatura: aspectos gerais do processo de fritura de imersão. *Higiene Alimentar*, v.20, n. 138, p.42-48, **2006**

ANDRADE, M. V. A. S. Estudo de oxidantes fotoquímicos no ar: compostos carbonílicos, ozônio e PAN. Tese (Doutorado em Química – Química Analítica). Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia. Salvador, **2001**.

ANDRADE, M. V. A. S. de; P, H. L. C.; PEREIRA, P. A. de P.; ANDRADE, J. B. de. Compostos carbonílicos atmosféricos: fontes, reatividade, níveis de concentração e efeitos toxicológicos. *Química Nova*. v. 25, n 6b, p. 1117-1131, **2002**.

ANUNCIAÇÃO, D. S.; SOUSA, E. T.; CARVALHO, A. B.; PEREIRA, P. A. P. Emission profiles of carbonyl compounds at a Brazilian charcoal plant. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v 23, p. 1606-1613, **2012**.

ANWAR F.; KAZI T. G.; SALEEM R.; BHANGER M. I.; Rapid determination of some trace metals in several oils and fats. *Grasas y aceites*, v. 55, n. 2, p. 160-168, **2004**.

ARAÚJO, J. M. A. Química de alimentos: teoria e prática. UFV, 4ª Ed. p.478, **2008**.

ARTZ, W. E.; OSIDACZ P. C.; COSCIONE A. R. Acceleration of the thermoxidation of oil by heme iron. [Journal of the American Oil Chemists' Society](#), v. 82, n. 2, p. 579-584, **2005**.

AYLÓN, M. A. Y. Estudio de utilización de aceites para fritura en establecimiento alimentarios de comidas preparadas. Disponível em: <

<http://avdiaz.files.wordpress.com/2008/08/mangeles-aylon-blog.pdf>>Acesso em: 10 de maio de **2014**.

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

BENEDET, J. A.; SHIBAMOTO, T. Role of transition metals, Fe (II), Cr (III), Pb (II), and Cd (II) in lipid peroxidation. *Food Chemistry*, v. 107, p. 165-168, **2008**.

BENEVIDES, C. M. J.; VELOSO, M. C. C.; PEREIRA, P. A. P.; ANDRADE, J. B. A. Chemical study of  $\beta$ -carotene oxidation by ozone in an organic model system and the identification of the resulting products. *Food Chemistry*, v.126, p. 927-934, **2011**.

BLUMENTHAL, M. A New look at the chemistry and physical of deep-fat frying. *Food Techonogy*, v. 45, n. 3, p. 68-71, **1991**.

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

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde Brasil (ANVISA). Informe Técnico nº 11, de 5 out. **2004a**. Óleos e gorduras utilizados em frituras. Disponível em:< [http://anvisa.gov.br/alimentos/informes/11\\_051004.htm](http://anvisa.gov.br/alimentos/informes/11_051004.htm)>. Acesso em maio de 2014

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde Brasil (ANVISA), Resolução RDC nº 216, de 15 de set. **2004b**. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Disponível em < [http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT\\_VERSION&id=12546](http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?mode=PRINT_VERSION&id=12546)>. Acesso em maio de 2014

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégias e discussão. *Revista Ecotoxicol. e Meio ambiente*, v.3, p.129-146, **2003**.

BROSKOU, G.; SALTA, F. N.; CHIOU, A.; TRULLIDOU, E.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Content of trans, trans-2,4-decadienal in deep-fried and pan-fried potatoes. *European Journal of lipid science and technology*, v. 108, n. 2, p. 109-115, **2006**.

CAMPESTRE INDÚSTRIA E COMÉRCIO DE ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em: [http://www.campestre.com.br/oleos\\_vegetais.shtml](http://www.campestre.com.br/oleos_vegetais.shtml). Acessado em: Maio de **2014**.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Química Nova*, v. 27, n. 1, p. 146-156, **2004**.

CELLA, R. C. F.; RERTANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTP, M. H. F. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, v. 22, p. 111-116, **2002**.

CHANG, L. W.; LO, W.; LIN, P. Trans, trans-2,4-decadienal, a product found in cooking oil fumes, induces cell proliferation and cytokine production due to reactive oxygen species in human bronchial epithelial cells. *Toxicological Sciences*, v. 8, n. 2, p. 337-343, **2005**.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Food science and food safety*, v. 5, n.4, p.169-186, **2006**

CHOE, E.; MIN, D. B. Chemistry of deep-fat frying oils. *Journal of Food Science*, v. 72, n. 5, p. 77- 89, **2007**.

CORSINI, M. S.; JORGE, N. Perfil de ácidos graxos e avaliação da alteração em óleos de fritura. *Química Nova*, v. 31, n 5, p. 956-961, **2008**

COSCIONE, A. R.; ARTZ, W. Vegetable oil stability at elevated temperatures in the presence of ferric stearate and ferrous octanoate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 6, p. 2088-2094, **2005**.

da SILVA, T. O. Estudo da emissão de aldeídos e COVs por óleos de dendê e soja, em diferentes condições de aquecimento na temperatura de processos de fritura. Dissertação (Mestrado em Química – Química Analítica). Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia. Salvador, **2007**.

da SILVA, T. O.; PEREIRA, P. A. de P. Influence of Time, Surface-to-Volume Ratio and Heating Process (Continuous or Intermittent) on the Emission Rates of Selected Carbonyl Compounds during Thermal Oxidation of Palm and Soybean Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 56, n. 9, p. 3129-3135, **2008**.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <[www.embrapa.org.br](http://www.embrapa.org.br)>. Acesso em: 15 abr. **2014**.

FERRARI, C. K. B. Lipid oxidation in food and biological systems: general mechanisms and nutritional and pathological implications *Revista Nutrição*, v. 11, n. 1, **1998**.

FRANKEL, E. N. Lipid oxidation. *Progress in Lipid Research*, v. 19, n. 2, p. 1-22, **1980**.

FREIRE, P. C. M.; MANCINI-FILHO, J.; FERREIRA, T. A. P. C. Major physical and chemical changes in oils and fats used for deep frying: regulation and effects on health. *Revista Nutrição*, v. 26, n. 3, p. 353-368, **2013**.

GUILLEN, M. D.; RUIZ, A. Formation of hydroperoxy- and hydroxyalkenals during thermal oxidative degradation of sesame oil monitored by proton NMR. *European Journal Lipid Science. Technol*, v. 106, p. 680–687, **2004**.

GUILLEN, M. D.; GOICOECHEA E. Formation of oxygenated  $\alpha$ - $\beta$ -unsaturated aldehydes and other toxic compounds in sunflower oil oxidation at room temperature in closed receptacles. *Food Chemistry*, v. 111, n. 1, p. 157–164, **2008**.

GUILLEN, M. D; URIARTE, P. S. Aldehydes contained in edible oils of a very different nature after prolonged heating at frying temperature: Presence of toxic oxygenated  $\alpha$ ,  $\beta$  unsaturated aldehydes. *Food Chemistry*, v. 131, n. 3 p. 915-926, **2012**.

GUILLEN, M. D.; GOICOECHEA.; Encarnación A. M. Y.; A review of degradation of food lipids studied by H NMR spectroscopy: influence of degradative conditions and food lipid nature. *Food Science and Food Safety*, v. 13, n. 5, p. 838-859, **2014**.

HAJSLOVÁ, J.; ZROSTLIKOVÁ, J. Matrix effects in (ultra) trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *Journal of Chromatography A*, v. 1000, n. 1-2, p.181-197, **2003**

HAN H.; CSALLANY, A. S. Temperature dependence of HNE formation in vegetable oils and butter oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 85, n. 4, p 777-782, **2008**.

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial; Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOG-CGCRE-008, **2007**.

JORGE, N.; JANIÉRI, C. Avaliação do óleo de soja submetido ao processo de fritura de alimentos diversos. *Ciências e Agrotecnologia*, Lavras, v. 29, n. 5, p. 1001-1007, **2005**.

JORGE, N.; SOARES, B. B. P.; LUNARDI, V. M. Alterações físico-químicas dos óleos de girassol, milho e soja em frituras. *Química Nova*, v. 28, n. 6, p. 947-951, **2005**.

KATRAGADDA, H. R.; FULLANA, A.; SIDHU, S.; CARBONELL-BARRACHINA, A. A. Emissions of volatile aldehydes from heated cooking oils. *Food Chemistry*, v. 120, n.1, 59-65, **2010**.

KORN, M.; de ANDRADE, M. V. A. S.; BORGES, S. S. Procedimentos analíticos assistidos por ultra-som. *Revista Anatytica*, n. 3, p. 34-39, **2003**

KRUBE, A.; LEITO, I.; HERODES, K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: the extrapolative dilution approach. *Analytica Chimica*, v. 651, p. 75-80, **2009**.

LA PERA, L., LO COCO, F., MAVROGENI, E., GIUFRIDA, D., DUGO, G. Determination of copper (II), lead (II), cadmium (II) and zinc (II) in virgin olive oils produced in Sicily and Apulia by derivative potentiometric stripping analysis. *Journal of Food Science*, v. 14, n. 4, p. 389-399, **2002**.

LEITE, F. Validação em Análise Química. Campinas, Editora Átomo, 5ª Ed, 347p. **2008**.

LIMA, J. R.; GONÇALVES, L. A. G. Parâmetros de avaliação da qualidade de óleo de soja para fritura. *Química Nova*, v. 17, n. 3, p. 392-396, **1994**.

LIMA, J. R.; GONÇALVES, L. A. G. Avaliação analítica de óleos utilizados em processo de frituras. *SBCTA*, V. 29 n. 2 p.186-192, **1995**.

LIPID LIBRARY: Oils and fats in the market place non-food uses. Disponível em: <http://www.lipidlibrary.aocs.org/market/nonfood>. Acesso em maio de **2014**.

LIU, W.H.; INBARAJ, S. B.; CHEN, B.H. Analysis and formation of trans fatty acids in hydrogenated soybean oil during heating. *Food Chemistry*, v. 104, n. 4, p. 1740–1749, **2007**.

LOUREIRO, A. N. M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G. Química Formação de adutos exocíclicos com base de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 777-793, **2002**.

MACHADO, E. R.; GARCÍA M. C. D. D.; ABRANTES S. M. P. de. Alterações dos óleos de palma e de soja em frituras descontínuas de batata. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 2, n. 4, p.786-792, **2008**.

MENDONÇA, M. A. Alterações físico-químicas em óleos de soja submetidos ao processo de fritura em unidade de produção de refeição no Distrito Federal. **Comunidade em Ciências da Saúde**, v. 19, n.2, p. 115-122, **2008**.

MENEZES FILHO, A.; SANTOS, F. N.; PEREIRA, P.A.P. Development, validation and application of a methodology based of solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes. **Talanta**, v. 81, p. 346-354, **2010**.

MIOR, R. D.; BIANCHIN, J. N.; CARAEK, E.; MARTENDAL, E. Desenvolvimento de um método analítico baseado em microextração líquido-líquido para determinação de cromo (VI) em amostras aquosas com detecção por espectrometria de absorção atômica em chama. **Química Nova**, v. 36, n. 7, p. 942-946, **2013**.

MORETTO, E.; FEET, R. Tecnologia de Óleos e Gorduras vegetais na Indústria de Alimentos. São Paulo: Varela Editora e Livraria, **1998**.

NEGISHI H, NISHIDA M, ENDO Y, FUJIMOTO K. Effect of a modified deep-fat fryer on chemical and physical characteristics of frying oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 2, **2003**.

NUNES, L. S.; BARBOSA, J. T. P.; FERNANDES, A. P.; LEMOS, V. A.; SANTOS, W. N. L.; KORN, M. G.; TEXEIRA, L. S. G. Multi-element determination of Cu, Fe, Ni and Zn content in vegetable oils samples by high-resolution continuum source atomic



absorption spectrometry and microemulsion sample preparation. *Food Chemistry*, v. 127, n. 2, p.780–783, **2011**.

OETTERER, M.; RERTANO-D' ARCE, M. A. B.; SPOTP, M. H. F. Fundamentos de Ciências e Tecnologia de alimentos. Barueri: Manole, **2006**.

PAZ, I.; MOLERO, M. Catalytic Effect of Solid Metals on Thermal Stability of Olive Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 77, n. 2, p.127-130, **2000**.

PEREDA, J. A. O.; RODRIGUEZ, M. I. C.; ALVAREZ, L. F.; SANZ, M. L. G.; MIGUILLON, G. D. G. F. PERALES, L. L. H. CORTECERO, M. D. S. Tecnologia de alimentos. Componentes dos alimentos e processos. Artmed, v. 1, p. 33-49. **2005**.

PINTO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. . R. SILVÉRIO, F. O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. *Química Nova*, v. 32, p. 987-995, **2009**.

PRYOR ,W.A.; PORTER, N. A. Suggested mechanisms for the production of 4-hydroxy-2-nonenal from the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 8, pp. 541-543, **1990**.

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

REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. *Revista Analytica*, v. 27, p. 60-67, **2007**

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. ; JARDIM, I. C. S. F. ; MELO, L. F. C. Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n 5, p. 771-780, **2004**.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLE, E. A. G. Química de Alimentos. 2ª ed. São Paulo: Edgard Blucher, 184 p., **2007**.

ROCHA, A. M.; SILVA, M. S.; QUINTELA, C. M. A.; TORRES, E. A. Indicadores científicos e tecnológicos em biodiesel na Bahia: Panorama sobre grupos de pesquisas do CNPq e pesquisadores da RBTB. **Revista Economia & Tecnologia**, v. 9, n 3, p 39-54, **2013**.

SANIBAL, E. A. A.; MANCINI FILHO, J. Alterações físicas químicas e nutricionais de óleos submetidos ao processo de fritura. **Food Ingredients South American**, São Paulo. v. 18, p. 67-71, **2002**.

SANIBAL, E. A. A.; MANCINI FILHO, J. Perfil de ácidos graxos trans de óleo e gordura hidrogenada de soja no processo de fritura. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 27-31, **2004**.

SCHNEIDER C.; TALLMAN K. A.; PORTER N. A.; BRASH A. R.; Two distinct pathways of formation of 4-hydroxynonenal. Mechanisms of nonenzymatic transformation of the 9- and 13-hydroperoxides of linoleic acid to 4-hydroxyalkenals. **Journal Biological Chemistry**, v. 276, n. 24, p. 20831–20838, **2001**.

SEAMAN, V. Y.; BENNETT, D. H.; CAHILL T. M. Origin, Occurrence, and source emission rate of acrolein in Residential Indoor Air. **Environmental Science Technology**, v. 41, p. 6940-6946, **2007**.

SEAMAN, V. Y.; BENNETT, D. H.; CAHILL T. M. Indoor acrolein emission and decay rates resulting from domestic cooking events. **Atmospheric Environment**, v. 43, n. 39, p. 6199–6204, **2009**.

SEPPANEN C.M.; CSALLANY, A. S Simultaneous determination of lipophilic aldehydes by high-performance liquid chromatography in vegetable oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 12, p. 1253 - 1260, **2001**

SEPPANEN C.M.; CSALLANY, A. S. Incorporation of the Toxic aldehyde 4-hydroxy-2-*trans*-nonenal into Food Fried in Thermally Oxidized Soybean Oil *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 81, n. 12, p. 1137-1141, **2004**

SEPPANEN C.M.; CSALLANY, A. S. The effect of intermittent and continuous heating of soybean oil at frying temperature on the formation of 4-hydroxy-2-*trans*-nonenal and other  $\alpha$ -,  $\beta$ -unsaturated hydroxyaldehydes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 83, n. 2, p. 121-127, **2006**.

STATISTICS, The statistics Portal. Disponível em: <http://www.statista.com/statistics/263937/vegetable-oils-global-consumption/>. Acesso em maio de 2014.

UCHIDA, K. Review: 4-hidroxy-2-nonenal: Product na mediator of oxidative stress. *Progress in lipid research*, v. 42, p. 318-343, **2003**.

WARNER, K. Chemistry of frying oils. In AKOH, C. I; MIN, D. B. Food lipid: chemistry, nutrition and biotechnology. New York: Marcel Dekker, 2<sup>a</sup> Ed.. Chap. 7, p. 205-221, **2002**.

VELOSO, M. C. C. Compostos orgânicos voláteis e ácidos graxos em peixes marinhos. Tese (Doutorado em Química – Química Analítica) Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia. Salvador, **2005**.

VERGARA, P. WALLY, A. P.; PESTANA, V. R.; BASTOS, C.; ZAMBIAZI, R. C. Estudos do comportamento de óleo de soja e de arroz reutilizados em frituras sucessivas de batata. *B. CEPPA*, v. 24, n. 1, p. 207-220, **2006**.

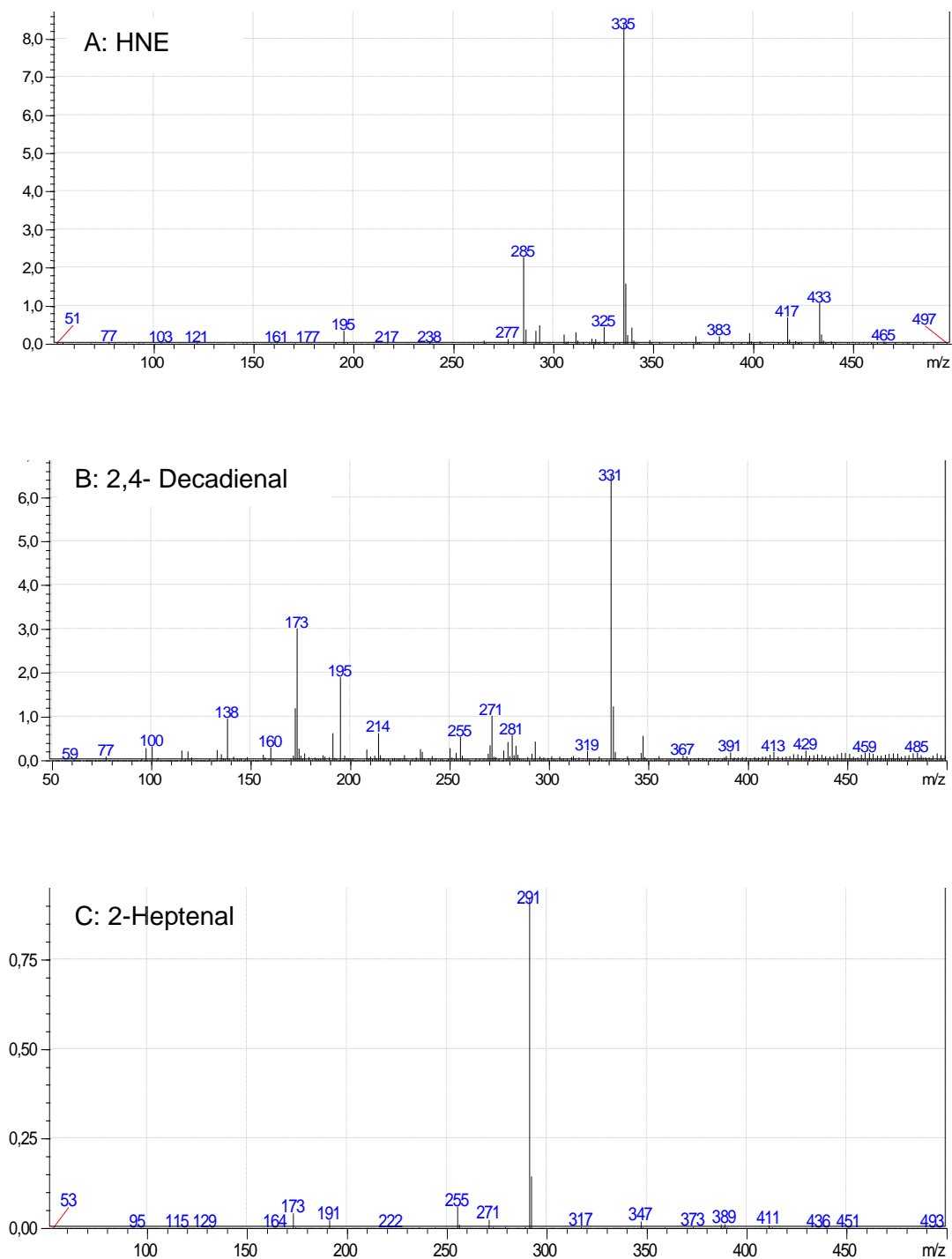
VIEIRA, F. S. V.; REBOLÇAS, M. V.; ANDRADE, J. B. Determinação de compostos carbonílicos e carboxílicos em derivados de petróleo. *Química Nova*. v. 35, n. 8, p. 1644-1656, **2012**

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

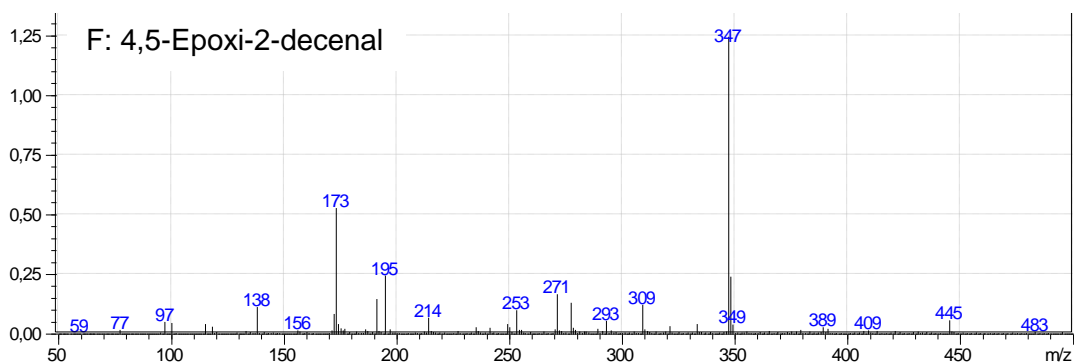
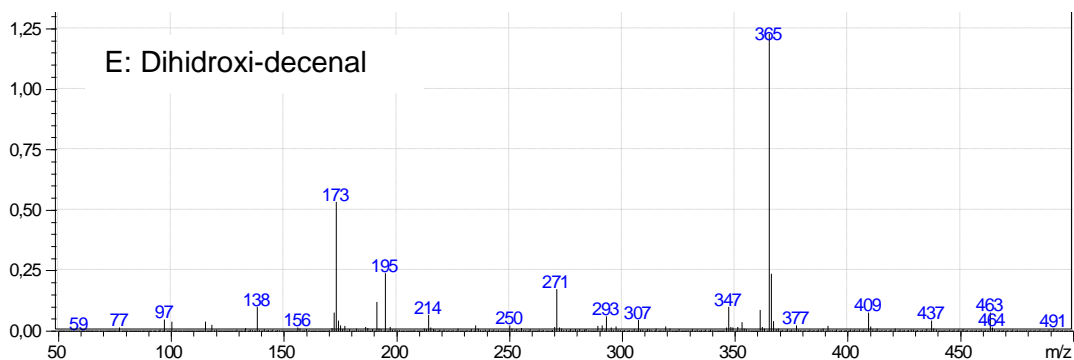
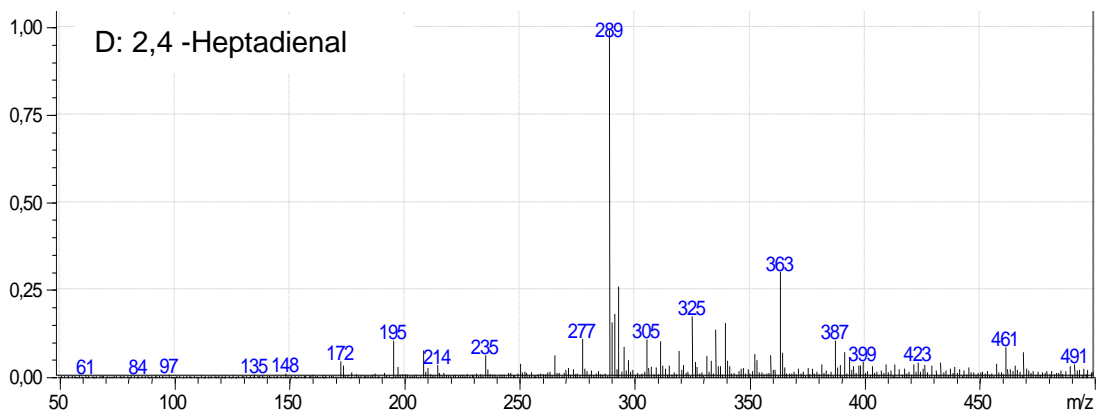
ZHU, X.; WANG, K.; ZHU, J.; KOGA, M. Analysis of cooking oil fumes by ultraviolet spectrometry and gas chromatography-mass spectrometry. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 49, n. 10, p. 4790-4794, **2001**.

## 9.0 ANEXOS

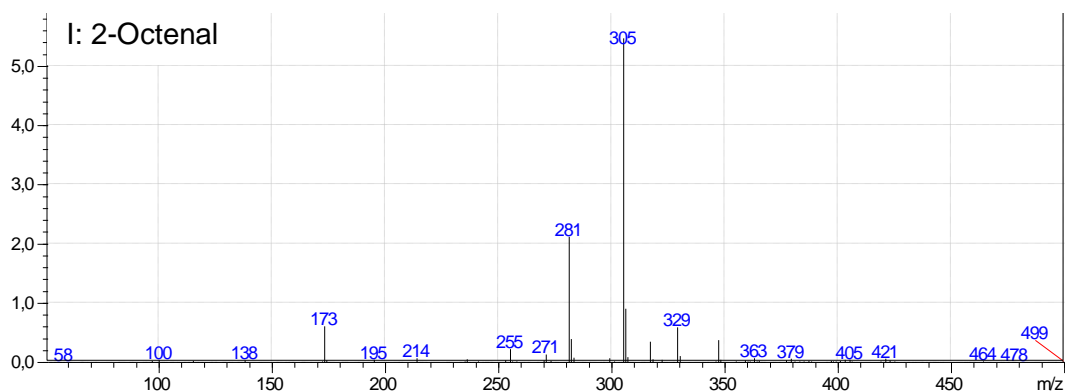
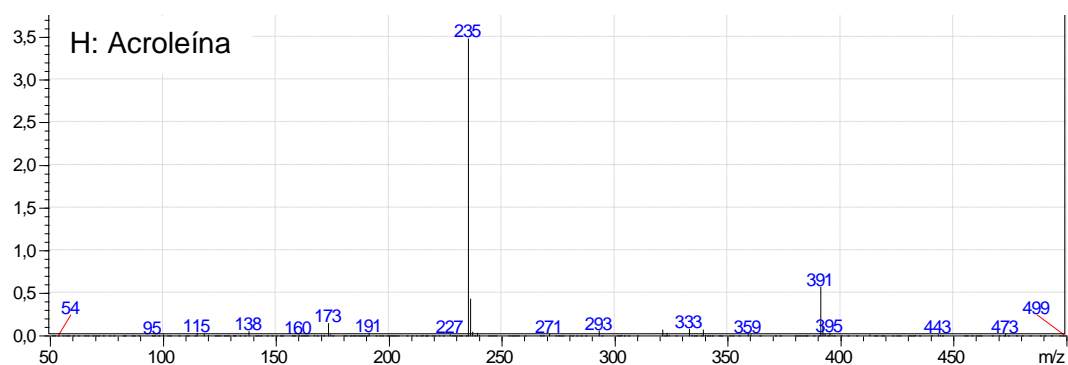
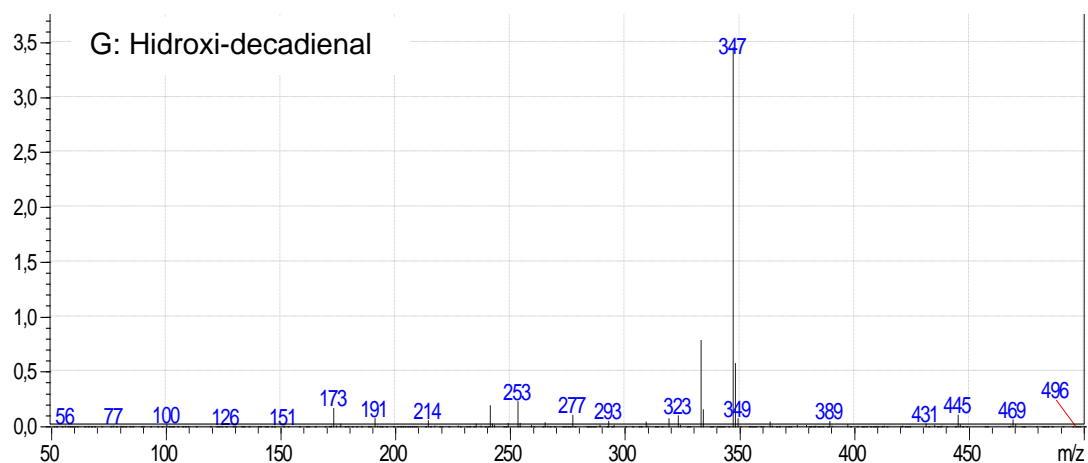
### 9.1 ANEXO A



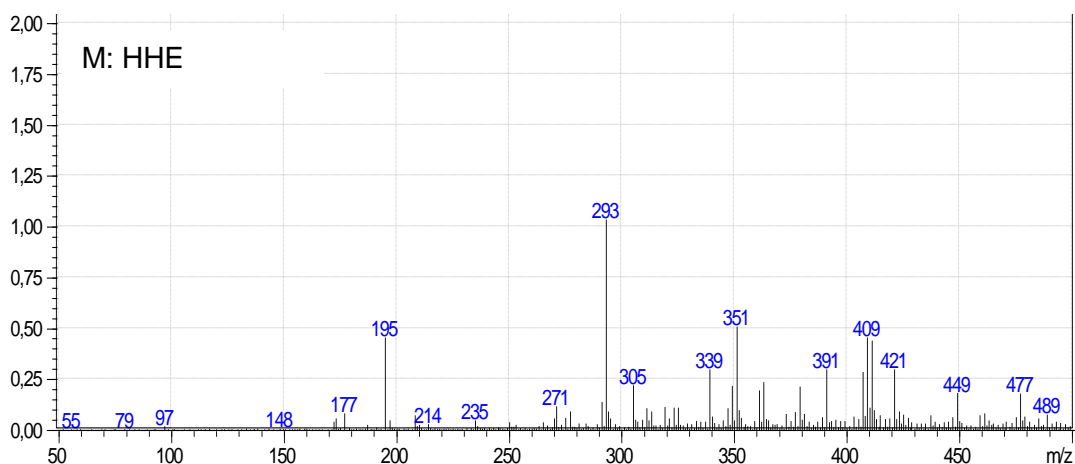
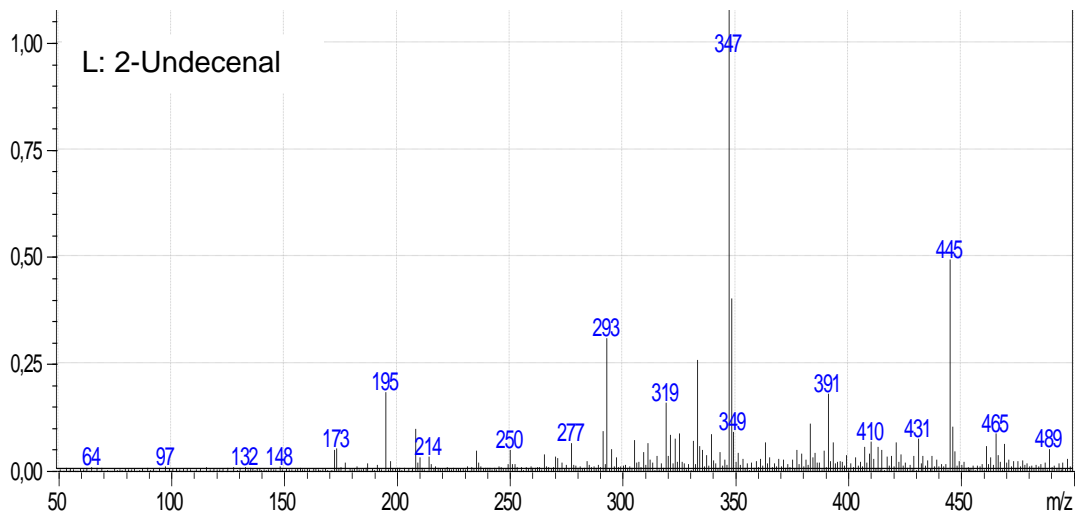
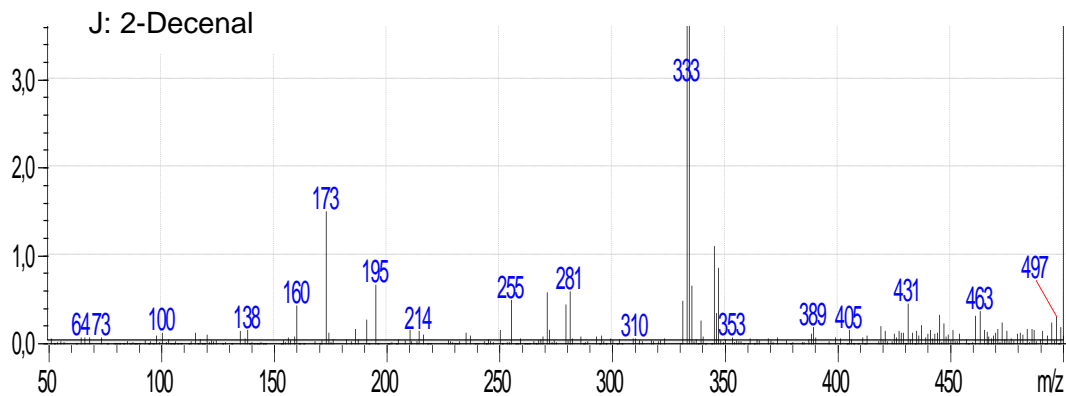
**Figura 1:** Espectros de massas, referente as hidrazonas de: (A) HNE; (B) 2,4-decadienal; (C) 2-heptenal; (D) 2,4-heptadienal; (E) dihidroxi-decenal; (F) 4,5-epoxi-2-decenal; (G) hidroxi-decadienal; (H) acroleína; (I) 2-octenal; (J) 2-decenal; (L) 2-undecenal e (M) HHE, no modo de ionização negativa, obtidos a partir do cromatograma da Figura 29 (continua).



**Figura 1:** Espectros de massas, referente as hidrazonas de: (A) HNE; (B) 2,4-decadial; (C) 2-heptenal; (D) 2,4-heptadienal; (E) dihidroxi-decenal; (F) 4,5-epoxi-2-decenal; (G) hidroxi-decadial; (H) acroleína; (I) 2-octenal; (J) 2-decenal; (L) 2-undecenal e (M) HHE, no modo de ionização negativa, obtidos a partir do cromatograma da Figura 29 (continuação).



**Figura 1:** Espectros de massas, referente as hidrazonas de: (A) HNE; (B) 2,4-decadienal; (C) 2-heptenal; (D) 2,4-heptadienal; (E) dihidroxi-decenal; (F) 4,5-epoxi-2-decenal; (G) hidroxi-decadienal; (H) acroleína; (I) 2-octenal; (J) 2-decenal; (L) 2-undecenal e (M) HHE, no modo de ionização negativa, obtidos a partir do cromatograma da Figura 29 (continuação).



**Figura 1:** Espectros de massas, referente as hidrazonas de: (A) HNE; (B) 2,4-decadienal; (C) 2-heptenal; (D) 2,4-heptadienal; (E) dihidroxi-decenal; (F) 4,5-epoxi-2-decenal; (G) hidroxidecadienal; (H) acroleína; (I) 2-octenal; (J) 2-decenal; (L) 2-undecenal e (M) HHE, no modo de ionização negativa, obtidos a partir do cromatograma da Figura 29 (continuação).



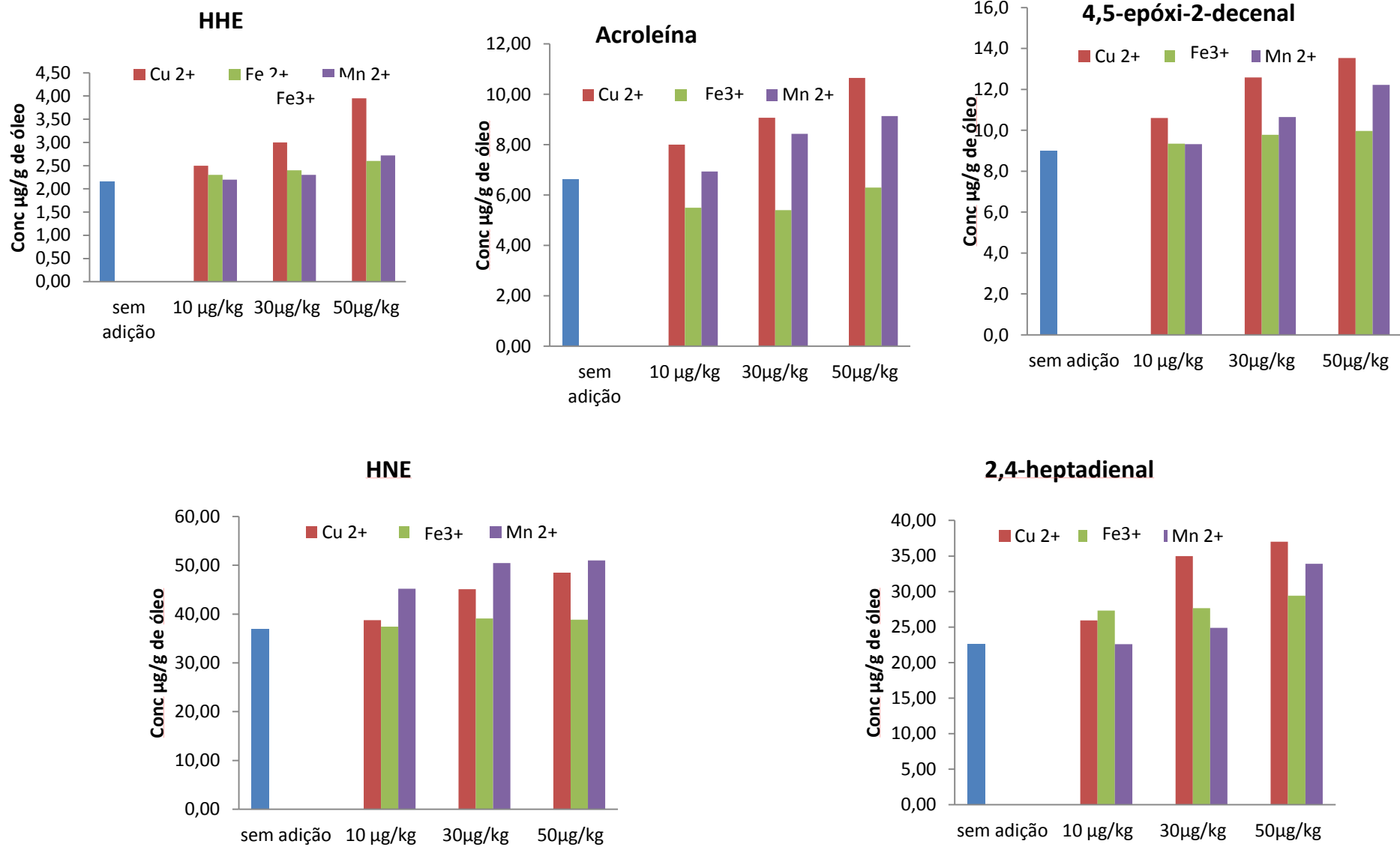
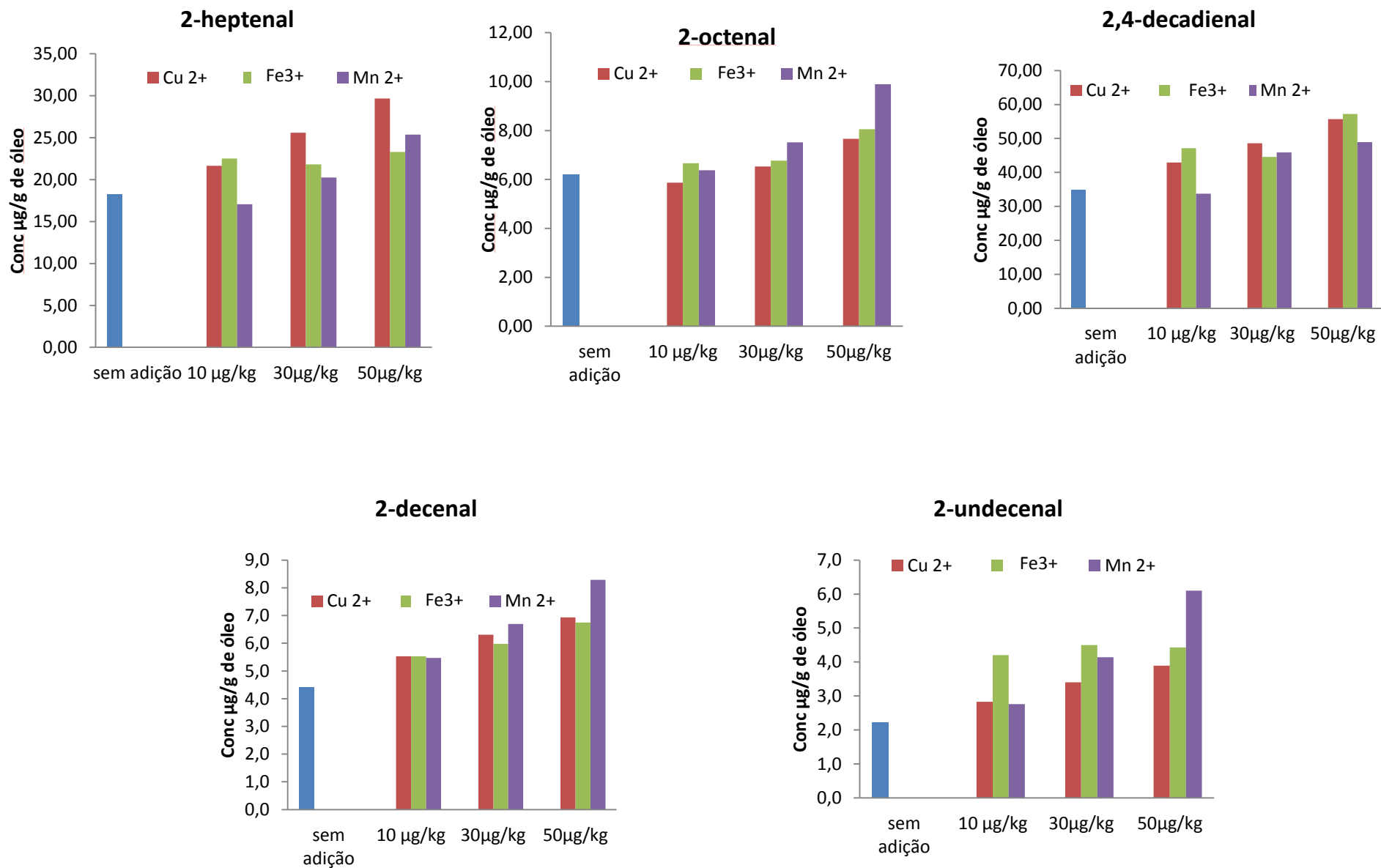
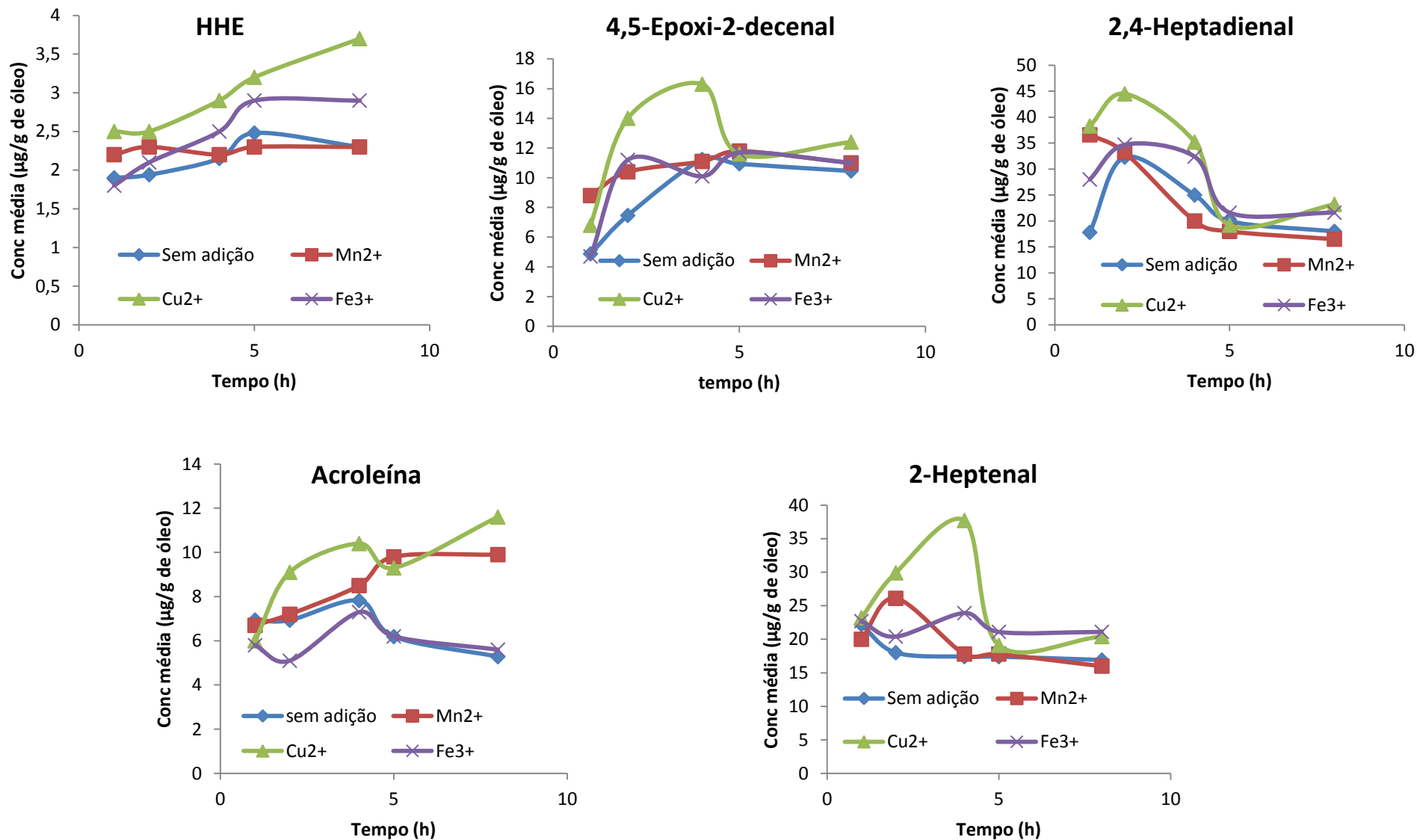


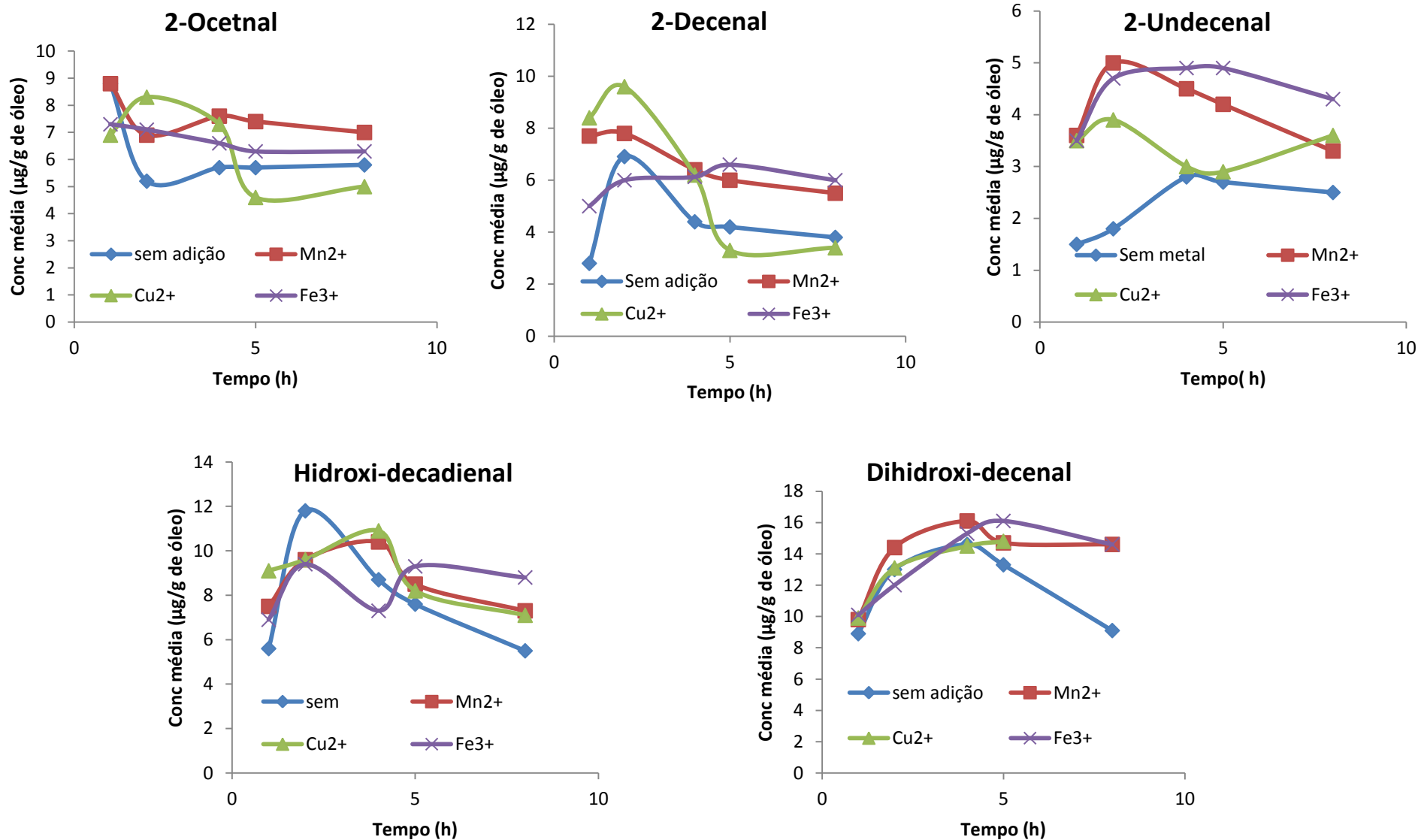
Figura 2: Concentrações médias do CC em função do tipo e da concentração dos íons metálicos (continua).



**Figura 2:** Concentrações médias do CC em função do tipo e da concentração dos íons metálicos.



**Figura 3.** Perfil de concentração dos CC em função do tempo de aquecimento do óleo, sem e com adição dos íons de  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , e  $Cu^{2+}$  na concentração de  $30 \mu g.kg^{-1}$  de óleo (continua).



**Figura 3.** Perfil de concentração dos CC em função do tempo de aquecimento do óleo, sem e com adição dos íons de  $Mn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ , e  $Cu^{2+}$  na concentração de  $30 \mu g.kg^{-1}$  de óleo (continuação).

## 9.2 ANEXO B

**Tabela 1.** Concentração dos CC em função do tempo de aquecimento.

CC	Concentração dos CC ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de óleo)				
	1h	2h	4h	6h	8h
HHE	1,90	1,94	2,15	2,48	2,3
Acroleína	6,94	6,93	7,82	6,19	5,28
4,5-Epoxi-2-decenal	4,88	7,46	11,23	10,94	10,46
HNE	26,1	27,9	44,5	44,0	42,1
2,4-Heptadienal	17,8	32,3	25,0	20,0	18,0
2-Heptenal	22,2	18,0	17,4	17,4	16,9
2-Octenal	8,8	5,2	5,7	5,7	5,8
2,4-Decadienal	33,2	45,7	42,4	29,4	23,1
2-Decenal	2,8	6,91	4,4	4,2	3,8
2-Undecenal	1,5	1,8	2,8	2,7	2,5
Diidroxidecenal	8,9	13,0	14,6	13,3	9,1
Hidroxi-decadienal	5,6	11,8	8,7	7,6	5,5

**Tabela 2.** Concentrações médias dos CC referente às cinco amostragens (1, 2, 4, 6 e 8 horas de aquecimento).

CC	Concentração média ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de óleo)
HHE	2,15
Acroleína	6,63
4,5-Epoxi-2-decenal	9,00
HNE	36,92
2,4-Heptadienal	22,62
2-Heptenal	18,40
2-Octenal	6,24
2,4-Decadienal	34,76
2-Decenal	4,42
2-Undecenal	2,3
Diidroxidecenal	11,8
Hidroxi-decadienal	7,8
Somatório das médias	162,94

**Tabela 3:** Concentrações médias dos CC com adição de  $Mn^{2+}$ , médias referentes às cinco amostragens (1, 2, 4, 6 e 8 horas de aquecimento)

CC	Concentração média dos CC ( $\mu g.g^{-1}$ de óleo)		
	10 $\mu g.kg^{-1}$ de óleo	30 $\mu g.kg^{-1}$ de Óleo	50 $\mu g.kg^{-1}$ de Óleo
HHE	2,2	2,3	2,7
Acroleína	6,9	8,4	9,1
4,5-Epoxi-2-decenal	9,3	10,6	12,2
HNE	45,2	50,5	51,0
2,4-Heptadienal	22,0	24,9	33,9
2-Heptenal	16,1	19,5	25,8
2-Octenal	6,4	7,5	9,9
2,4-Decadienal	33,7	45,9	48,9
2-Decenal	5,5	6,7	8,3
2-Undecenal	2,7	4,1	6,1
Diidroxidecenal	13,9	13,9	13,9
Hidroxi-decadienal	7,8	8,67	9,82
Somatório das médias	171,5	203,0	231,6

**Tabela 4:** Concentrações médias dos CC com adição de  $Cu^{2+}$ , médias referentes às cinco amostragens (1, 2, 4, 6 e 8 horas de aquecimento)

CC	Concentração média dos CC ( $\mu g.g^{-1}$ de óleo)		
	10 $\mu g.kg^{-1}$ de óleo	30 $\mu g.kg^{-1}$ de Óleo	50 $\mu g.kg^{-1}$ de Óleo
HHE	2,5	3,0	3,9
Acroleína	8,1	9,4	10,6
4,5-Epoxi-2-decenal	10,6	12,2	13,5
HNE	38,7	46,1	48,5
2,4-Heptadienal	25,8	32,1	37,0
2-Heptenal	21,7	26,1	29,7
2-Octenal	5,9	6,4	7,6
2,4-Decadienal	42,8	48,6	55,7
2-Decenal	5,5	6,2	6,9
2-Undecenal	2,8	3,4	3,9
Diidroxidecenal	10,2	13,1	13,2
Hidroxi-decadienal	8,2	9,0	10,7
Somatório	182,7	215,5	241,2

**Tabela 5:** Concentrações médias dos CC com adição de Fe<sup>3+</sup>, médias referentes às cinco amostragens (1, 2, 4, 6 e 8 horas de aquecimento)

CC	Concentração média dos CC ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de óleo)		
	10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de óleo	30 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de Óleo	50 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de Óleo
HHE	2,3	2,4	2,6
Acroleína	5,5	5,4	6,3
4,5-Epoxi-2-decenal	9,3	9,7	10,0
HNE	37,4	39,1	38,8
2,4-Heptadienal	27,3	27,7	29,4
2-Heptenal	22,5	21,8	23,3
2-Octenal	6,8	6,7	8,0
2,4-Decadienal	47,1	44,6	57,2
2-Decenal	5,5	5,9	6,7
2-Undecenal	4,2	4,5	4,4
Diidroxí-decenal	11,8	13,6	13,7
Hidroxí-decadienal	7,5	8,4	8,8
Somatório das médias	187,2	189,8	209,2

**Tabela6.** Concentração dos CC em função do tempo de aquecimento com adição de Mn<sup>2+</sup> na concentração de 10  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  de óleo.

CC	Concentração dos CC ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de óleo)				
	1h	2h	4h	6h	8h
HHE	2,2	2,33	2,2	2,3	2,2
Acroleína	6,5	7,1	7,5	6,8	6,7
4,5-Epoxi-2-decenal	7,4	8,0	10,9	10,1	10,2
HNE	28,6	41	60,1	46,1	50,2
2,4-Heptadienal	32,9	29,2	16,3	16,7	15,1
2-Heptenal	20,9	21,5	12,8	12,8	12,7
2-Octenal	8,3	6,8	6,5	5,0	5,2
2,4-Decadienal	45,3	35,8	34,5	27,8	25,2
2-Decenal	7,3	6,9	5,1	4,3	3,8
2-Undecenal	2,3	4,4	3,4	1,9	1,7
Diidroxí-decenal	9,6	15	16,7	14,4	13,7
Hidroxí-decadienal	7,3	8,8	9,1	8,2	5,7

**Tabela 7.** Concentração dos CC em função do tempo de aquecimento com adição de  $Mn^{2+}$  na concentração de  $30 \mu g.kg^{-1}$  de óleo.

CC	Concentração dos CC ( $\mu g.g^{-1}$ de óleo)				
	1h	2h	4h	6h	8h
HHE	2,2	2,3	2,2	2,3	2,3
Acroleína	6,7	7,2	8,5	9,8	9,9
4,5-Epoxi-2-decenal	8,8	10,4	11,1	11,8	11,0
HNE	32,5	43,2	60,4	56,0	60,2
2,4-Heptadienal	36,6	33,2	20,0	18,0	16,5
2-Heptenal	20,0	26,1	17,8	17,8	16,0
2-Octenal	8,8	6,9	7,6	7,4	7,0
2,4-Decadienal	61,3	58,8	40,2	36,7	32,3
2-Decenal	7,7	7,8	6,4	6,0	5,5
2-Undecenal	3,6	5,0	4,5	4,2	3,3
Diidroxidecenal	9,8	14,4	16,1	14,7	14,6
Hidroxi-decadienal	7,5	9,6	10,4	8,5	7,3

**Tabela 8.** Concentração dos CC em função do tempo de aquecimento com adição de  $Mn^{2+}$  na concentração de  $50 \mu g.kg^{-1}$  de óleo.

CC	Concentração dos CC ( $\mu g.g^{-1}$ de óleo)				
	1h	2h	4h	6h	8h
HHE	2,40	2,66	3,6	2,08	2,87
Acroleína	7,45	7,72	10,20	10,18	10,12
4,5-Epoxi-2-decenal	8,59	11,88	14,25	14,84	11,55
HNE	28,9	43,07	58,45	61,16	63,39
2,4-Heptadienal	38,92	38,63	35,54	33,19	23,28
2-Heptenal	20,35	26,32	28,93	28,93	24,51
2-Octenal	10,28	10,57	9,95	9,82	8,85
2,4-Decadienal	65,31	59,61	47,49	37,94	34,27
2-Decenal	9,63	9,73	9,53	6,6	5,96
2-Undecenal	3,33	6,01	6,11	6,95	8,08
Diidroxidecenal	13,4	17,3	14,1	13,7	12,8
Hidroxi-decadienal	8,8	11,9	12,2	9,1	7,1



**Tabela 9.** Concentração dos CC em função do tempo de aquecimento com adição de  $\text{Cu}^{2+}$  na concentração de  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de óleo.

CC	Concentração dos CC ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de óleo)				
	1h	2h	4h	6h	8h
HHE	2,5	2,4	2,5	2,8	2,3
Acroleína	5,7	8,4	7,3	8,9	9,70
4,5-Epoxi-2-decenal	7,4	11,3	13,2	10,0	11,0
HNE	33,8	37,7	48,2	35,8	38,2
2,4-Heptadienal	34,8	40,2	30,1	10,9	12,9
2-Heptenal	23,0	26,3	26,2	17,0	15,8
2-Octenal	6,1	7,4	6,3	4,3	5,2
2,4-Decadienal	53,2	50,1	41,9	36,2	32,4
2-Decenal	7,5	6,4	5,5	4,9	3,2
2-Undecenal	2,9	3,3	2,9	2,7	2,4
Diidroxi-decenal	10,5	13,2	10,4	9,3	7,6
Hidroxi-decadienal	8,9	9,4	8,2	7,0	7,4

**Tabela 10.** Concentração dos CC em função do tempo de aquecimento com adição de  $\text{Cu}^{2+}$  na concentração de  $30 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de óleo.

CC	Concentração dos CC ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de óleo)				
	1h	2h	4h	6h	8h
HHE	2,5	2,5	2,9	3,2	3,7
Acroleína	6,0	9,1	10,4	9,3	11,6
4,5-Epoxi-2-decenal	6,8	14,0	16,3	11,6	12,4
HNE	43,0	45,9	51,4	43,8	46,3
2,4-Heptadienal	38,3	44,5	35,2	19,2	23,2
2-Heptenal	23,2	29,9	37,7	19,1	20,4
2-Octenal	6,9	8,3	7,3	4,6	5,0
2,4-Decadienal	59,1	54,7	47,0	38,6	43,8
2-Decenal	8,4	9,6	6,2	3,3	3,4
2-Undecenal	3,5	3,9	3,0	2,9	3,6
Diidroxi-decenal	9,9	13,1	14,5	14,8	13,0
Hidroxi-decadienal	9,1	9,6	10,9	8,2	7,1

**Tabela 11.** Concentração dos CC em função do tempo de aquecimento com adição de  $\text{Cu}^{2+}$  na concentração de  $50 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de óleo.

CC	Concentração dos CC ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de óleo)				
	1h	2h	4h	6h	8h
HHE	3,1	4,6	4,4	3,7	3,9
Acroleína	6,7	10,6	12,3	11,6	12,0
4,5-Epoxi-2-decenal	8,9	15,0	16,8	12,4	14,5
HNE	42,7	51,6	56,9	46,3	45,1
2,4-Heptadienal	44,9	52,3	43,1	23,17	21,6
2-Heptenal	25,6	35,2	42,3	20,4	24,8
2-Octenal	9,5	9,3	8,5	5,0	5,9
2,4-Decadienal	69,8	65,4	57,2	43,8	42,2
2-Decenal	10,4	8,9	8,4	3,4	3,6
2-Undecenal	4,0	4,7	3,8	3,6	3,3
Diidroxidecenal	10,8	13,7	16,0	13,8	11,6
Hidroxi-decadienal	9,1	10,6	12,6	11,9	9,5

**Tabela 12.** Concentração dos CC em função do tempo de aquecimento com adição de  $\text{Fe}^{3+}$  na concentração de  $10 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de óleo.

CC	Concentração dos CC ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de óleo)				
	1h	2h	4h	6h	8h
HHE	1,6	1,7	2,3	2,8	2,9
Acroleína	6,7	1,7	7,2	6,0	6,0
4,5-Epoxi-2-decenal	5,1	10,1	9,9	11,0	10,6
HNE	26,2	33,3	44,2	43,6	39,8
2,4-Heptadienal	30,5	33,7	31,0	20,7	20,6
2-Heptenal	22,8	20,6	22,5	22,9	23,8
2-Octenal	7,1	7,4	6,9	6,4	6,0
2,4-Decadienal	54,7	58,3	48,7	40,2	33,7
2-Decenal	5,5	5,6	6,2	5,3	5,0
2-Undecenal	4,1	4,4	4,4	4,2	3,8
Dihidroxi-decenal	9,3	14,7	13,37	13,70	8,03
Hidroxi-decadienal	6,7	7,4	8,0	8,4	7,3

**Tabela 13.** Concentração dos CC em função do tempo de aquecimento com adição de Fe<sup>3+</sup> na concentração de 30 µg.kg<sup>-1</sup> de óleo.

CC	Concentração dos CC (µg.g <sup>-1</sup> de óleo)				
	1h	2h	4h	6h	8h
HHE	1,8	2,1	2,5	2,9	2,9
Acroleína	5,8	2,1	7,3	6,2	5,6
4,5-Epoxi-2-decenal	4,7	11,2	10,1	11,7	11,0
HNE	25,7	39,4	47,6	43,9	38,9
2,4-Heptadienal	28,0	34,7	32,4	21,6	21,6
2-Heptenal	22,7	20,4	23,9	21,1	21,1
2-Octenal	7,3	7,1	6,6	6,3	6,3
2,4-Decadienal	49,1	55,9	43,4	37,2	37,2
2-Decenal	5,0	6,0	6,13	6,6	6,0
2-Undecenal	3,5	4,7	4,9	4,9	4,3
Dihidroxi-decenal	10,1	12,0	15,3	16,1	14,6
Hidroxi-decadienal	6,9	9,4	7,3	9,3	8,8

**Tabela 14.** Concentração dos CC em função do tempo de aquecimento com adição de Fe<sup>3+</sup> na concentração de 50 µg.kg<sup>-1</sup> de óleo

CC	Concentração dos CC (µg.g <sup>-1</sup> de óleo)				
	1h	2h	4h	6h	8h
HHE	1,8	2,4	2,7	2,9	3,2
Acroleína	6,1	2,4	8,0	7,4	7,4
4,5-Epoxi-2-decenal	3,5	11,5	11,7	11,3	11,8
HNE	23,5	40,7	44,4	44,9	40,7
2,4-Heptadienal	33,5	34,3	33,0	21,6	24,7
2-Heptenal	23,8	22,9	25,3	22,1	22,4
2-Octenal	8,5	7,6	7,9	7,97	8,2
2,4-Decadienal	54,8	66,6	54,6	55,1	54,8
2-Decenal	6,4	6,7	7,1	6,7	6,8
2-Undecenal	3,8	4,1	5,2	4,7	4,4
Dihidroxi-decenal	11,9	13,7	15,1	14,4	13,4
Hidroxi-decadienal	8,6	9,1	9,5	9,3	7,7

