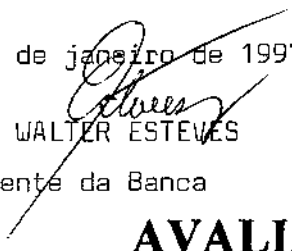


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por ROSELI APARECIDA FERRARI e aprova da pela Comissão Julgadora em 15.01.97.

Campinas, 15 de janeiro de 1997


Prof. Dr. WALTER ESTEVES

Presidente da Banca

**AVALIAÇÃO DE COMPONENTES
MINORITÁRIOS DE ÓLEOS VEGETAIS NOS
PROCESSOS TECNOLÓGICOS**

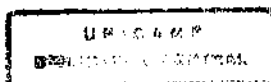
ROSELI APARECIDA FERRARI
Bióloga

PROF. DR. WALTER ESTEVES
Orientador

PROF. DR. KUMAR D. MUKHERJEE
Co-orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP para
obtenção do título de Doutora em Tecnologia de Alimentos

Campinas, 1997



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA	T/UNICAMP
F412a	
V. L.	
TOMBO B.	29.892
PROC.	281.97
C	☐ ☐ ☐ ☒
PREÇO	88,11 CC
DATA	29/04/97
N.º CPD	

CM-00099358-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

F412a Ferrari, Roseli Aparecida
Avaliação de componentes minoritários de óleos vegetais nos processos tecnológicos / Roseli Aparecida Ferrari –Campinas, SP: [s.n.], 1996.

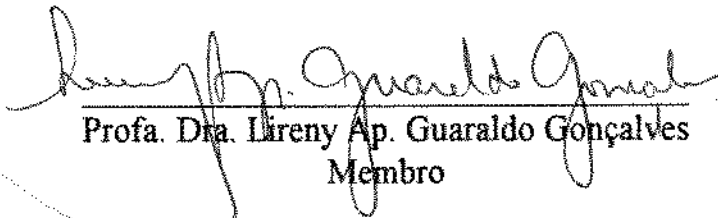
Orientador: Walter Esteves.
Co-orientador : Kumar D. Mukherjee.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Óleos vegetais. 2.Cromatografia de gás. 3.Cromatografia líquida de alta eficiência. I. Esteves, Walter. II. Mukherjee, Kumar D. III.. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Walter Esteves
Orientador



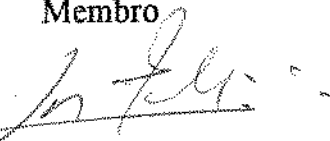
Profa. Dra. Lireny Ap. Guaraldo Gonçalves
Membro



Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Membro



Prof. Dr. Uígel de Almeida Lima
Membro



Dr. José Anibal Trujillo Quijano
Membro

Profa. Dra. Leonor Almeida de Souza Soares
Membro

Prof. Dr. Mário Sérgio Galhiane
Membro

Campinas, de Janeiro de 1997.

*Aos meus pais,
irmãos e sobrinhos
dedico*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Walter Esteves pela oportunidade de realizar mais este trabalho, pela sua valiosa orientação, pelos ensinamentos e amizade.

Meus sinceros agradecimentos ao Dr. Kumar D. Mukherjee pela sua construtiva orientação e suporte durante o período de minha estada na Alemanha.

Ao Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano e a Profa. Dra. Lireny Ap. Guaraldo Gonçalves, responsáveis pelo Laboratório de Óleos e Gorduras no Departamento de Tecnologia de Alimentos FEA UNICAMP, pela oportunidade, pelo apoio permanente e incentivo.

Eu gostaria de expressar minha gratidão ao Prof. Dr. S. Warwel por ter me consedido a oportunidade de trabalhar no "Bundesanstalt für Fettforschung Institut für Biochemie und Technologie der Fette" em Münster na Alemanha.

De uma forma geral gostaria de expressar minha gratidão a todos do "Bundesanstalt für Fettforschung", por tornar possível este trabalho.

Meu muito obrigado ao DAAD ("Deutsche Akademische Austauschdienst"), pelo suporte financeiro durante minha estada na Alemanha.

Ao Prof. Dr. E. Schulte do "Institut für Lebensmittelchemie der Universität Münster" pelo auxílio, pela oportunidade de trabalhar em seu instituto e pelas sugestões durante a execução deste trabalho.

Ao Dr. N. Weber pelas sugestões e auxílios prestados na execução da parte prática desta tese desenvolvida durante minha estadia na Alemanha.

As empresas Cocamar (Cooperativa de Cafeicultores e Agropecuaristas de Maringá Ltda) e Refinações de Milho Brasil Ltda, nas pessoas de Laura Zamberlan e Roberto Kazuo Yamakado pela gentileza no fornecimento das amostras.

Ao Dr. L. Brühl pelo auxílio na análise cromatográfica dos *trans* isômeros de ácidos graxos.

Ao Prof. José Salvador Barone pelo auxílio nas análises de metais.

De uma forma especial ao pessoal do Laboratório de Óleos e Gorduras da FEA, ao Renato, Rosana, Dona Luna, enfim todos que acompanharam este trabalho.

Aos membros da banca examinadora pelas correções e valiosas sugestões apresentadas.

Eu gostaria de agradecer de forma muito especial à minha família, meus amigos no Brasil e na Alemanha por seus permanentes encorajamentos e auxílios.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE TABELAS.....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE ABREVIACÕES.....	XIV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT.....	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1. Etapas do processamento tecnológico do refino químico clássico de óleos vegetais.....	8
2.1.1. Extração.....	8
2.1.2. Refino.....	8
2.1.2.1. Degomagem.....	8
2.1.2.2. Neutralização.....	9
2.1.2.3. Branqueamento ou clarificação.....	9
2.1.2.4. Desodorização.....	10
2.1.2.5. Winterização.....	10
2.1.3. Outros processos tecnológicos empregados na industrialização de óleos e gorduras.....	11
2.1.3.1. Modificação da composição química e propriedades físicas dos óleos e gorduras.....	11
a) Hidrogenação.....	11
b) Fracionamento.....	11

c) Interesterificação.....	12
c.1) Interesterificação catalisada quimicamente.....	13
c.2) Interesterificação catalisada por lipases.....	15
c.3) Métodos para avaliar reações de interesterificações.....	8
2.2. Principais compostos minoritários presentes em óleos e gorduras	19
2.2.1. Fosfolipídios.....	19
2.2.2. Cerídeos.....	20
2.2.3. Insaponificáveis.....	20
2.2.3.1. Triterpênicos e seus derivados.....	20
a) Alcoóis triterpênicos.....	21
b) 4-Metilesteróis.....	21
c) Esteróis.....	21
d) Esteróis esterificados.....	26
2.2.3.2. Vitaminas lipossolúveis.....	28
a) Vitamina E, tocoferóis e tocotrienóis.....	28
b) Vitamina D.....	31
2.2.3.3. Alcoóis graxos.....	32
2.2.3.4. Hidrocarbonetos.....	32
a) Hidrocarbonetos alifáticos.....	33
b) Hidrocarbonetos de origem terpênica.....	33
2.2.3.5. Carotenóides.....	33
2.2.3.6. Outros constituintes.....	34
2.2.4. Clorofilas e seus derivados.....	34
2.2.5. Produtos de alterações.....	35

2.2.5.1. Polímeros e dímeros e de triacilgliceróis.....	36
2.2.5.2. Esteroldienos.....	41
2.2.5.3. Ácidos graxos <i>trans</i>	45
2.2.6. Contaminantes.....	48
2.2.6.1. Pesticidas, herbicidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	49
2.2.6.2. Compostos metálicos	50
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1. Materiais.....	51
3.1.1.Matéria prima.....	51
3.1.2. Reagentes e enzimas.....	51
3.1.3. Substâncias radioativas.....	52
3.1.4. Equipamentos.....	52
3.2. Métodos.....	52
3.2.1. Extração dos lipídios em escala piloto.....	53
a) Extração por solvente.....	53
b) Extração por prensagem.....	53
3.2.2. Refino em planta piloto.....	53
a) Degomagem.....	53
b) Neutralização.....	53
c) Clarificação ou branqueamento.....	54
d) Desodorização.....	54
3.2.3. Determinação de tocoferóis e tocotrienóis	54
a) Preparo da amostra.....	54

b) Solução padrão.....	55
c) Sistema cromatográfico.....	55
d) Identificação e quantificação	55
3.2.4 Determinação da composição em ácidos graxos - incluindo <i>trans</i> isômeros.....	56
a) Preparo dos ácidos graxos livres.....	56
b) Preparo de ésteres metílicos dos ácidos graxos por derivatização.....	56
c) Fracionamento dos ésteres metílicos dos ácidos graxos através de CG capilar.....	56
3.2.5. Determinação de esteróis.....	57
3.2.6. Determinação de esteróis esterificados.....	59
a) Materiais e reagentes.....	59
b) Solução padrão.....	60
c) Preparo da amostra.....	60
d) Sistema cromatográfico.....	61
e) Cálculo dos resultados.....	61
f) Determinação da composição em ácidos graxos da fração de esteróis esterificados.....	62
g) Determinação da composição em esteróis da fração de esteróis esterificados.....	62
3.2.7. Determinação de esteroldienos.....	63
a) Materiais e reagentes.....	63
b) Solução padrão.....	63
c) Sistema cromatográfico.....	63
d) Preparo da amostra.....	64

e) Cálculo dos resultados.....	64
3.2.8. Determinação de triacilgliceróis poliméricos.....	64
a) Preparo da amostra.....	65
b) Sistema cromatográfico.....	65
c) Identificação e quantificação.....	65
3.2.9. Determinação de cobre e ferro.....	65
3.2.10. Determinação do teor de clorofila.....	65
3.2.11. Reações de interesterificação.....	65
a) Interesterificação química.....	65
b) Interesterificação enzimática.....	66
3.2.12. Análise dos produtos de reação de interesterificação.....	66
a) Hidrólise com lipase pancreática.....	66
b) Determinação de esteróis esterificados.....	67
c) Distribuição posicional dos ácidos graxos na molécula dos triacilgliceróis.....	67
d) Análise das substâncias radioativas.....	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
4.1. Composição de tocoferóis e tocotrienóis.....	69
4.2. Teor de ácidos graxos - incluindo <i>trans</i> isômeros.....	82
4.3. Composição em esteróis.....	90
4.4. Teor de esteróis esterificados	99
4.4.1. Ácidos graxos da fração de esteróis esterificados.....	103
4.4.2. Esteróis presentes na fração de esteróis esterificados.....	111
4.5. Esteróis totais, esterificados e livre.....	113

4.6. Teor de esteroldienos.....	116
4.7. Triacilgliceróis poliméricos.....	126
4.8. Teor de cobre e ferro.....	131
4.9. Teor de clorofila.....	132
4.10. Influência dos processos de interesterificação química e enzimática no teor de esteróis esterificados de óleos de milho, soja e canola.....	133
5. CONCLUSÕES.....	140
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	142

TABELAS

Tabela 1. Etapas do processo de refino	5
Tabela 2- Artefatos e impurezas no processamento de óleos e gorduras decorrentes de contaminação interna ou externa.....	7
Tabela 3. Principais esteróis associados à nomenclatura, comum e científica de acordo com a recomendação da IUPAC (1989).....	23
Tabela 4. Principais produtos de degradação olefínica de.....	42
Tabela 5- Esquema geral e condições analíticas utilizadas para identificação de esteróis.....	58
Tabela 6. Distribuição relativa de tocoferóis e tocotrienóis, em termos de porcentagem, em todas as etapas de refino industrial de óleo de milho.....	73
Tabela 7. Distribuição relativa de tocoferóis, em termos de porcentagem, em todas as etapas de refino industrial de óleo de soja.....	73
Tabela 8. Distribuição relativa de tocoferóis, em termos de porcentagem, em todas as etapas de refino industrial de óleo de canola.....	75
Tabela 9. Concentração de tocoferóis e tocotrienóis expressos em mg/100g de amostra de óleo de milho refinado em laboratório.....	78
Tabela 10. Distribuição relativa de tocoferóis e tocotrienóis, em termos de porcentagem, em todas as etapas de refino laboratorial de óleo de milho.....	78
Tabela 11. Concentração de tocoferóis expressos em mg/100g de amostra de óleo de soja refinado em laboratório.....	79
Tabela 12. Distribuição relativa de tocoferóis, em termos de porcentagem, em todas as etapas de refino laboratorial de óleo de soja.....	79
Tabela 13. Concentração de tocoferóis expressos em mg/100g de amostra de óleo de canola refinado em laboratório.....	80

Tabela 14. Distribuição relativa de tocoferóis, em termos de porcentagem, em todas as etapas de refino laboratorial de óleo de canola.....	80
Tabela 15. Teor de ácidos graxos, incluindo trans isômeros, em cada etapa do refino de óleo de milho procedente de indústria.....	83
Tabela 16. Teor de ácidos graxos, incluindo trans isômeros, em cada etapa do refino de óleo de soja procedente de indústria.....	84
Tabela 17. Teor de ácidos graxos, incluindo trans isômeros, em cada etapa do refino de óleo de canola procedente de indústria.....	85
Tabela 18. Teor de esteróis (mg/kg) óleo de milho proveniente de indústria...	92
Tabela 19. Teor de esteróis (%) óleo de milho proveniente de indústria.....	92
Tabela 20. Teor de esteróis (mg/kg) óleo de soja proveniente de indústria	93
Tabela 21. Teor de esteróis (%) óleo de soja proveniente de indústria.....	93
Tabela 22. Teor de esteróis (mg/kg) óleo de canola proveniente de indústria ..	94
Tabela 23. Teor de esteróis (%) óleo de canola proveniente de indústria.....	94
Tabela 24. Teor de esteróis (mg/kg) óleo de milho proveniente de refino em laboratório	95
Tabela 25. Teor de esteróis (%) óleo de milho proveniente de refino em laboratório	95
Tabela 26. Teor de esteróis (mg/kg) óleo de soja proveniente de refino em laboratório	96
Tabela 27. Teor de esteróis (%) óleo de soja proveniente de refino em laboratório	96
Tabela 28. Teor de esteróis (mg/kg) óleo de canola proveniente de refino em laboratório	97
Tabela 29. Teor de esteróis (%) óleo de canola proveniente de refino em laboratório	97

Tabela 30. Teor total de esteróis esterificados em amostras de óleos refinados em indústrias.....	105
Tabela 31. Teor total de esteróis esterificados em amostras refinadas em laboratório.....	107
Tabela 32. Composição em ácidos graxos na fração de esteróis esterificados em cada etapa do refino de óleo de milho procedente de indústria.....	108
Tabela 33. Composição em ácidos graxos na fração de esteróis esterificados em cada etapa do refino de óleo de soja procedente de indústria.....	109
Tabela 34. Composição em ácidos graxos na fração de esteróis esterificados em cada etapa do refino de óleo de canola procedente de indústria.....	110
Tabela 35. Composição relativa de esteróis (%) presentes na fração de esteróis esterificados de óleo de milho refinado em indústria.....	112
Tabela 36. Composição relativa de esteróis (%) presentes na fração de esteróis esterificados de óleo de soja refinado em indústria.....	112
Tabela 37. Composição relativa de esteróis (%) presentes na fração de esteróis esterificados de óleo de canola refinado em indústria.....	113
Tabela 38. Teor de esterol total, esterificado e livre em amostras refinadas em indústrias.....	114
Tabela 39. Teor de esterol total, esterificado e livre em amostras refinadas em laboratório.....	115
Tabela 40. Teor de esteroldienos em óleo de milho proveniente de indústria.	121
Tabela 41. Teor de esteroldienos óleo em de soja proveniente de indústria..	121
Tabela 42. Teor de esteroldienos em óleo de canola proveniente de indústria.....	122
Tabela 43. Teor de esteroldienos em óleo de milho proveniente de de refino em laboratório.....	122

Tabela 44. Teor de esteroldienos em óleo de soja proveniente de refino em laboratório.....	123
Tabela 45. Teor de esteroldienos (mg/kg) em óleo de canola proveniente de refino em laboratório.....	123
Tabela 46. Concentração (%) de triacilgliceróis poliméricos em amostras de óleos brutos e refinados.....	128
Tabela 47. Teor de cobre e ferro (mg/L) em óleo de milho proveniente de indústria.....	131
Tabela 48. Teor de clorofila em óleos proveniente de indústrias.....	132
Tabela 49. Distribuição percentual dos ácidos graxos em óleo de milho refinado antes e após interesterificação química e enzimática.....	134
Tabela 50- Distribuição percentual dos ácidos graxos em óleo de soja refinado antes e após interesterificação química e enzimática.....	134
Tabela 51- Distribuição percentual dos ácidos graxos em óleo de canola refinado antes e após interesterificação química e enzimática.....	135
Tabela 52- Alterações no conteúdo de esteróis esterificados de óleos vegetais após interesterificação catalisada por metóxido de sódio ou Lipozyme.....	136
Tabela 53- Formação de β -sitosterol radioativo de ácidos graxos após interesterificação de canola catalisada por metóxido de sódio ou lipases na presença de [4-14C] β -sitosterol.....	137

FIGURAS

Figura 1. Estrutura dos principais esteróis.....	24
Figura 2. Estrutura de tocoferóis e tocotrienóis.....	29
Figura 3. Estrutura da vit D2 (ergocalciferol) e D3 (colicalciferol).....	32
Figura 4- Cromatograma da separação por peso molecular obtido através de permeação em gel (BILLEK, 1992).....	38
Figura 5. Associação de ácidos graxos com formação de ácidos graxos cíclicos, ácidos graxos dímeros e triacilgliceróis dímeros (BILLEK, 1992).....	41
Figura 6. Estrutura do 3,5-estigmastadieno (GROB et alli, 1994).....	43
Figura 7. Configuração geométrica cis e trans dos ácidos graxos monoinsaturados.....	46
Figura 8. Curva padrão de α -tocoferol.....	70
Figura 9. Cromatogramas típicos da composição de tocoferóis e tocotrienóis em amostras de óleos de milho, soja e canola conforme condições cromatográficas descritas no texto. Onde α -T é alfa tocoferol; α -T3 é alfa tocotrienol; β -T é beta tocoferol; γ -T é gama tocoferol; p-8 é plastocromanol 8; γ -T3 é gama tocotrienol e δ -T é delta tocoferol.....	71
Figura 10. Perfil de tocoferóis e tocotrienóis durante o refino industrial de óleo de milho.....	72
Figura 11. Perfil de tocoferóis e tocotrienóis durante o refino industrial de óleo de soja.....	74
Figura 12. Perfil de tocoferóis e tocotrienóis durante o refino industrial de óleo de canola.....	76
Figura 13. Níveis de variação no teor de tocoferóis totais dos óleos de milho, soja e canola durante o processo de refino industrial.....	77

Figura 14. Cromatograma (CG) da composição em ácidos graxos incluindo trans isômeros do óleo de milho bruto e desodorizado. Condições cromatográficas no texto.....	86
Figura 15. Cromatograma (CG) da composição em ácidos graxos incluindo trans isômeros do óleo de soja bruto e desodorizado. Condições cromatográficas no texto.....	87
Figura 16. Cromatograma (CG) da composição em ácidos graxos incluindo trans isômeros do óleo de canola bruto e desodorizado. Condições cromatográficas no texto.....	88
Figura 17. Gráfico da variação do teor de trans isômeros durante etapas do refino industrial de óleos de milho, soja e canola.....	89
Figura 18. Cromatogramas típicos da composição de esteróis totais em amostras de óleos de milho, soja e canola, onde 1 é colesterol; 2 é brassicasterol; 3 é campesterol; 4 é estigmasterol; 5 é β -sitosterol; 6 é Δ^5 avenasterol; 7 é Δ^7 estigmasterol; 8 é Δ^7 avenasterol e IS é betulina. Condições cromatográficas no texto.....	91
Figura 19. Teor de esteróis totais durante diferentes etapas do refino industrial de óleos de milho, soja e canola.....	98
Figura 20. Variação no teor de esteróis durante o refino industrial do óleo de milho.....	100
Figura 21. Variação no teor de esteróis durante o refino industrial do óleo de soja.....	101
Figura 22. Variação no teor de esteróis durante o refino industrial do óleo de canola.....	102
Figura 23. Perfil cromatográfico (CLAE) dos ésteres esterificados de amostras de óleos de milho, soja e canola. Condições cromatográficas contidas no texto.....	104

Figura 24. Gráfico da variação no teor de esteróis esterificados durante o refino industrial dos óleos de milho, soja e canola.....	106
Figura 25. Curva padrão de 3,5-colestadieno em CLAE.....	117
Figura 26. Cromatogramas (CLAE) de esteroldienos em etapas do refino industrial de óleo de milho, onde 1 é colestadieno; 2 é campestadieno; 3 é estigmastatrieno, 4 é estigmastadieno. Condições cromatográficas contidas no texto.....	118
Figura 27. Cromatogramas (CLAE) de esteroldienos em etapas do refino industrial de óleo de soja, onde 1 é colestadieno; 2 é campestadieno; 3 é estigmastatrieno, 4 é estigmastadieno. Condições cromatográficas contidas no texto.....	119
Figura 28. Cromatogramas (CLAE) de esteroldienos em etapas do refino industrial de óleo de canola, onde 1 é campestatrieno, 2 é campestadieno; 3 é estigmastadieno.....	120
Figura 29. Gráfico da concentração de esteroldienos em etapas do refino de óleos de milho, soja e canola refinados em indústria.....	124
Figura 30. Cromatogramas (GPC) de triacilgliceróis poliméricos presentes em óleos de milho, soja e canola após refino industrial, onde 1 = triacilgliceróis poliméricos; 2 = triacilgliceróis; 3 = diacilgliceróis; 4 = monoacilgliceróis e 5 = ácidos graxos. Condições cromatográficas descritas no texto.....	127
Figura 31. Gráfico da variação do total de triacilgliceróis poliméricos presentes em óleos de milho, soja e canola após refino industrial.....	130
Figura 32. Teor de radioatividade na fração de esteróis e esteróis esterificados do óleo de canola após reação com <i>Candida cylindracea</i> medido através de Berthold Radio-CCD Scanner.....	139

LISTA DE ABREVIACÕES

α -T = Alfa Tocoferol

α -T3 = Alfa Tocotrienol

β -T = Beta Tocoferol

γ -T = Gama Tocoferol

γ -T3 = Gama Tocotrienol

δ -T = Delta Tocoferol

p-8 = Plastocromanol 8

PAH = Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CG = Cromatografia a Gás

UV = Ultra Violeta

MMT = Milhões de Toneladas Métricas

MHZ = Megahertz

G = Gravidade

ECN = Equivalente Número de Carbonos

TBME = *t*-Butil-Metil-Éter

PM = Peso Molecular

HPSEC = Cromatografia de Permeação em Gel de Alta Performance

CCD = Cromatografia de Camada Delgada

AGL = Ácidos Graxos Livres

RP = Fase Reversa

GPC = Cromatografia de Permeação em Gel

BSTFA = Bis(Trimetilsilil) Trifluoracetamida

MSHFBA = Metil Silil Heptafluorobutiramida

IUPAC = União Internacional de Química Pura e Aplicada

RMN = Ressonância Magnética Nuclear

PCB = Policlorado de Bifenila

RESUMO

Neste trabalho são relatados os efeitos das etapas individuais do refino, em escala industrial e laboratorial sobre as alterações de alguns constituintes minoritários dos óleos de milho, soja e canola, a saber: esteróis, esteroldienos, esteróis esterificados, tocoferóis e tocotrienóis, triacilgliceróis poliméricos, ácidos graxos *trans*.

Esteróis totais, determinados por cromatografia gasosa capilar (CG) decresceram de 18-36% no óleo completamente refinado, comparado aos óleos brutos. Contudo a proporção relativa dos esteróis individuais não foi essencialmente alterada.

Os teores de esteroldienos, produtos da desidratação de esteróis, foram determinados por uma simples purificação em pequena coluna de sílica gel, seguida de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção de ultravioleta. O nível de esteroldienos, normalmente não presentes nos óleos brutos, aumentou após cada etapa do refino, especialmente após a desodorização.

O teor total de esteróis esterificados foi também determinado pela purificação em uma pequena coluna de sílica gel, seguida de CLAE com detector de massa. Um menor decréscimo no nível de esteróis esterificados foi observado após completo refino.

Os tocoferóis e tocotrienóis individuais foram determinados por CLAE com detector de fluorescência. O nível de tocoferóis decresce após as etapas do refino. Em todos os três casos, máxima redução de tocoferóis foi observada após a etapa da desodorização.

O nível de glicerídios poliméricos, determinados por purificação em uma pequena coluna de sílica gel, seguida de CLAE de permeação em gel, aumentou

durante o refino. O teor de ácidos graxos *trans* determinados por CG capilar também sofreu substancial aumento após o refino.

O teor de esteróis esterificados de óleos refinados de milho, soja e canola foi determinado após interesterificação química, catalisada por metóxido de sódio, a qual promoveu um acréscimo no conteúdo de esteróis esterificados de todos os três óleos. Entretanto, a interesterificação enzimática, catalisada por lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme), resultou em uma evidente redução no conteúdo de esteróis esterificados.

A formação de esteróis esterificados durante interesterificação química e enzimática foi também examinada por técnica radioativa utilizando-se [4-¹⁴C]β-sitosterol marcado adicionado ao óleo de canola refinado e medindo-se a radioatividade dos esteróis esterificados formados.

A interesterificação química de óleo de canola resultou em moderada formação (10% do total da radioatividade) de β-sitosteril ésteres radioativos. A interesterificação enzimática do óleo, catalisada por Lipozyme, levou a uma pequena formação de β-sitosteril ésteres, enquanto que com a lipase de *Candida cylindracea* alta proporção de ¹⁴C- marcado β-sitosteril ésteres foi gerada (>90% da radioatividade total).

ABSTRACT

We report the effects of individual steps of industrial and laboratorial refining on the alteration of selected minor constituents of oils, such as corn, soybean and rapeseed oils such as sterols, steradienes, steryl ester, tocopherols and tocotrienols, polymeric glycerides, *trans* fatty acids.

Total sterols, determined by capillary GC, decreased by 18 to 36% in the fully refined oils, as compared to the crude oils, however, the relative proportion of the individual sterols was essentially not altered.

The steradienes, dehydration products of sterols, were determined by simple clean-up in a short silicagel column, followed by HPLC with UV detection. The level of total steradienes, normally not present in crude oils, increased after each refining step, especially after deodorization.

The steryl esters were also determined via clean-up in a short silicagel column, followed by HPLC with evaporative light scattering mass detector. A minor decrease in the level of total steryl esters was observed after complete refining.

The individual tocopherols and tocotrienols were determined by HPLC using a fluorescence detector. The level of total tocopherols and tocotrienols decreased after complete refining. In all the three cases maximum reduction was observed after the deodorization step.

The level of polymeric glycerides, determined via clean-up in a short silicagel column followed by size exclusion HPLC, increased to some extent during refining. The level of *trans* fatty acids, determined by capillary GC, also increased after refining.

Steryl esters content in refined corn, soybean and rapeseed oils was measured after chemical interesterification, catalyzed by sodium methoxide, and led to some increase in the steryl esters content of all the three oils,

whereas enzymatic interesterification, catalyzed by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* (Lipozyme), resulted in a distinct reduction in steryl ester content.

Formation of steryl esters during chemical and enzymatic interesterification was also examined by radioactive tracer technique using [4-¹⁴C]β-sitosterol as marker added to refined rapeseed oil and measuring the content of radioactive steryl esters formed.

Chemical interesterification of rapeseed oil resulted in moderate formation (10% of total radioactivity) of radioactive β-sitosteryl esters. Enzymatic interesterification of the oil, catalyzed by Lipozyme, led to very little formation of radioactive β-sitosteryl esters, whereas high proportions (>90% of total radioactivity) of ¹⁴C-labeled β-sitosteryl esters were formed by the lipase from *Candida cylindracea*.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais são constituídos predominantemente por triacilgliceróis, mas estão presentes nos mesmos, em menor quantidade, outros constituintes de grande interesse, chamados de componentes minoritários. O estudo das transformações que sofrem tais componentes durante as distintas etapas a que são submetidos os óleos vegetais nos processos tecnológicos, principalmente durante o refino, apresenta grande interesse tanto do ponto de vista bromatológico como nutricional (RABASCALL & RIERA, 1987).

O presente trabalho teve como objetivo estabelecer a influência de processos tecnológicos sobre os chamados compostos minoritários, presentes em óleos comestíveis de soja, milho e canola, fabricados no Brasil. Os referidos componentes, os quais se concentram na fração insaponificável, incluem os triterpênicos e seus derivados como os esteróis livres e esterificados; vitaminas lipossolúveis como os tocoferóis e tocotrienóis, carotenóides; hidrocarbonetos alifáticos. Incluem ainda clorofilas e seus derivados, produtos de alterações que podem ocorrer durante o refino como dímeros e polímeros de triacilgliceróis, esteroldienos (esteróis desidratados), ácidos graxos *trans*, e englobam também contaminantes como metais.

Os processos tecnológicos examinados compreenderam a degomagem, a neutralização, o branqueamento e a desodorização; etapas do processo de refino químico. Além disso, processos visando a modificação de consistência, como a interesterificação enzimática e química também foram estudados, utilizando-se neste caso compostos radioativos marcados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

A produção mundial de oleaginosas na safra 1994-1995 ficou na casa de 248,03 MMT (milhões de toneladas métricas). Soja (*Glycine max*) é uma das mais antigas fontes oleaginosas cultivadas pelo homem. O processamento tecnológico do óleo de soja para uso em alimentos começou nos anos 30 nos Estados Unidos (SLEETER, 1981). A produção comercial de soja começou a se expandir significativamente a partir de 1940, particularmente nos Estados Unidos, e é agora a oleaginosa produzida em maior quantidade no mundo.

No Brasil a soja foi introduzida em 1882 na Bahia, 10 anos mais tarde foi levada para São Paulo e depois para o Rio Grande do Sul, mas só a partir de 1955 é que começou a ser produzida em maior escala (PREGNOLATTO, 1981). Hoje o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja e contribui com 18,2% da produção total desta oleaginosa.

O consumo de óleo vegetal no mundo entre 1994-1995 foi estimado em 66,61 MMT e a previsão para o ano 2001 é de 78 MMT, um acréscimo de 25% (SOYATECH, 1996). Óleo de soja é o mais importante óleo vegetal comercializado mundialmente, a produção global na safra 1994-1995 ficou ao redor de 19,33 MMT ou seja 29,02% de todo o óleo vegetal produzido no mundo.

A predominância do óleo de soja no mercado pode ser explicada pelas características agrônômicas da soja, com uma lavoura de relativo baixo custo e produção de proteína de alta qualidade, usada tanto na alimentação humana quanto na animal, o desenvolvimento de processos de refino que fornecem óleo comestível de qualidade e em grandes quantidades, e ao baixo preço do óleo produzido.

Canola é atualmente uma importante fonte oleaginosa devido ao seu elevado teor de óleo (acima de 40%). Variedades de canola foram desenvolvidas

no Canadá e pertencem às espécies *Brassica napus* ou *Brassica campestris*, as quais pertencem a família da mostarda (Cruciferae) (SWERN, 1979).

Graças a sua composição em ácidos graxos (oleico e linoleico) e ao baixo teor de ácidos graxos saturados, o óleo de canola possui um elevado valor nutricional. A industrialização do óleo de canola tem prosperado muito durante os últimos 10 anos como resultados do recente acordo internacional e devido ao aspecto econômico. O Brasil tornou-se produtor dessa oleaginosa que, derivada da colza, é a primeira na preferência dos japoneses, canadenses e americanos para produção, especialmente de óleo. O óleo de canola apresenta o menor índice de gordura saturada (apenas 6%) com elevado teor de ácido oleico. A cultura da canola mostrou-se uma importante alternativa para o cultivo de inverno no sul do país, parceira ideal do trigo e perfeita para preencher períodos ociosos na indústria de extração de óleo de soja e algodão (DEMARCHI, 1993).

Conhecida pelo homem desde tempos muito remotos, sabe-se que seu cultivo remonta à era Cristã. A colza, no entanto, somente passou a despertar interesse como fonte de óleo comestível a partir de 1960. Nessa época graças a um bem sucedido programa de melhoramento genético, fruto do desenvolvimento da biotecnologia, os laboratórios canadenses conseguiram obter uma planta com baixo teor de ácido erúico e glucosinolatos. Contudo a *Brassica napus* e a *Brassica campestris* só se transformaram em canola em 1974, na Universidade de Manitoba, Canadá, quando se obteve a planta com menos de 2% de ácido erúico e menos de 30 micromoles de glucosinolatos, da qual se pode extrair óleo ideal para o consumo humano.

O nome canola (canadian oil low acid) foi oficialmente aceito pela Canadian Grain Commission em 1987. O cultivo de canola começou se alastrar e hoje a oleaginosa é cultivada em vários países. Liderando o Canadá o ranking de produção.

Há uma expectativa muito favorável ao cultivo de canola em países como Brasil e Argentina, os quais por sua posição geográfica e tradição agrícola,

podem transformar-se em importantes produtores, mesmo porque já demonstraram por meio de experimentação que podem obter produtividade semelhante à obtida no Canadá.

A explicação para a grande aceitação e o rápido crescimento do consumo do óleo de canola é simples. As vantagens, segundo pesquisas médicas feitas em todo o mundo, não se relacionam somente ao baixo índice de gordura saturada contida no produto, apenas 6%, mas também ao fato de ele embutir elevados teores de gorduras insaturadas que podem, preventivamente, reduzir os riscos de doenças circulatórias e coronarianas. Numa época em que as doenças cardíacas aparecem como causa de 40% das mortes no Brasil e nos Estados Unidos é fácil compreender o sucesso do óleo de canola. (DEMARCHI, 1993).

Os principais produtores de canola são o Canadá, Europa, China e Japão. A produção de óleo de canola e colza esteve na casa de 9,80 MMT na safra 1994-1995. Canola representa 14,7% do suprimento mundial de óleo vegetal. Os demais óleos vegetais contribuem com aproximadamente 32% da produção mundial.

Óleo de milho é obtido do germe da planta (*Zea mays*), a qual é extensivamente cultivada nos Estados Unidos e em menor escala na Holanda, Argentina, Brasil e outros países. O grão de milho contém somente 3 a 7% de óleo, mas o óleo contido no germe é cerca de 50% (KIRSCHENBAUER, 1960).

O óleo de milho é muito apreciado devido ao seu elevado teor de ácidos graxos polinsaturados e baixo conteúdo de ácidos graxos saturados, além do elevado teor de tocoferóis que possui e excelente estabilidade oxidativa que apresenta. Óleo de milho é considerado um óleo premium.

Os óleos vegetais são a mais importante fonte de lipídios na dieta alimentar. Eles são usados principalmente como óleos para saladas e na elaboração de alimentos. São fontes de ácidos graxos essenciais e transportam as vitaminas lipossolúveis.

Os diferentes estágios de processamento, a que são submetidos os óleos vegetais, englobam de uma forma geral, a extração, o refino, a hidrogenação, interesterificação e o fracionamento.

As principais etapas do refino e as alterações que provocam, tanto na composição quanto nos valores nutricionais podem ser vistas na Tabela 1 e são relatadas a seguir.

Tabela 1- Etapas do processo de refino.

Estágio	Principais impurezas removidas ou reduzidas
Degomagem	Fosfolipídios, traços de metais, pigmentos, carboidratos e proteínas
Neutralização	Ácidos graxos, fosfolipídios, pigmentos, traços de metais, enxofre, insolúveis em óleo, solúveis em água
Lavagem	Sabões
Secagem	Água
Clarificação	Pigmentos, produtos de oxidação, traços de metais, enxofre, traços de sabões
Filtração	Argila clarificante
Desodorização	Ácidos graxos, mono e diacilgliceróis, produtos de oxidação, produtos da decomposição de pigmentos

Referência GUNSTONE et alii, 1994.

Pequenas proporções de vários artefatos de lipídios podem ser formadas pelo processamento de óleos e gorduras a temperaturas elevadas sob condições ácidas e alcalinas, bem como na presença de argilas clarificantes e oxigênio. Artefatos e impurezas no processamento de óleos e gorduras decorrentes de contaminação interna ou externa são mostradas na Tabela 2.

Contaminação pode ser observada durante a estocagem, prensagem, extração de sementes, bem como na estocagem do óleo. A neutralização de óleos

na presença de oxigênio conduz a autoxidação dos triacilgliceróis e esteróis. A degradação dos peróxidos e a desidratação dos ácidos graxos hidroxilados e esteróis ocorre pela ação de argilas clarificantes. Entre vários produtos ácidos graxos insaturados conjugados, e esteroldienos são os principais subprodutos do processo de clarificação industrial. Uma variada proporção de outros esteróis apolares, como as formas isoméricas de esteróis hidrocarbonetos mono-, di-, e trienólicos bem como os dímeros de esteróis, como 3,3'-diesteril éter e 3,3'-diesteris, são formados de vários esteróis presentes em óleos e gorduras. Desodorização a altas temperaturas conduz a isomerização e oligomerização dos ácidos graxos (KAIMAL et alii, 1993).

Tabela 2- Artefatos e impurezas no processamento de óleos e gorduras decorrentes de contaminação interna ou externa.

Etapa do processamento	Artefatos, contaminantes e impurezas
Cultivo, colheita e estocagem de oleaginosas	Ácidos graxos livres, hidroperóxidos, pesticidas, aflatoxinas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, hidrocarbonetos clorados
Extração	Resíduos de solvente, hidroperóxidos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e outros compostos aromáticos
Degomagem	Peróxidos
Neutralização	Sabões, produtos da autoxidação de lipídios, mono- e diacilgliceróis
Clarificação	Isômeros geométricos e posicionais de ácidos graxos insaturados, ácidos graxos livres, ácidos graxos hidroxilados, ácidos graxos dímeros e oligoméricos bem como triacilgliceróis, hidroperóxidos, ácidos graxos e esteróis desidratados, produtos secundários de autoxidação de artefatos de esteróis
Desodorização	Triacilgliceróis e ésteres de esteróis interesterificados, ácidos graxos livres, isômeros geométricos e posicionais de ácidos graxos insaturados, intra e intermolecular ácidos graxos e triacilgliceróis dímeros e oligoméricos, hidrocarbonetos, produtos da degradação de carotenóides, bifenil e feniléter
Interesterificação	Triacilgliceróis alterados por rearranjo molecular, metil ésteres de ácidos graxos, sabões, ésteres de ácidos graxos e esteróis ou tocoferóis
Estocagem do óleo	Hidroperóxidos de ácidos graxos e esteróis, acrilonitrila, policlorados de bifenila

Referência KAIMAL et alii, 1993.

2.1. Etapas do processamento tecnológico do refino químico clássico de óleos vegetais

2.1.1. Extração

A extração é o primeiro estágio no processamento do óleo de diversas fontes, tais como soja, germe de milho, canola ou outras. Historicamente, óleo era extraído por prensagem, com ou sem aquecimento. Atualmente, o processo mais usual consiste em transformar a semente ou fonte oleaginosa em flocos, os quais são submetidos a um processo de extração por solvente, usualmente hexana, que posteriormente é destilada e reutilizada. Muito embora a combinação destas duas formas de extração também possam ser empregadas (RATHMANN & LANDERS, 1981).

O óleo bruto é constituído principalmente de triacilgliceróis, mas contêm outras substâncias tais como as gomas e as que fazem parte da chamada matéria insaponificável, junto com pequenas quantidades de outras substâncias as quais lhe conferem algumas características indesejáveis, tais como a cor, odor, instabilidade. Pesticidas são também aqui listados, pois muitos deles são solúveis em óleo, e podem estar presentes no óleo bruto (RATHMANN & LANDERS, 1981).

2.1.2. Refino

Existem duas formas de refino, o chamado refino físico, e o mais convencional que é o refino químico, onde as principais etapas são descritas a seguir.

2.1.2.1. Degomagem.

O primeiro estágio do refino químico é, em muitos casos, a degomagem ou desgomagem. Aqui as gomas, após hidratação pela adição de pequena quantidade de água ou de ácido cítrico ou fosfórico são removidas por centrifugação. As gomas são constituídas principalmente de fosfolipídios e mucilagens. Estas estão presentes em óleos em teores entre 0,3 e 3%, e podem estar na forma insolúvel,

solúvel ou coloidal. Sua importância está na propriedade emulsificante que possuem, a qual aumenta as perdas de óleo neutro durante o refino. Quando aquecidos na temperatura de desodorização os fosfatídeos imprimem cor marrom ao óleo, o que afeta sua qualidade (YOUNG, 1980).

2.1.2.2. Neutralização

Consiste no tratamento do óleo bruto com solução aquosa de álcali diluído, usualmente soda cáustica, o que converte ácidos graxos livres em sabão. O óleo é então separado desta chamada borra por centrifugação. Alguns pesticidas, fosfolipídios, metais, clorofila e substâncias de origem protéica podem ser arrastados junto com esta borra, assim como uma parcela de óleo neutro (perdas). Posteriormente o óleo é lavado e seco (LANDERS & RATHMANN, 1981).

2.1.2.3. Branqueamento ou clarificação

A terceira etapa no processamento de óleos comestíveis é o branqueamento. A remoção da cor dos óleos é realizada através do uso de adsorventes. Esta etapa do tratamento consiste na adição de argilas clarificantes, ou ainda adição de sílica, que posteriormente são removidas por filtração. Nesta etapa são removidas substâncias que produzem cor tais como carotenóides e clorofilas, e reduz os teores de alguns pesticidas, sabões (sais de ácidos graxos) e também peróxidos. O mais importante adsorvente usado no branqueamento, no passado foi a argila clarificante natural ou silicato de alumínio hidratado. Hoje em dia, o uso de argila natural tem sido suplantado pelo uso de argilas ácido-ativadas. Estas argilas ácido ativadas são bentonitas ou montmorilonitas que são tratadas com ácido sulfúrico ou ácido clorídrico para aumentar seu poder de branqueamento. O mais popular método de branqueamento usado na atualidade consiste numa etapa de clarificação contínua a vácuo. Argila ativada é continuamente dosada e adicionada ao óleo, e após adequado tempo de retenção, a mistura é bombeada para filtros paralelos, e o agente clarificante é desta forma removido (VENNE, 1992).

2.1.2.4. Desodorização

Desodorização é um processo realizado a altas temperaturas e alto vácuo sob arraste de vapor. Este processo promove ao óleo aroma e estabilidade oxidativa desejáveis pela remoção de ácidos graxos livres e compostos voláteis que conferem odor e aroma pela destruição térmica de hidroperóxidos. Contudo, tem sido mostrado que quando a desodorização é conduzida a altas temperaturas por longos períodos de tempo, algumas alterações indesejáveis ocorrem nas propriedades físicas e químicas do óleo desodorizado (GÜMÜSKEN & ÇAKALOZ, 1992).

Existem muitas variações, mas em geral no processo de desodorização injeta-se 4% de vapor em relação ao peso do óleo, e o vácuo absoluto é usualmente mantido entre 1 e 6 mmHg (YOUNG, 1980). A eficiência da desodorização é uma função de pressão, temperatura, tempo de residência e volume de vapor (BAGGE, 1992).

Quando aquecido, e dependendo do grau de insaturação do óleo inicial, os ácidos graxos provenientes dos triacilgliceróis poderão condensar, polimerizar e mesmo formar estruturas cíclicas, algumas das quais relatadas como compostos carcinogênicos. Não existem evidências de quantidades significantes destes compostos resultantes da desodorização, mas a tendência no processamento tem sido minimizar o tempo gasto e elevar a temperatura do processo, que fica restrita a 250°C, temperatura na qual os carotenóides podem se decompor e ser removidos do óleo. Desodorizadores são sistemas de batelada, semi-contínuos e contínuos (YOUNG, 1980).

2.1.2.5. Winterização

Alguns tipos de óleos vegetais são refrigerados para a remoção de ceras e triacilgliceróis de alto ponto de fusão, através de filtração. O óleo resultante então exibe um aspecto límpido e claro a temperatura de refrigerador, uma

característica desejável principalmente para os óleos de salada (LANDERS & RATHMANN, 1981).

2.1.3. Outros processos tecnológicos empregados na industrialização de óleos e gorduras

2.1.3.1. Modificação da composição química e propriedades físicas dos óleos e gorduras

A distribuição dos ácidos graxos na molécula do triacilglicerol, o comprimento da cadeia e o número de duplas ligações determinam as propriedades físicas dos óleos e gorduras, como por exemplo a consistência e o ponto de fusão.

a) Hidrogenação

Este processo consiste em dispersar hidrogênio no óleo na presença de um catalisador, geralmente níquel. Na reação ocorre a adição de hidrogênio às insaturações dos ácidos graxos, promovendo a alteração da consistência do produto (YOUNG, 1980).

Alguns óleos vegetais são parcialmente hidrogenados para aumentar sua resistência à oxidação ou para compatibilizar suas características físicas aos seus usos específicos. Este é um processo comercialmente importante onde alguns ácidos graxos polinsaturados são convertidos em seus isômeros. O efeito do processo de hidrogenação sob o aspecto nutricional tem sido objeto de discussão por parte de diversos autores nos últimos tempos, concentrando-se em estudos bioquímicos destes isômeros.

b) Fracionamento

Os triacilgliceróis constituintes dos óleos e gorduras, devido a sua diferente composição em ácidos graxos, têm diferentes pontos de fusão, os quais podem variar de -50 a 80°C. Cada óleo tem, por isso, uma faixa de fusão característica (YOUNG, 1980).

Óleos e gorduras podem ser fracionados por cristalização a diferentes temperaturas e produzir uma fração sólida (estearina) e outra líquida (oleína). Três processos são usados para este tipo de separação:

- fracionamento a seco - onde o óleo é submetido à refrigeração por certo período de tempo e então oleína e estearina são separadas por filtração
- fracionamento com detergente - a gordura parcialmente cristalizada é misturada a uma solução de detergente e os cristais em suspensão na fase aquosa são separados por centrifugação
- fracionamento com solvente - uma mistura de óleo em solvente é formada e resfriada para produzir a cristalização. A estearina é separada por filtração e ambas as frações são aquecidas, recuperando-se o solvente por destilação (YOUNG, 1980).

c) Interesterificação

Um dos processos mais comumente utilizado para alterar as características físicas dos triacilgliceróis pela manipulação da composição de seus ácidos graxos é a interesterificação. Ela é empregada quando se deseja alterar a composição da ocorrência da distribuição dos ácidos graxos na molécula do triacilglicerol para se obter óleos e gorduras com propriedades químicas e físicas diversas, os quais podem ser empregados em produtos industriais específicos, como margarinas, shortenings e na produção de chocolate.

A interesterificação é um processo no qual um éster de um triacilglicerol reage com um ácido graxo, álcool ou outro éster, resultando numa troca de posição dos ácidos graxos, para produzir um novo éster ou novo rearranjo molecular no triacilglicerol, o que pode alterar as características físicas de óleos e gorduras. As moléculas dos ácidos graxos não estão distribuídas casualmente na molécula do triacilglicerol que ocorrem nos óleos e gorduras naturais. Em geral, ácidos graxos insaturados estão localizados preferencialmente na posição sn-2

dos triacilgliceróis naturais, enquanto que as posições sn-1 e sn-3 são predominantemente ocupadas pelos ácidos graxos saturados.

A reação de um éster com um ácido graxo é chamada de acidólise, enquanto que a reação de um éster com um álcool é dita alcoólise. Já a reação de um éster com outro éster é chamada transesterificação.

Acidólise tem despertado menos interesse que a alcoólise ou a transesterificação. Alcoólise é importante comercialmente pois oferece meios de se preparar outros ésteres, como por exemplo ésteres de ceras. A metanólise de uma gordura para se obter ésteres metílicos e a glicerólise de uma gordura para obter mono e diacilgliceróis tem grande importância industrial (SONNTAG, 1982).

Transesterificação tem ultimamente assumido uma substancial importância na indústria de óleos e gorduras, principalmente na indústria de gorduras comestíveis. Transesterificação entre triacilglicerol tendo diferentes características físicas, por exemplo uma gordura dura com um óleo líquido, tem sido usada para obter produtos como base na produção de margarinas, substitutos de manteiga de cacau, gorduras para confeitaria e outras (TEASDALE & HELMEL, 1965; GOODING & CRAVENS; 1963; KIDGER; 1968; COTTIER & ROSSELL; 1980).

c.1) Interesterificação catalisada quimicamente

Interesterificação de óleos vegetais, catalisadas por bases, metóxi ou etóxi derivados de metais alcalinos é um processo industrial estabelecido para a modificação estrutural dos constituintes dos triacilgliceróis, com a finalidade de alterar as propriedades físicas dos óleos (ROZENDAAL, 1992).

Interesterificação de gorduras pode ocorrer a altas temperaturas, como a 300°C, mas requer longo tempo e é usualmente acompanhada pela decomposição e polimerização (SREENIVASAN, 1978).

O uso de catalisadores promove um aumento na velocidade de reação e exige menores temperaturas para a reação. Alquilatos de metais alcalinos, como o

metilato de sódio e etilato de sódio, e metais alcalinos (Na, K e suas ligas) são catalizadores preferenciais para interesterificação.

Durante este processo a gordura, ou mistura de gorduras, é aquecida com pequena quantidade de álcali ou base. Isto causa simultânea hidrólise e esterificação, em que os ácidos graxos trocam de posição na molécula do triacilglicerol. A composição dos ácidos graxos não é alterada e não ocorrem alterações do ponto de vista nutricional.

Este processo pode ser aplicado para qualquer gordura ou mistura de gorduras. O processo pode ser usado na produção de “shortenings” e na elaboração de margarinas contendo baixo teor de *trans*-isômeros pela interesterificação de um óleo com uma gordura de alto grau de saturação (LANDERS & RATHMANN, 1981)

O uso de catalisadores químicos na interesterificação tem certas desvantagens. A variabilidade na qualidade do catalisador, a necessidade de um período de indução, e perdas de óleo pela formação de sabões de ésteres metílicos são algumas das desvantagens do uso destes catalisadores. A reação deve ser conduzida na ausência de água ou ácidos graxos não esterificados, por que o catalisador reage com estas substâncias. Consequentemente os óleos e gorduras que são submetidos a interesterificação química, devem ser preferencialmente neutralizados e secos.

A clássica interesterificação quimicamente catalisada promove a randomização na distribuição das moléculas de ácidos graxos na molécula do triacilglicerol (SREENIVASAN, 1978; CHOBANOV & CHOBANOVA, 1977; DASGUPTA et alii, 1982).

O processo não é específico. Para induzir a formação de alguns produtos desejáveis um processo chamado interesterificação dirigida tem sido usado, no qual os triacilgliceróis formados durante a reação catalisada quimicamente são seletivamente cristalizados no produto (CHOBANOV & TOPALOVA, 1979).

c.2) Interesterificação catalisada por lipases

Lipases (triacylglycerol acil hidrolases) são biocatalisadores que aceleram a hidrólise de ligações ésteres do triacylglycerol.

Lipases podem ser produzidas por diferentes organismos vivos, e são obtidas comercialmente. Uma lipase muito popular obtida de tecido animal é a lipase pancreática porcina. Lipases de plantas, isoladas de sementes oleaginosas em estado germinativo, têm sido empregadas em processos biotecnológicos (HASSANIEN & MUKHERJEE, 1986).

Lipases extracelulares microbianas são excretadas por microorganismos para a digestão de materiais lipídicos. As lipases microbianas podem ser classificadas em 3 grupos de acordo com seu substrato específico (MACRAE, 1984).

O primeiro grupo não mostra especificidade com relação à natureza do grupo acil ou a posição em que este será esterificado no glicerol, em qualquer uma das 3 posições da molécula indiscriminadamente. Para produzir glicerol e ácidos graxos, monoacylglyceróis e diacylglyceróis aparecem como produtos intermediários na reação. Típicas lipases não específicas são *Candida cylindracea*, *Corynebacterium acnes* e *Staphylococcus aureus*.

O segundo grupo de lipases hidrolisam especificamente os ésteres nas posições sn-1 e sn-3 da molécula do triacylglycerol. Usando estas lipases, triacylglyceróis são hidrolisados na posição 1,2(2,3)-diacylglyceróis e 2-monoacylglyceróis, com formação de ácidos graxos. Prolongando a incubação dos triacylglyceróis com lipases sn-1,3 específicas, o resultado será uma completa hidrólise, porque 1,2(2,3)-diacylglyceróis e 2-monoacylglyceróis são quimicamente instáveis e ocorre a migração da posição sn-2 para a posição sn-1,3. Exemplos de enzimas neste grupo são as lipases do *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus* e várias espécies de *Rhizopus*. A lipase pancreática é uma típica lipase sn-1,3 específica, e algumas lipases vegetais (por ex. colza, mostarda e lupino) tem demonstrado possuir esta especificidade (HASSANIEN & MUKHERJEE, 1986).

O terceiro grupo de lipases microbianas catalisa caracteristicamente a hidrólise de tipos específicos de grupos acilas nas moléculas de triacilgliceróis. Uma representante típica deste grupo é a lipase produzida pelo *Geotricum candidum* que hidrolisa preferencialmente grupos acilas de cadeia longa contendo uma dupla ligação *cis* na posição $\Delta 9$ (ex. oleoil, linleoil e linolenoil). Grupos acilas de moléculas saturadas e insaturadas que não possuem duplas ligações localizadas na posição $\Delta 9$ são hidrolizadas somente de forma muito lenta da molécula do triacilglicerol (JENSEN, 1977).

Recentemente, numerosas aplicações de interesterificação enzimática de óleos, catalisada por lipases, têm sido empregadas para produção de gorduras especiais (MACRAE, 1984, MUKHERJEE, 1990).

Lipases catalisando hidrólises de triacilgliceróis têm sido investigadas por muitos autores (KIN et alii, 1984; LINFIELD et alii, 1984; KHOR et alii, 1986; MUKATAKA et alii, 1985). Processos de hidrólise usando lipases em sistemas de batelada ou contínuos têm sido recentemente descritos (HOQ et alii, 1985).

A hidrólise do triacilglicerol é uma reação reversível. TSUJISAKA et alii (1977) demonstraram que lipases microbianas também catalisam a síntese de acilgliceróis de ácidos graxos e glicerol, contudo outros autores tem demonstrado que lipases de *Aspergillus niger* e *Rhizopus delemar* catalisam especificamente a esterificação de ácidos graxos nas posições sn-1 e sn-3 na molécula do glicerol, enquanto que lipases de *Geotricum candidum* e *Penicillium cyclopium* esterificam somente ácidos graxos de cadeia longa; sem nenhuma especificidade de posição.

A possibilidade de usar lipases na síntese de acilgliceróis tem aberto um novo caminho para a Biotecnologia industrial de óleos e gorduras. Interesterificação catalisada por lipases é um processo biotecnológico com boas perspectivas de aplicação.

O uso de lipases em reações de interesterificação tem algumas vantagens sobre o uso de catalizadores químicos. Em comparação com catalisadores

químicos, lipases catalisam interesterificações sobre condições mais amenas, onde os grupos acilas não sofrem nenhuma alteração química indesejável. Uma segunda vantagem é que o processo tende a ter menor custo no tratamento de resíduos, desde que enzimas são biodegradáveis e podem ser usadas em baixas concentrações (0,1-1% do substrato) onde ocorre uma insignificante demanda de oxigênio biológico (POSORSKE, 1984).

Uma das principais vantagens no uso de reação de interesterificação por lipases é a especificidade das enzimas. Na interesterificação química há uma dificuldade de se introduzir um desejado grupo acil em uma determinada posição do glicerol, devido a reação ocorrer de forma randômica, ou seja ao acaso. Pelo uso, por exemplo, de uma lipase sn-1,3 específica as trocas dos grupos acilas são confinados às posições sn-1 e sn-3 produzindo produtos que não podem ser obtidos por interesterificação química.

Interesterificações catalisadas por lipases podem ser conduzidas sem neutralização prévia dos óleos e gorduras usados. A quantidade de água tem sido controlada para evitar a hidrólise do triacilglicerol, mas alguma atividade de água pode estar presente desde que a hidrólise é o primeiro estágio na reação de interesterificação. Uma vantagem adicional é a possibilidade do uso de lipases imobilizadas nas reações de interesterificações.

Lipases tem sido imobilizadas em suportes inorgânicos, como sílica (WISDOM et alii, 1984; YOKOZEKI et alii, 1982) e como biocatalizadores podem ser recuperados e reutilizados em reatores com fluxo contínuo.

Muitas patentes têm sido registradas descrevendo o uso de interesterificações catalisadas por lipases para a obtenção de produtos específicos, por ex. substitutos de manteiga de cacau (MATSUO et alii, 1981; MATSUO et alii, 1980). Neste caso particular as propriedades físicas da manteiga de cacau são conseguidas pelo uso de lipases sn-1,3 específicas, que produzem triacilgliceróis, como o 1,3-dipalmitoil-2 oleoilglicerol; 1,3-diestearoil-2 oleoilglicerol em proporções desejadas.

c.3) Métodos para avaliar reações de interesterificações

Métodos de interesterificações de óleos e gorduras têm como objetivo da reação a elaboração de produtos com propriedades físicas de interesse.

Os métodos físicos que têm sido mais comumente empregados são: observação visual da alteração de cor durante a reação, determinação do ponto de fusão do produto e determinação da curva de sólidos empregando espectroscopia de RMN.

Métodos químicos que avaliam reações de interesterificação e alterações que ocorrem na composição do triacilglicerol envolvem cromatografia em camada delgada, cromatografia em camada delgada com nitrato de prata (argentação), hidrólise com lipases pancreáticas e cromatografia gasosa (SREENIVASAN, 1978).

Métodos químicos assumem, contudo, uma alta importância quando reação de interesterificação catalisada por lipases tem sido monitorada desta maneira. A avaliação da performance e especificidade de lipases nos processos de interesterificação requerem métodos químicos rápidos de análise.

Uma das possibilidades de se monitorar a reação de interesterificação catalisada por lipase é o uso de uma substância definida e "marcada", a qual pode ser facilmente detectada nos produtos formados. Por exemplo um ácido graxo incomum pode ser adicionado.

Outra possibilidade para analisar produtos de reações catalisadas por lipases é o uso de compostos marcados radioativamente. Métodos radioquímicos têm sido empregados em laboratórios de lipídios (ROBERTS, 1968; MUKHERJEE & MANGOLD, 1978, MUKHERJEE, 1984; TOTANI & MANGOLD, 1981; WIENTZEK et alii, 1985; MANGOLD et alii, 1962).

2.2. Principais compostos minoritários presentes em óleos e gorduras

Como compostos minoritários, é possível distinguir as grandes famílias que envolvem os fosfolipídios, cerídeos, constituintes insaponificáveis, clorofilas e os produtos de alterações (KARLESKIND, 1992).

2.2.1. Fosfolipídios

Fosfolipídios são componentes naturais dos óleos, estão presentes em óleos brutos de plantas em nível que varia de 0,1 a 1,8%. A presença dos fosfatídios é indesejável porque eles podem causar perdas durante o refino, são importantes na indústria de alimentos porque apresentam propriedades únicas, são emulsificantes. Fosfolipídios são quelantes de metais e interferem na quantidade de íons metálicos nos óleos. A remoção dos fosfolipídios ou gomas também resultam na eliminação de ferro e cobre, os quais diminuem a estabilidade oxidativa dos óleos. Refinadores de óleos necessitam conhecer o nível de fosfatídios durante o processamento do óleo bruto (PRZYBYLSKI & ESKIN, 1991).

Óleo bruto de soja que foi danificada no campo, durante a estocagem ou manuseio e transporte, contém quantidade significativa de fosfolipídios não hidratáveis. Estes são fosfatídios que durante a degomagem do óleo bruto com água não são hidratados, não precipitam e não são removidos através de centrifugação. LIST et alii (1990) simularam em laboratório os procedimentos comerciais e demonstraram que a formação dos fosfatídios não hidratáveis em soja e flocos de soja foram influenciados pela umidade, aquecimento e atividade enzimática. A formação de fosfatídios não hidratáveis foi particularmente rápida em flocos de soja estocados a 14% de umidade a 40°C. Inativação de fosfolipase D, através de tratamento de flocos de soja por vapor ou microondas, inibem a formação de fosfatídios não hidratáveis (MOUNTS et alii, 1992).

O desenvolvimento de uma metodologia com relação à determinação de fosfolipídios em óleos é importante tanto para monitorar a qualidade da matéria-prima como do produto processado. Medidas dos componentes fosfolipídicos têm

sido usada para avaliar a qualidade do óleo bruto procedente de sementes oleaginosas, principalmente as que sofrem danos durante o manuseio no campo, as quais possuem alto teor de umidade durante a estocagem. Atualmente a CLAE é uma importante ferramenta para a separação e detecção destes lipídios. A cromatografia em camada delgada é considerada relativamente complicada para esta separação devido aos diversos estágios requeridos na determinação.

Devido à baixa concentração de fosfolipídios em óleos, a pré concentração dos mesmos se torna necessária (SINGLETON, 1993)

2.2.2. Cerídeos

É a designação de uma forma geral dos ésteres de ácidos graxos com monoálcoois (eventualmente di) de massa molecular suficientemente elevada o que os torna insolúveis no óleo.

Ceras naturais, são ceras presentes em alguns lipídios vegetais, as quais contribuem na formação de películas protetoras de grãos e frutos (KARLESKIND, 1992).

2.2.3. Insaponificáveis

A fração insaponificável dos lipídios compreende os constituintes que após hidrólise básica (saponificação) são solúveis em solventes orgânicos.

A proporção de matéria insaponificável de um lipídio depende evidentemente da origem biológica deste lipídio, dos tratamentos a que foi submetido, do tipo e da natureza da extração.

Os principais constituintes da matéria insaponificável são:

- os hidrocarbonetos diversos: alifáticos saturados e insaturados, triterpênicos (esqualeno) ou tetraterpênicos (carotenos)
- os compostos terpênicos: os álcoois triterpênicos penta e tetracíclicos, 4-metilesteróis e os esteróis.
- os álcoois graxos: as ceras

- as vitaminas lipossolúveis: A,D,E e K
- os constituintes diversos

Estudos da composição da fração insaponificável de óleos é uma poderosa ferramenta para a identificação, caracterização e verificação de adulteração em óleos e gorduras (FREGA et alii, 1992).

2.2.3.1. Triterpênicos e seus derivados

A fração insaponificável dos lipídios naturais contem uma certa quantidade de álcoois triterpênicos, bem como produtos de sua evolução, os 4-metilesteróis e os esteróis. Estes compostos representam em geral 30 a 70% da fração insaponificável, ou seja de 0,3 a 0,7% dos lipídios extraídos.

Os triterpenos e seus derivados são integrantes biosintéticos dos seres vivos, com duas exceções, as bactérias e os insetos. Estes compostos provem da oxidação enzimática do esqualeno (KARLESKIND, 1992).

a) Álcoois triterpênicos

No reino vegetal, os álcoois triterpênicos encontrados com mais frequência são o cicloartenol, e 24-metilenocicloartanol, as α e β - amirinas, onde a composição qualitativa depende da família e do gênero botânico considerado. Por exemplo, os óleos de grãos de curcubitáceas são característicos pela presença de curcubita-5, 24-dieno-3 β (KARLESKIND, 1992).

b) 4-Metilesteróis

Estão presentes na fração triterpênica dos óleos e representam de 1 a 5% da fração insaponificável, são compostos intermediários da via metabólica dos vegetais onde álcoois triterpênicos evoluem para formar os esteróis (KARLESKIND, 1992).

c) Esteróis

Os esteróis constituem uma importante fração dos insaponificáveis, representando de 30 a 60% desta fração. Os lipídios de origem vegetal

compreendem em geral de 5 a 10 esteróis majoritários. Os esteróis mais abundantes no reino vegetal são β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, e isofucosterol. Óleos provenientes de plantas de certas famílias botânicas contém unicamente o Δ^7 esterol, de outras famílias o Δ^5 e o Δ^7 esterol.

Os principais esteróis associados a seus correspondentes nomes, comum e científico de acordo com a recomendação da IUPAC 1989, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Principais esteróis associados à nomenclatura, comum e científica de acordo com a recomendação da IUPAC (1989).

Nome comum	Nome científico
Colesterol	colest-5-en-3 β -ol
Brassicasterol	(22E)-ergosta-5,22-dien-3 β -ol
Campesterol	(24R)-24-metilcolest-5-en-3 β -ol (Campesta-5-en-3 β -ol)
Campestanol	24-metil-colestan-3 β -ol
Diidrobrassicasterol	ergost-5-en-3 β -ol
Estigmasterol	(22E)-estigmaster-5,22-dien-3 β -ol
β -Sitosterol	estigmast-5-en-3 β -ol
Estigmastanol	estigmastanol
Fucosterol	[24(28)E]-estigmaster-5,24(28)-dien-3 β -ol ([24(241)E]-estigmaster-5,24(241)-dien-3 β -ol)
Δ 5-Avenasterol	[24(28)Z]-estigmaster-5,24(28)-dien-3 β -ol ([24(241)E]-estigmaster-5,24(241)-dien-3 β -ol)
Δ 7-Estigmasterol	(22E)-estigmaster-7,22-dien-3 β -ol
Δ 7-Avenasterol	[24(28)Z]-estigmaster-7,24(28)-dien-3 β -ol ([24(241)E]-estigmaster-7,24(241)-dien-3 β -ol)
Δ 7-Colesterol	colest-7-en-3 β -ol

Referência LOGNAY et alii, 1993.

A estrutura de alguns dos principais esteróis encontrados em plantas é mostrada na Figura 1.

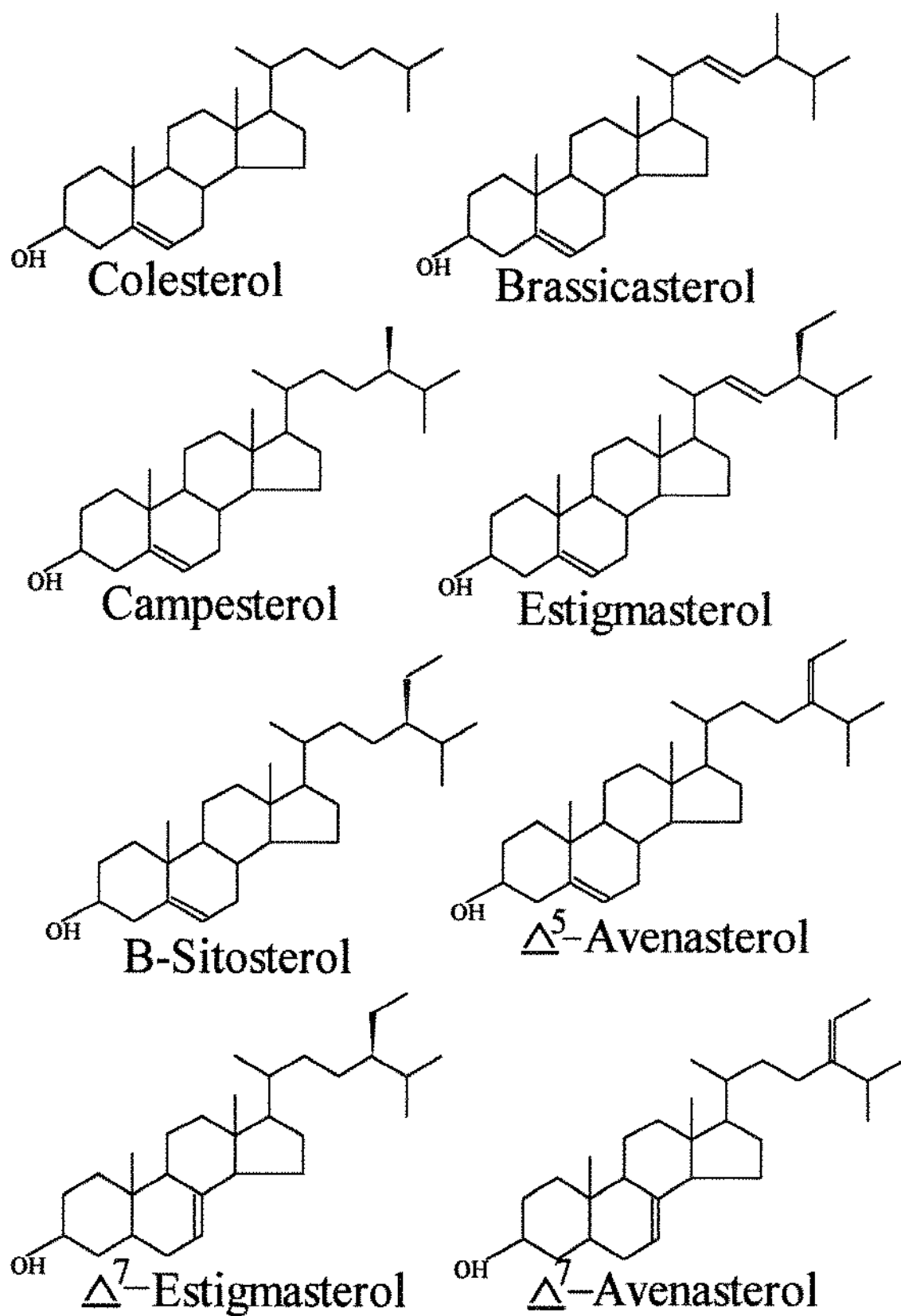


Figura 1- Estrutura dos principais esteróis.

A composição esterólica dos óleos e gorduras tem sido estudada por muito tempo e é empregado como método de rotina para verificar a pureza de óleos, ou definir a mistura destes (MENEGETTI et alii, 1987).

A precipitação dos esteróis pela digitonina foi muito empregada no passado, mas recentemente a cromatografia gasosa é empregada com sucesso na análise qualitativa e quantitativa da fração esterólica. CLAE também pode ser empregada para a determinação da composição esterólica de óleos vegetais (MORDRET et alii, 1985).

A composição esterólica é de suma importância para caracterizar uma espécie botânica: por exemplo, colza primor não contém mais ácido erúico. Os esteróis das clássicas variedades ricas em ácido erúico contêm ao redor de 8% de brassicasterol, característico desta espécie botânica.

Existe também uma variedade de cártamo rica em ácido oleico que pode ser confundida quanto à composição em ácidos graxos com o óleo de oliva, mas a variedade linoleica e a variedade oleica possuem a mesma composição esterólica característica por possuir elevado teor de Δ^7 estenol (WOLFF, 1980).

Gorduras animais raramente contém mais que traços de outros esteróis que não o colesterol, o qual pode estar presente em altos níveis, particularmente na gema do ovo. Óleos vegetais, por outro lado, podem conter um grande número de esteróis na fração insaponificável do óleo, caracterizados pelo uso de CG, cromatografia em camada delgada e espectrometria de massa. Contudo estes estudos não diferenciam entre esteróis livres e esterificados (HAMMOND, 1993).

Esteróis livres e esterificados geralmente ocorrem juntos em óleos vegetais naturais e são sempre analisados, após hidrólise, como parte da matéria insaponificável. Estes dados podem auxiliar na caracterização de óleos. Para melhor informação os esteróis livres e esterificados devem ser separados por cromatografia em camada delgada antes da análise. Isto é relativamente fácil pois estes compostos têm como característica diferentes tempos de retenção. Contudo

a análise destes 2 grupos de compostos requer o uso de sistemas de alta resolução. Colunas empacotadas podem apresentar resultados razoáveis de trimetilsilil derivados de esteróis, em colunas apolares tipo OV-1. Estas colunas não diferenciam entre ácidos graxos saturados e insaturados dos ésteres de esteróis (HAMMOND, 1993).

Esteróis exibem estereoisomerismo e existem pares de epímeros, por exemplo, 22,23-dihidrobrassicasterol e campesterol são epímeros, estigmasterol e poriferasterol também são epímeros. RMN de alta resolução (>100MHZ) pode ser usada para distinguir entre epímeros, mas este tipo de instrumento pode não estar rotineiramente disponível (HAMMOND, 1993).

d) Esteróis esterificados

Esteróis esterificados são misturas complexas, desde que qualquer esterol presente no óleo pode estar esterificado com qualquer ácido graxo de ocorrência natural. Na prática, apesar da composição ser complexa, existem espécies específicas de ambas as composições de esteróis e esteróis esterificados que auxiliam na caracterização de um óleo (HAMMOND, 1993).

Esteróis livres e esterificados geralmente ocorrem em óleos vegetais naturais e são comumente analisados após hidrólise, como parte da fração insaponificável. Estes dados podem auxiliar na caracterização de óleos. Para melhor informação, os esteróis livres e esterificados devem ser separados antes da análise. Isto é relativamente fácil, uma vez que estes compostos têm diferentes características de retenção. Contudo, análise dos membros componentes de dois grupos requer um sistema de alta resolução.

Os esteróis livres podem ser derivatizados e analisados em CG, mas esteróis esterificados formam uma mistura complexa, pois qualquer esterol presente pode estar esterificado com qualquer um dos ácidos graxos que ocorrem naturalmente. Na prática, a composição é complexa, existem espécies específicas e a composição de ambos esteróis livres e esterificados servem para caracterizar um óleo natural. Muitos autores têm proposto este tipo de análise para

identificação de misturas de óleos (HAMMOND, 1993; MILLER & GORDON, 1994).

A determinação de esteróis esterificados é frequentemente realizada em análises clínicas no plasma sanguíneo. Métodos clássicos de análise, como os de reação enzimática e colorimétricas são tediosos e o tempo envolvido é muito longo, além da interferência de outros componentes na análise.

Métodos cromatográficos são aplicáveis na separação da fração de esteróis esterificados. O uso de cromatografia em fase reversa na separação de esteróis esterificados promove uma separação com base no equivalente número de carbonos (ECN) com uma indicação e resolução parcial de alguns pares críticos. A combinação de 2 ou 3 destes métodos é requerida para a completa separação dos esteróis esterificados (PERKINS et alii, 1981).

Na análise de esteróis esterificados através de CG pode ocorrer degradação térmica destes compostos, e nesse caso um fator de correção deve ser utilizado para calibração do sistema nas condições de uso. Como a degradação aumenta pelo tempo de eluição dos esteróis esterificados, fatores de resposta individuais devem ser determinados para os vários esteróis esterificados, o que é contudo inviável por causa das inúmeras possibilidades de combinações dos esteróis com os ácidos graxos existentes nas amostras, os quais irão se combinar para compor a fração de esteróis esterificados (ARTHO et alii, 1993).

O processo de refino é caracterizado por uma diminuição da fração de esteróis livres enquanto a fração esterificada permanece inalterada (MARIANI et alii, 1991).

Importantes informações são perdidas pela saponificação, como a composição dos menores componentes livres e esterificados. Diferentes formas de extração ou métodos de refino surtem diferentes efeitos sobre os componentes livres e esterificados. Somente poucos trabalhos relatam a análise de esteróis na forma livre e esterificada. Estes são usados para determinar a influência do processo de refino no óleo.

2.2.3.2. Vitaminas lipossolúveis

a) Vitamina E, tocoferóis e tocotrienóis

Um grupo de componentes, dentre os constituintes da matéria insaponificável de óleos e gorduras, que desperta grande interesse são os tocoferóis e tocotrienóis devido ao seu caráter vitamínico e atividade antioxidante. Este grupo de substâncias apresenta em sua estrutura zonas particularmente reativas: a) um grupo fenólico livre, b) a presença, exceto no caso do isômero α , de posições livres no anel aromático e c) por ser de natureza monoéteres de uma hidroquinona. Mas por outra parte, estas substâncias são susceptíveis de sofrer fenômenos de polimerização como consequência de sua oxidação. Estas possibilidades de transformação fazem que alguns tratamentos, a que são submetidos os óleos e as gorduras que os contém, possam incidir sobre as suas estruturas e as modifiquem, em consequência, a estabilidade do produto final e o valor nutritivo, quanto ao conteúdo vitamínico, podem ser alterados (RABASCALL & RIERA, 1987.)

A existência da vitamina E foi descoberta em 1922 por Evans e Bishop (BALL, 1988). Existem basicamente, 8 formas (estruturas) de vitamina E na natureza: 4 tocoferóis e 4 tocotrienóis. A biossíntese dos tocoferóis é exclusivamente vegetal.

Tocoferóis são derivados do metil-substituído tocol, e constituídos de um núcleo cromanol-6-ol ligado ao C-2 uma cadeia composta de 3 unidades de isopreno saturadas. Tocotrienóis são estruturas similares onde esta cadeia contém 3 duplas ligações. Os tocoferóis e tocotrienóis são designados como alfa -(α), beta -(β), gama -(γ) e delta -(δ), e diferem de acordo com o número de grupos metílicos que possuem no núcleo de cromanol como pode ser visto na Figura 2.

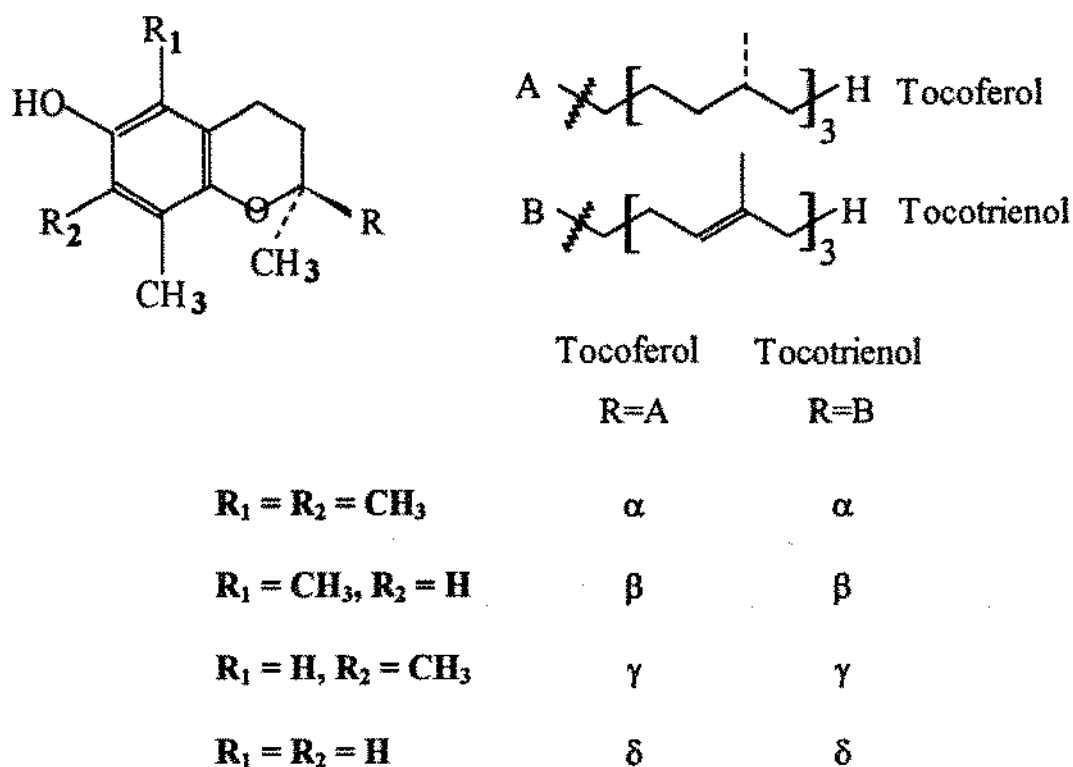


Figura 2- Estrutura de tocoferóis e tocotrienóis

As formas β e γ são isômeros posicionais. A atividade biológica do tocoferol esta na ordem $\alpha > \beta > \gamma > \delta$.

O termo tocoferol refere-se especificamente ao tocol metil substituido, enquanto que vitamina E refere-se a tocoferóis e tocotrienóis coletivamente.

Dentre os grãos, o milho tem o mais elevado teor de vitamina E, cerca de 8 mg/100g.

Oxidação da vitamina E é acelerada pela exposição à luz, aquecimento, condições de pH alcalino, e a presença de certos traços de minerais, como cobre (Cu^{2+}) e ferro (Fe^{3+}).

A vitamina E é estável ao aquecimento e tratamento alcalino na ausência de oxigênio, são lentamente oxidados sob atmosfera de oxigênio, um processo que é rapidamente aumentado pelo aquecimento e catalisado por ferro e sais de prata. Sob exposição à luz, o tocoferol gradualmente escurece. São estáveis à luz visível, mas destruídos pela luz UV, especialmente na presença de oxigênio.

Vitamina E faz parte do rol dos antioxidantes, protege os lipídios da oxidação pela combinação com radicais livres (PFALZGRAF et alii, 1995; PONGRACZ et alii, 1995), e por isso é empregada para estabilizar óleos e gorduras.

No combate a oxidação lipídica, vitamina E sofre auto oxidação, especialmente por hidroperóxidos, os quais são produtos da oxidação de ácidos graxos insaturados. Os produtos da oxidação da vitamina E incluem quinonas, hidroquinonas e tocoperóxidos, tanto quanto dímeros e trímeros.

Óleo de milho refinado contém menos da metade do conteúdo de α -tocoferol encontrado em óleo recém extraído. Pouca ou nenhuma vitamina E é destruída durante a hidrogenação de óleos. Vitamina E não esterificada exibe uma grande fluorescência nativa, α -tocoferol exibe excitação e emissão máxima a 295 nm e 330 nm, respectivamente (BALL, 1988).

Existe um conflito evidente relativo à atividade antioxidante de tocoferóis individuais *in vitro*. Estudo detalhado realizado por BURTON e INGOLD (1981) revelou que a ordem da atividade *in vitro* dos tocoferóis é a mesma que sua atividade biológica, $\alpha > \beta > \gamma > \delta$, apesar de não serem encontradas diferenças significantes na atividade antioxidante dos isômeros β e γ .

De acordo com YAMAOKO et alii (1985), tocotrienóis (formas α e β) possuem atividade antioxidante ligeiramente superior ou igual à de seu correspondente tocoferol.

Cromatografia gasosa foi empregada para determinação de tocoferóis (GUTFINGER & LETAN, 1972; RAMAMURTHI & McCURDY, 1993; SLOVER et alii, 1983), contudo atualmente a cromatografia líquida de alta eficiência tem sido mais recomendada neste campo (LOZANO et alii, 1993).

Enquanto que na análise quantitativa de vitamina E e seus isômeros é necessário, que por diversas metodologias se faça a saponificação do óleo para se efetuar a determinação de tocoferóis, em cromatografia líquida de alta eficiência

estas etapas preliminares não são necessárias na determinação destes componentes em óleos e gorduras (ULBERTH et alii, 1992).

A variação do conteúdo de tocoferóis e tocotrienóis durante os processos de extração, refino e hidrogenação de óleo de oliva através da extração da fração insaponificável e análise por CLAE, utilizando-se coluna RP-18, fase móvel metanol/água (95:5) e detector de UV, foi realizada por RABASCALL & RIERA (1987).

JUNG et alii (1989) investigaram o efeito das etapas de processamento tecnológico no conteúdo de alguns componentes minoritários em óleos de soja.

Análise de tocoferóis em óleos vegetais via CLAE, com comparação do uso de detector de fluorescência e detector de massa, foi avaliada por CHASE et alii (1994), onde os autores concluem que neste caso o detector de fluorescência foi dez vezes mais sensível que o detector de massa.

Tocoferóis e tocotrienóis foram bem separados pela eluição em CLAE com coluna Diol com utilização de n-hexana/TBME (96:4) e detector de fluorescência. Este método foi empregado com sucesso na análise de óleos de diversas fontes injetados diretamente sem prévias etapas de purificação (BALZ et alii, 1992; BALZ et alii, 1993).

b) Vitamina D

São vitaminas provenientes da fotólise ultra violeta, in vitro ou in vivo, dos esteróis. A vitamina D2 (ergocalciferol) e D3 (colecalciferol) diferem unicamente pela estrutura de uma cadeia lateral como mostra a Figura 3.

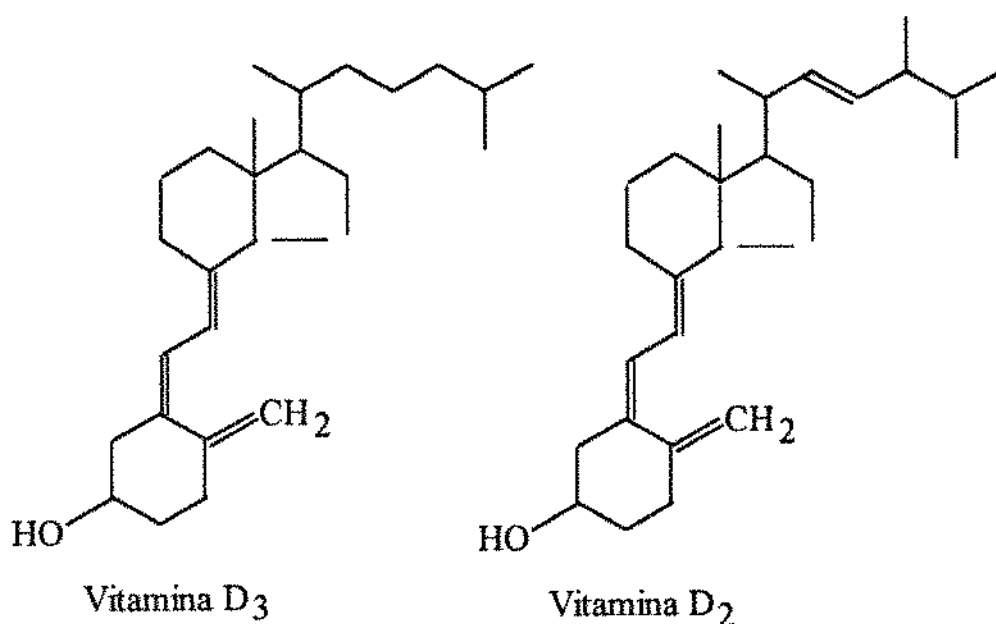


Figura 3- Estrutura da vitamina D₂ (ergocalciferol) e D₃ (colicalciferol)

A provitamina D₂ (ergosterol) é abundante no óleo de germe de trigo e a vitamina D₃ é obtida por síntese a partir do colesterol (KARLESKIND, 1992).

2.2.3.3. Álcoois graxos

São compostos encontrados em pequenas quantidades na matéria insaponificável provenientes da hidrólise de diversos ésteres. Os álcoois primários alifáticos, com longas cadeias lineares saturados ou monoinsaturados, provêm da hidrólise, basicamente, de ceras ou estão presentes na forma de ésteres de ácidos graxos, biossintetizados pela redução dos ácidos graxos. Têm geralmente um número par de átomos de carbono, embora existam álcoois com número ímpar de carbonos, provenientes da α oxidação dos ácidos graxos. O fitol é proveniente da saponificação das clorofilas (KARLESKIND, 1992).

2.2.3.4. Hidrocarbonetos

A fração insaponificável dos lipídios naturais contém uma pequena quantidade de hidrocarbonetos diversos: os alifáticos saturados e insaturados e os hidrocarbonetos de origem terpênica. A quantidade total destes hidrocarbonetos está geralmente na faixa de 10% da fração insaponificável (KARLESKIND, 1992).

a) Hidrocarbonetos alifáticos

São hidrocarbonetos lineares, possuem número de carbono que varia de 11 a 35, possuem portanto número ímpar de átomos de carbono provenientes da descarboxilação dos ácidos graxos. Estão presentes nas cutinas de diversos tecidos vegetais (KARLESKIND, 1992).

b) Hidrocarbonetos de origem terpênica

O esqueleto carbônico dos terpenos provém de uma oligomerização da acetilcoenzima A. A trimerização da acetilcoenzima A conduz ao ácido mevalônico (6 átomos de carbono) que, após fosforilação e descarboxilação produz os pirofosfatos de isopentenila e de dimetilalila, a condensação entre as unidades de 5 átomos de carbono dão sucessivamente os pirofosfatos de geranila (10C, precursor dos monoterpênos), de farnesila (15C, precursor dos sesquiterpênicos), de geranilgeranila (20C, precursor dos diterpenos).

O esqualeno, hidrocarboneto hexainsaturado com 30 átomos de carbono, precursor dos triterpênos, provem da dimerização reduzida do pirofosfato de farnesila, e é frequentemente encontrado nos vegetais e animais (KARLESKIND, 1992).

2.2.3.5. Carotenóides

Os carotenóides são sintetizados unicamente pelos vegetais, sendo compostos que possuem cor e contribuem para a coloração dos óleos vegetais. Os principais carotenos encontrados nos óleos vegetais são o β -caroteno, habitualmente majoritário, α -caroteno, γ -caroteno, licopeno, fitoeno e outros.

As xantofilas são substâncias lipofílicas produzidas unicamente pelos vegetais. As principais xantofilas encontradas em lipídios vegetais são a zeaxantina e a luteína (KARLESKIND, 1992).

Uma das mais conhecidas classes de pigmentos são os carotenóides, os quais são responsáveis pela cor amarela ou avermelhada da maioria dos óleos, contudo sua concentração é baixa. Os carotenóides são altamente insaturados,

hidrocarbonetos de polisopreno, e seus derivados oxigenados. Estes são solúveis em óleos e gorduras e insolúveis em água. Carotenóides não são separados do óleo pelo refino alcalino.

Estes pigmentos são instáveis ao aquecimento, se os óleos são clarificados sob altas temperaturas, e desodorizados, ocorre a parcial remoção e volatilização destes compostos (SWERN, 1979).

A determinação de carotenóides por métodos de análise convencionais demandam longo tempo e aqueles que empregam saponificação têm o grande risco de acarretar perdas.

Carotenóides constituem um grupo dos mais importantes pigmentos naturais. São importantes também porque alguns são precursores da vitamina A (ALMELA et alii, 1990). Uma forma muito comum, β -caroteno, é muito estudada, devido a alta equivalência entre este carotenóide e a vitamina A; 1 μ g de vitamina A (Retinol) é equivalente a 6 μ g de β -caroteno.

2.2.3.6. Outros constituintes

Neste grupo se pode citar os alcanos cíclicos, hidrocarbonetos mono, di e sesquiterpênicos, monoésteres diversos, compostos lipofílicos, flavonóides. O glucosinolato que aparece nas plantas da família das Crucifereae, das Resedaceae e Capparidaceae, substância tóxica para diversos animais, são provenientes da evolução particular de certos aminoácidos e são encontradas notadamente em óleos brutos de colza e mostarda. O gossipol é um triterpeno aromático presente no óleo de algodão (KARLESKIND, 1992).

2.2.4. Clorofilas e seus derivados

As clorofilas constituem os pigmentos verdes dos vegetais, fundamentais na fotossíntese. Estes pigmentos são lipossolúveis.

Na maioria dos óleos vegetais, derivados de clorofilas são substâncias indesejáveis. Estes derivados de clorofilas devem ser removidos por adsorventes, como argilas ativadas, carvão ou sílica no processo de clarificação. Trabalhos

recentes têm evidenciado a ocorrência de derivados de clorofila em óleo de canola. Métodos analíticos que determinem estes derivados de forma rápida têm sido pesquisados (SUZUKI & NISHIOKA, 1993; ENDO et alii, 1992).

Clorofilas são conhecidas como fotosensibilizadores de óleos comestíveis (RAHMANI & CSALLANY, 1991), promovem a oxidação sob exposição do óleo à luz, o que resulta em rancidez (GUTIÉRREZ-ROSALES et alii, 1992).

2.2.5. Produtos de alterações

Numerosos rearranjos e produtos de decomposição acontecem durante o processamento de óleos. Oxidação e polimerização podem ocorrer em todas as etapas do refino. Alguns poucos trabalhos foram realizados para se caracterizar o efeito de cada estágio do processamento na oxidação, conjugação e polimerização de óleos. Tem-se demonstrado a ineficiência do índice de peróxidos para determinar a qualidade de um óleo.

Produtos da decomposição oxidativa, os quais normalmente ocorrem quando um óleo é exposto à presença de oxigênio, podem aparecer durante o processamento. YASUDA e colaboradores (1975) identificaram 47 compostos voláteis do “flavor” desenvolvido durante a estocagem de óleo de soja desodorizado. Estes compostos incluem cetonas, aldeídos, álcoois e lactonas, responsáveis pelos odores indesejáveis no óleo.

Polimerização também pode ocorrer por duas formas: polimerização térmica na ausência de ar (como no caso da desodorização), ou polimerização oxidativa, quando o oxigênio está presente. Polimerização térmica produz dímeros e polímeros. A oxidação dos ácidos graxos polinsaturados a temperaturas abaixo de 100°C pode levar à formação de hidroperóxidos conjugados, que produzem radicais livres. Estes podem formar polímeros.

A importância em considerar estes produtos de degradação está na sua toxicidade. OHFUJI & KANEDA (1973) fracionaram óleos oxidativamente polimerizados e encontraram muitas frações tóxicas. Uma destas foi postulada

como sendo moléculas de triacilgliceróis dímeros, que mostraram-se, em particular, extremamente tóxicas.

Isomerização geométrica pode ocorrer, com formação de trans isômeros, durante etapas do processamento tecnológico (SLEETER, 1981).

Os óleos e gorduras brutos obtidos industrialmente a partir de matérias primas estocadas por longos períodos, contêm produtos de oxidação. O fenômeno da oxidação ocorre sob a ação do oxigênio do ar. Esta reação é catalisada pela ação de lipoxigenases e lipoxidases presentes nos tecidos, e favorecida pela presença da luz, e elevação da temperatura.

Aldeídos e cetonas de origem oxidativa podem estar presentes nos óleos e gorduras e são responsáveis pelos odores indesejáveis.

2.2.5.1. Polímeros e dímeros de triacilgliceróis

Durante o aquecimento de óleos e gorduras ocorre a formação de compostos com alto peso molecular e polaridade (WALTKING & WESSELS, 1981; GUHR et alii, 1981). Isto decorre de um ciclo de reações de oxidação envolvendo a formação de hidroperóxidos com posterior formação de radicais livres, que no processo de oxidação irão envolver ácidos graxos de triacilgliceróis intactos produzidos, bem como triacilgliceróis de hidrólise. Os radicais livres podem reagir e formar polímeros e outros produtos complexos de reação. Triacilgliceróis intactos e alterados podem ser envolvidos via polimerização ou intermolecular. Como resultado destas reações uma mistura complexa de produtos de alto peso molecular e polaridade são formados (ARROYO et alii, 1992).

O conteúdo de compostos minoritários glicerídicos formados durante a autooxidação dos óleos e gorduras geram compostos polares provenientes de alterações que são principalmente provocadas pela ação do oxigênio e altas temperaturas. As degradações térmicas e oxidativas ocorrem nas insaturações dos triacilgliceróis, modificando as propriedades nutricionais dos lipídios. Os

compostos polares não diferem somente na polaridade ou peso molecular, mas também tem grande importância do ponto de vista nutricional.

Uma variedade de compostos de degradação de óleos e gorduras são os triacilgliceróis dímeros e polimerizados. Aquecimento prolongado pode aumentar o teor destes compostos no produto. Recentemente tem se aumentado o interesse pelos triacilgliceróis poliméricos formados durante a autoxidação de óleos e gorduras insaturadas e sua influência na qualidade destes lipídios (BURKOW & HENDERSON, 1991).

Vários esforços têm sido feitos para que seja definida uma metodologia analítica para o controle de qualidade de óleos onde estes compostos possam ser detectados de forma relativamente rápida e simples.

Recentemente tem crescido o interesse pelos triacilgliceróis poliméricos formados durante a autoxidação de óleos e gorduras insaturados e sua influência na qualidade destes lipídios (BURKOW & HENDERSON, 1991).

Um método por cromatografia a gás para a determinação de polímeros e produtos oxidativos de óleos vegetais foi adotado pela AOAC internacional como método oficial, contudo a cromatografia de permeação em gel baseada em cromatografia de exclusão molecular, combinada com a cromatografia líquida é um método analítico mais apropriado para se determinar triacilgliceróis polimerizados em óleos (CHISTOPOULOU & PERKINS, 1989). Este método foi adotado pelo IUPAC. O método foi testado em um estudo colaborativo por 13 laboratórios. A separação por peso molecular ocorre conforme a exemplificada na Figura 4.

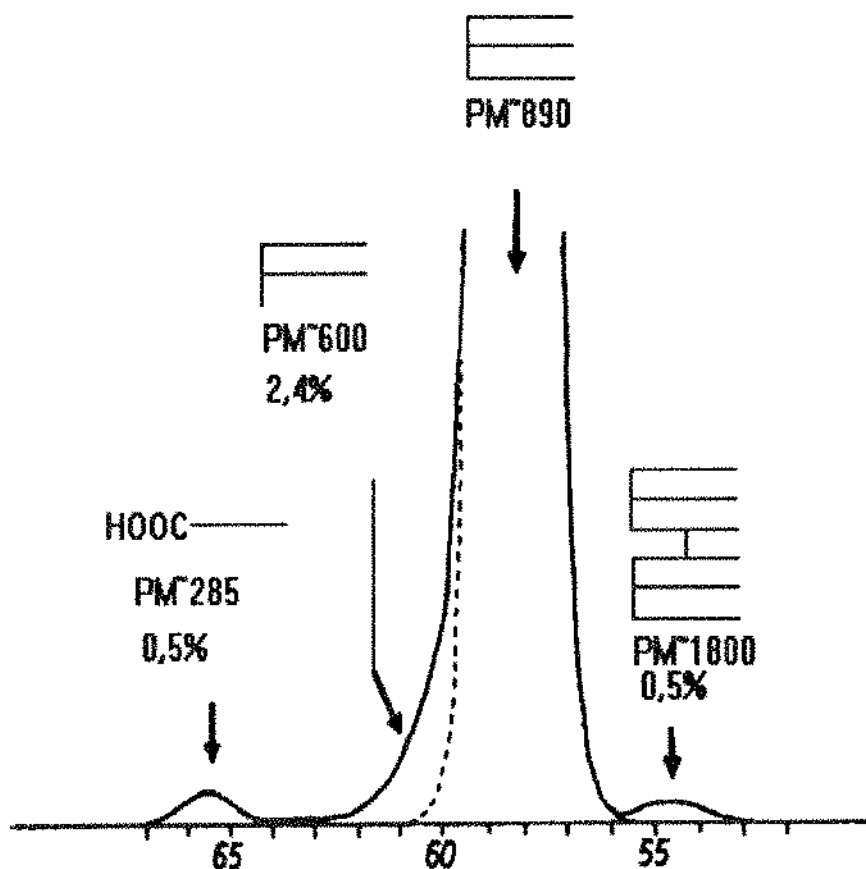


Figura 4- Cromatograma da separação por peso molecular obtido através de permeação em gel (BILLEK, 1992)

Lipídios poliméricos são formados por uma reação de catálise intermolecular dos ácidos graxos em diferentes moléculas de triacilgliceróis. Ligações carbono carbono podem ocorrer entre ácidos graxos, ou estes podem formar pontes entre as moléculas. Estes compostos são formados em quantidades apreciáveis quando óleos são submetidos a abusos térmicos, como no caso de frituras. Contudo sabe-se que estes, podem também, estar presentes em óleos refinados. Oxidação é o maior fator de sua formação, mas é provável que a desodorização durante o processo de refino, onde óleos são aquecidos em elevadas temperaturas, possa contribuir substancialmente para este tipo de problema.

A formação potencial de substâncias carcinogênicas e compostos com propriedades antinutricionais durante o uso de óleos em frituras, e os riscos para o consumidor tem sido estudados (BOOT & SPEER, 1994).

O efeito do potencial tóxico de ácidos graxos poliméricos, oxidados e cíclicos em óleos de fritura tem sido estudado por muitos (CUESTA et alii, 1992; CHRISTIE, 1995)), e uma técnica que auxilie nesta identificação é bem vinda. Uma excelente revisão da aplicação de cromatografia de exclusão na análise de lipídios foi feita por DOBARGANES & MÁRQUEZ-RUIZ (1993).

Na aplicação com lipídios as colunas mais usadas são as de copolímeros de estireno e divinilbenzeno com poros de 100 a 500 Å. A fase móvel mais utilizada é tetrahidrofurano (FIRESTONE, 1994; GERTZ, 1986), entretanto diclorometano (GOMES, 1992; GOMES, 1994), e tolueno também são empregados. Detecção por índice de refração tem sido utilizada, mas detector de massa também pode ser empregado. O instrumental requerido para a análise é relativamente modesto, a eluição isocrática pode ser utilizada com reciclagem da fase móvel, o que torna possível a aplicação desta técnica no controle de qualidade. A maior desvantagem é o custo elevado das colunas (CHRISTIE, 1995).

A análise de produtos da decomposição em óleos originários de tratamento térmico e oxidativo tem sido muito utilizada. Apesar de existirem diversos métodos analíticos para a análise destes compostos polares, a técnica de HPSEC pode ser considerada uma das mais promissoras. Isto porque torna possível a quantificação de grupos de compostos alterados: polímeros e dímeros de triacilgliceróis, triacilgliceróis oxidados, diacilgliceróis e ácidos graxos livres (SANCHES-MUNIZ et alii, 1993).

Muitas publicações utilizando o método de HPSEC na análise do nível de polimerização de óleos sem tratamento foram apresentadas (DOBARGANES & PÉRES-CAMINO, 1987). Um estudo colaborativo de padronização de tipo de método de análise foi apresentado por WOLFF et alii (1991). Os autores

concluem que o HPSEC facilita a rápida determinação do conteúdo de polímeros em quantidade igual ou maior que 3% (p/p) do total da gordura. Pela combinação de cromatografia de adsorção e HPSEC, é possível avaliar a qualidade de óleos pela quantificação de diferentes grupos polares de produtos de alteração. Trabalhos tem sido publicados onde a quantificação de produtos de alteração, como material polimérico, triglicerídios oxidados, diglicerídios e ácidos graxos livres são reportados em óleos de fritura e amostras não aquecidas. A fração polar das amostras é separada e analisada em HPSEC (DOBARGANES et alii, 1988).

BILLEK (1992) relata que durante a desodorização pequenas quantidades de triacilgliceróis dímeros são formados, dependendo da temperatura e da duração destes processo. Numerosas investigações tentam identificar as reações químicas as quais são, predominantemente, isomerização, a polimerização e reações de oxidação. A associação de ácidos graxos oxidados pode levar à formação de ácidos graxos cíclicos, ácidos graxos dímeros e triacilgliceróis dímeros conforme Figura 5.

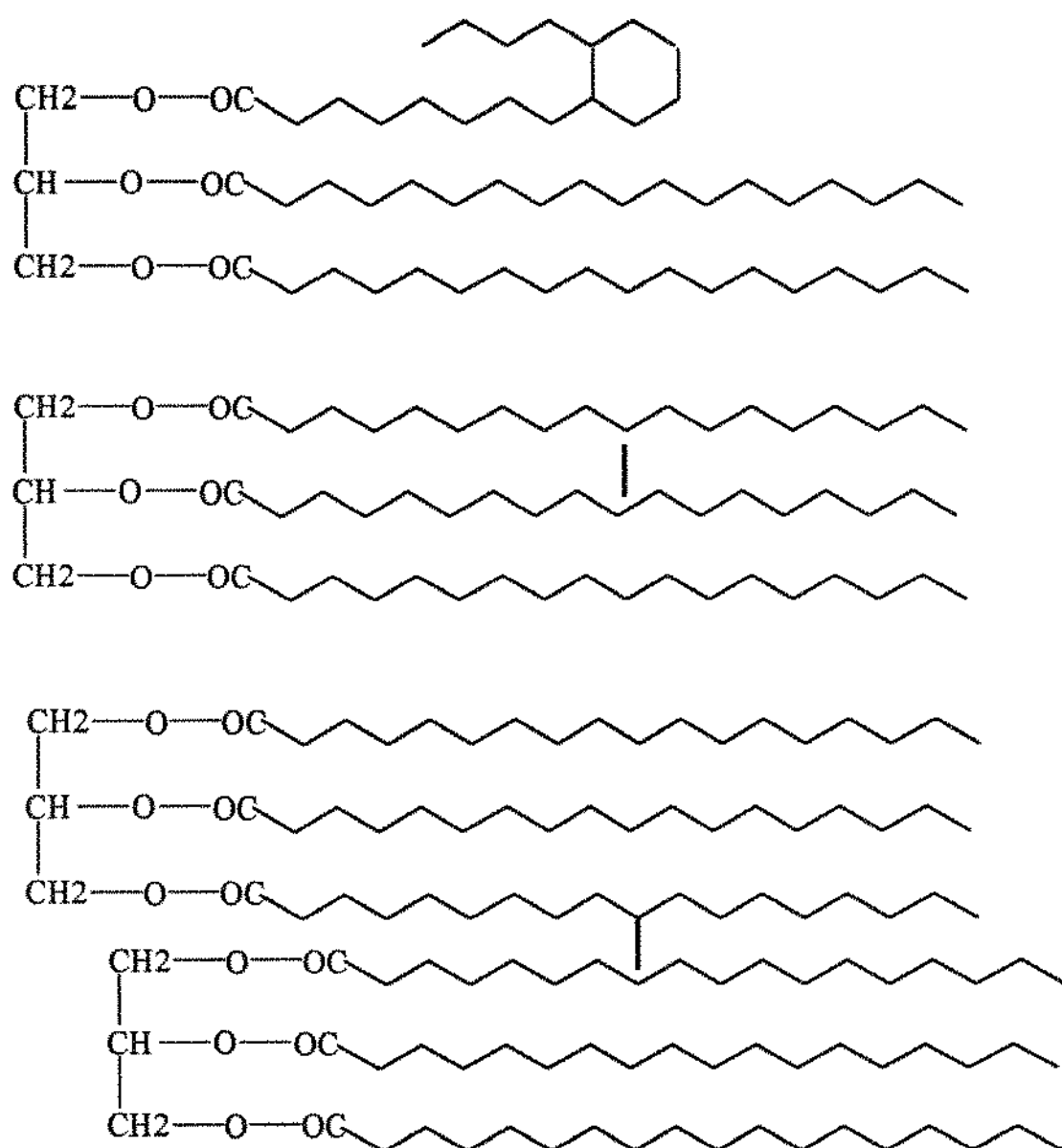


Figura 5- Associação de ácidos graxos com formação de ácidos graxos cíclicos, ácidos graxos dímeros e triacilgliceróis dímeros (BILLEK, 1992)

2.2.5.2. Esteroldienos

O refino de óleos e gorduras remove e transforma uma série de compostos. As perdas e as transformações que ocorrem com os componentes minoritários durante as diversas etapas do refino são parâmetros usados para a determinação analítica do refino.

Basicamente existem numerosas possibilidades. Fosfolipídios, ubiquinonas, carotenóides e clorofilas; os quais são completamente removidos pelo refino (GROB et alii, 1992).

Alguns autores têm descrito que ocorrem variações na composição de esteróis com perdas durante o refino (GHIMENTI, 1974; LEONE et alii, 1984; SERANI & PIACENTI, 1992; SERANI & PIACENTI, 1994).

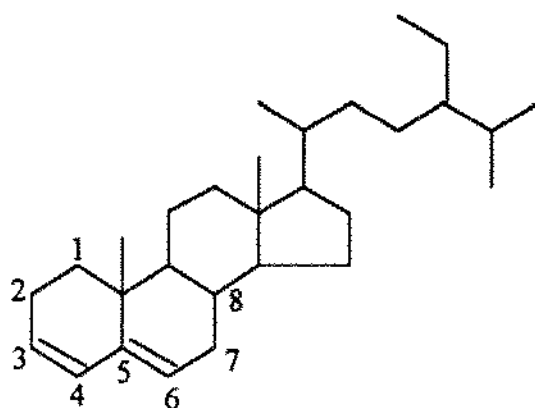
Esteróis são sensíveis ao branqueamento, desidratação pode ser observada depois desta etapa e de outros tratamentos com temperaturas elevadas. Desta forma esteroldienos são formados durante o refino pela desidratação dos esteróis. Os principais produtos de degradação olefinica são listados na Tabela 4.

Tabela 4- Principais produtos de degradação olefinica de esteróis.

Principais Esteróis	Produto de degradação olefinica
β -Sitosterol	Estigmastadieno
Estigmasterol	Estigmastatrieno
Campesterol	Campestadieno
Brassicasterol	Campestatrieno

Referência GROB et alii, 1994.

A estrutura do 3,5- Estigmastadieno é apresentada na Figura 6.



3,5- Estigmastadieno

Figura 6- Estrutura do 3,5- estigmastadieno (GROB et alii, 1994)

Os produtos de degradação olefinica encontrados em óleos representam os diferentes estágios do clássico processo de refino.

Óleos brutos estão livres de produtos de degradação. Em amostras analisadas por GROB et alii (1992) foi constatado que a neutralização não produz produtos de degradação olefinica. Estes são primariamente formados durante o branqueamento.

A composição dos produtos de degradação olefinicas refletem de que esterol estes foram originários. Esteroldienos bem como diesteril ésteres são formados na superfície de argilas ácido ativadas, utilizadas na etapa de clarificação de óleos. Esteroldienos são formados em grande quantidade na superfície de argilas clarificantes ativadas com ácido pela desidratação dos esteróis.

Argilas clarificantes catalisam eficientemente a desidratação dos esteróis e a isomerização do esqualeno. A catálise da degradação dos esteróis é de grande importância e depende do tipo de argila empregada no processo de clarificação.

Quando se aumenta a quantidade de argila adicionada ao óleo eleva-se o teor de produtos de degradação olefinicas formados. Estes são formados somente quando há quantidade de argila em excesso. A quantidade de argila adicionada é desativada pela adsorção de material polar do óleo. Produtos de degradação

olefinicas como esteroldienos são considerados como produtos extremamente apolares.

Tratamento térmico sem suporte catalítico, contudo somente produz quantidades apreciáveis de esteroldienos quando a temperatura excede 160°C, como no caso da desodorização.

GROB et alii 1992 constataram que a clarificação empregando carvão ativo leva a menor quantidade de produtos de degradação que o tratamento com argilas.

A formação de esteroldienos durante a desodorização também tem sido relatada (SCHULTE, 1994). Estes compostos são parcialmente removidos durante a etapa de desodorização do óleo, mas uma parte ainda permanece no óleo refinado.

O processo de desodorização, como é normalmente aplicado, a temperaturas de 200-260°C criam e removem produtos de degradação ao mesmo tempo. A formação de produtos de degradação olefinicas pela desodorização começa notadamente em temperaturas acima de 180°C. Sabe-se que a desodorização a 180°C remove mais material do que produz. A concentração de produtos de degradação olefinica depende da temperatura empregada no processo.

LANZÓN et alii 1989 propuseram a análise destes produtos de degradação olefinica para a determinação do refino, pois produtos da degradação olefinica de esteróis e esqualeno permanecem no óleo refinado. Atualmente, a análise destes compostos tem sido empregada para a detecção de adulteração de óleos (GROB et alii, 1994a; GROB et alii, 1994b; GROB et alii, 1994c; GROB et alii, 1994d; GROB et alii, 1995).

A análise dos esteróis desidratados tem tido muita importância como método para detectar branqueamento de óleos e gorduras. Esteróis desidratados são componentes menores, mas constituintes sempre presentes em óleos refinados. Estes artefatos do processo, bem como diesteril éteres, são formados

dos esteróis durante o curso do branqueamento industrial. A geração destes compostos depende predominantemente do modo de ativação das argilas clarificantes. A análise dos esteróis desidratados pode ser útil para provar que óleos e gorduras refinadas passaram através do processo de clarificação. Sobretudo, a ocorrência destes compostos pode ser usada na detecção de óleos refinados ou misturas com óleos declarados como genuínos. A formação de esteroldienos dos fitosteróis por tratamentos a altas temperaturas em presença de oxigênio tem sido reportada. Efeitos deletérios dos esteróis desidratados sobre a saúde humana não foram detectadas.

Geralmente, artefatos de esteróis desidratados são isolados da fração insaponificável de óleos e gorduras. A saponificação tem sido conduzida a baixas temperaturas, sob nitrogênio por causa da formação de produtos da autooxidação de esteróis na presença do ar. Os esteróis desidratados, apolares, são separados dos outros lipídios insaponificáveis. Eles são fracionados por cromatografia em camada delgada em sílica gel ou argentação em diferentes classes de compostos desidratados, e por CG separados em compostos individuais. CLAE pode ser usada na análise dos esteróis desidratados (KAIMAL et alii, 1993).

2.2.5.3. Ácidos graxos *trans*

Os ácidos graxos monoinsaturados são os mais abundantes ácidos graxos na natureza. A forma *cis* de isômero geométrico é a predominante na natureza. A localização da insaturação, a dupla ligação, nos ácidos graxos octadecenóicos ocorre no meio da molécula, ou seja na posição D9 contando da carboxila no final. O ácido graxo que tem sido descrito como *cis*-9-octadecenóico, é comumente chamado de ácido oleico. Este é provavelmente o ácido graxo mais abundante na natureza.

Trans monômeros, principalmente de octadecenoatos, são compostos minoritários na maioria dos óleos e gorduras. A exceção é o percentual de ácidos graxos *trans* que ocorrem nas gorduras dos ruminantes como em manteiga e sebo bovino.

Desde que os ácidos graxos monoinsaturados representam 10% ou mais do total de calorias em nossa dieta, é importante examinar a literatura sobre os efeitos destes ácidos graxos na saúde humana.

A configuração geométrica *cis* e *trans* dos ácidos graxos monoinsaturados pode ser vista na Figura 7.

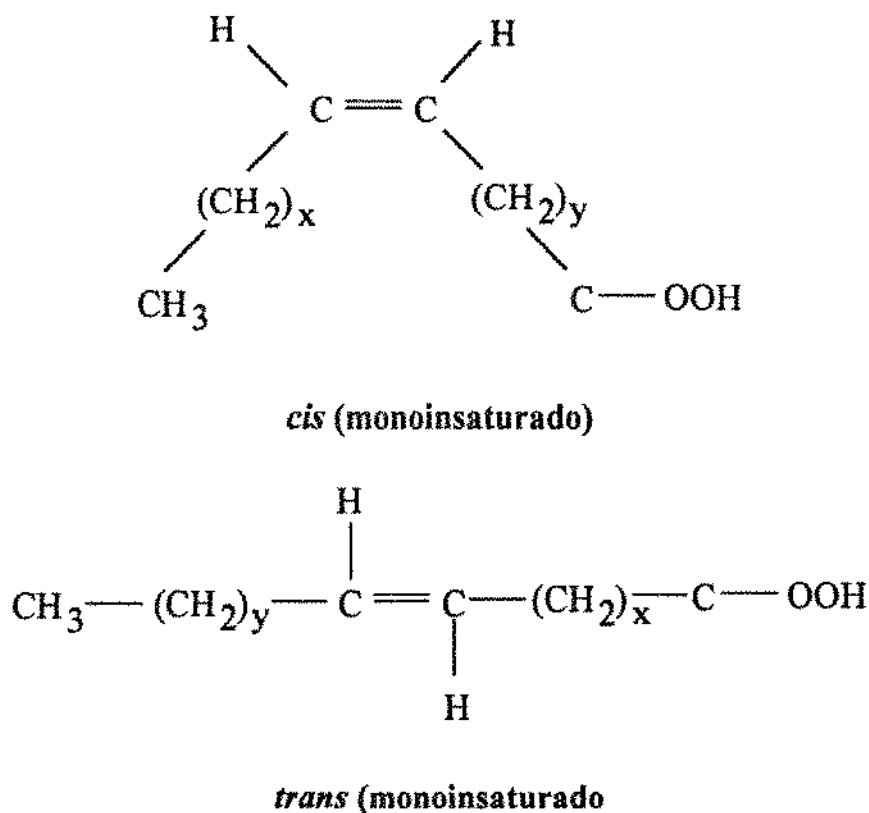


Figura 7- Configuração geométrica *cis* e *trans* dos ácidos graxos monoinsaturados.

A dupla ligação *cis* tem configuração com alta energia, evidenciada pelo fato de que o ácido oleico é líquido a temperatura ambiente com um ponto de fusão de 16,3°C. A dupla ligação *trans* é uma configuração de energia menor que a ligação *cis*, a molécula assume um arranjo linear como a dos ácidos graxos saturados. O ácido graxo com configuração *trans* na mesma posição do seu isômero *cis*, o ácido elaidico, é sólido a temperatura ambiente com ponto de fusão a 45°C. Os ácidos graxos monoinsaturados com configuração *trans* são metabolicamente diferentes do seu isômero *cis*.

Ácidos graxos contendo insaturações na forma *trans* não estão presentes na maioria das plantas oleaginosas comuns (WOOD, 1992).

O teor de isômeros *trans* existentes em produtos contendo óleos e gorduras tem atualmente despertado grande interesse devido principalmente as implicações nutricionais que elevados teores destes ácidos graxos podem acarretar.

As substâncias graxas naturais são fundamentalmente constituídas de triacilgliceróis, os quais são ésteres de glicerol com ácidos graxos. Estes últimos quando insaturados tem uma característica de possuírem a dupla ligação com configuração geométrica fundamentalmente na posição *cis*.

Contudo ácidos graxos *trans* podem ser formados em algumas operações tecnológicas, como a hidrogenação, durante a qual uma parte significativa de duplas ligações dos ácidos graxos apresentam configuração *trans*.

Ácidos graxos *trans* não são formados apenas durante a hidrogenação, mas podem ser também formados durante a fase de branqueamento e desodorização no processo de refino (AMELIO et alii, 1993).

Tem sido demonstrado que sob estas condições ocorre a formação de isômeros geométricos dos ácidos graxos insaturados (WOLFF, 1992; WOLFF, 1994).

ACKMAN (1994) relatou a existência de ácidos graxos não usuais, que são identificados como mono-*trans*, di-*cis* isômeros do ácido α -linolenico, produzidos durante a desodorização em óleo de soja refinado no Canadá e Estados Unidos.

Ácidos graxos *trans* tem feito parte da dieta humana desde muito tempo, devido a sua ocorrência em pequenas quantidades no leite e gordura corporal de animais ruminantes. Contudo, a produção em grande escala de gorduras com altos teores de ácidos graxos *trans* em alimentos começou há cerca de 100 anos, depois da industrialização da margarina. A produção de margarina foi inicialmente realizada para se obter uma gordura como a manteiga. Isto foi

possível depois da introdução de hidrogenação. Este processo foi utilizado para se aumentar o ponto de fusão de óleos e gorduras, para obtenção de gorduras sólidas e aumentar a resistência de óleos a oxidação. A hidrogenação agora permite à industrialização de uma variedade de gorduras com diferentes texturas e estabilidades. Ácidos graxos *trans* de óleos parcialmente hidrogenados fazem parte da dieta humana no último século. Todos os ácidos graxos insaturados apresentam pelo menos uma dupla ligação entre 2 átomos de carbono. Por que não há rotação da dupla ligação, é possível a criação de 2 moléculas com configuração diferente. Na configuração *cis* os 2 carbonos estão do mesmo lado na dupla ligação, e na *trans* eles estão em lados opostos. Desta forma, 2 isômeros com um mesmo número de carbonos, hidrogênio e oxigênio podem ter estrutura tridimensional diferente. Quando os isômeros tem dupla ligação na mesma posição na cadeia carbônica, mas apresentam configuração diferente são chamados de isômeros geométricos. Em adição a este isomerismo espacial, a dupla ligação pode estar localizada em qualquer parte ao longo da cadeia carbônica, muitos isômeros posicionais podem também existir. Isômeros geométricos e posicionais tem diferentes características químicas e físicas (MENSINK & KATAN, 1993).

As gorduras dos animais ruminantes podem conter entre 5 a 7% de isômeros *trans* (HERNÁNDEZ et alii, 1991).

2.2.6. Contaminantes

Contaminação de alimentos não é um problema recente. Contudo durante o último século, o risco de um alimento estar contaminado por um agente químico ou biológico tem aumentado. Contaminantes em geral são definidos como qualquer substância ou agente que está presente num alimento e é considerado indesejável.

Algumas substâncias, as quais não ocorrem naturalmente, podem estar presentes em óleos brutos, ou ainda serem adicionadas durante o refino. Estes incluem os pesticidas, PCB, hexana residual e óleo térmico (SLEETER, 1981).

2.2.6.1. Pesticidas, herbicidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Pesticidas, herbicidas e outras substâncias empregadas intencionalmente na agricultura são considerados contaminantes em alguns países. Um importante número de programas internacionais existem na área de controle de contaminantes e resíduos de pesticidas em alimentos (SMITH, 1982).

Muitos trabalhos foram publicados, onde a presença de pesticidas em óleos são estudados em função das etapas de processamento. Os resultados, de uma forma geral, demonstram que os pesticidas são reduzidos ligeiramente em cada etapa do processo e são drasticamente reduzidos durante a desodorização. Consequentemente, pesticidas são concentrados no destilado de desodorização (SLEETER, 1981).

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) tem sido tratado com grande interesse pelos analistas de alimentos devido às suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas (LARSSON et alii, 1987).

A presença de PAH em óleos vegetais tem sido reportada por vários autores. Diferentes rotas de contaminação tem sido sugeridas. Estas incluem:

- contaminação do solo onde é efetuado o plantio
- poluição atmosférica
- secagem direta de sementes oleaginosas com combustão de gases
- proveniente de solventes à base de petróleo utilizados na extração de óleos.

Um estudo do teor de PAH em óleos comestíveis e margarinas foi conduzido por LARSSON 1983, óleo de soja apresentou quantidades acima de 3,4µg BaP/Kg. Variações no teor de PAH em diferentes amostras de margarinas indicam que alguns lotes de óleo bruto apresentaram mais contaminação do que outros, ou que o processo de refino na indústria de óleos remove PAH com eficiência variável (LARSSON et alii, 1987).

2.2.6.2. Compostos metálicos

Estes compostos, principalmente cobre e ferro, podem ser incorporados à fração lipídica geralmente em quantidades bem pequenas e atuam como catalisadores da oxidação (KARLESKIND, 1992).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Matéria prima

Grãos de soja (*Glycine max*) e canola (*Brassica campestris*) e germe de milho (*Zea mays*) foram coletados junto à indústrias para posterior extração de óleo e refino em escala laboratorial.

Foram obtidos também de empresas refinadoras de óleos amostras de todas as etapas de refino.

As amostras de óleo foram estocadas em garrafas de vidro âmbar, mantidas sob atmosfera de nitrogênio em freezer até o momento da análise para minimizar prováveis alterações nas mesmas.

3.1.2 Reagentes e enzimas

Solventes orgânicos, obtidos de Hanke e Seidel, Bielefeld Alemanha, foram destilados antes do uso.

Reagentes analíticos e adsorventes para CCD foram obtidos de Merck, Darmstadt, Alemanha; Sigma Chemie, Munique, Alemanha; Fluka AG, Buchs, Suíça.

Colunas cromatográficas foram obtidas de Applied Science Laboratories, Inc., State College, Pennsylvania, USA.

Padrões de lipídios para análise em CCD, CG e CLAE foram obtidos da Nu-Check Prep. Inc. Elysian, Minnesota, USA; Applied Science Laboratories e da Sigma Chemie.

Lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme, 25U/g em interesterificação tipo batch), fornecida por Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca.

Lipase de *Candida cylindracea* (sin. *Candida rugosa*) tendo atividade de 850U/mg, fornecida por Sigma, Deisenhofen, Alemanha.

3.1.3 Substâncias radioativas

[4-¹⁴C]β-Sitosterol (56mCi/mmol) fornecido por Amersham, Braunschweig, Alemanha.

3.1.4. Equipamentos

Utilizou-se no desenvolver deste trabalho, além dos equipamentos normais existentes em laboratórios químicos, outros equipamentos e instrumentos tais como:

Cromatógrafo líquido de alta eficiência Merck Lichrography L-6200 “Gradient Pump”

Detector de índice de refração Knauer “Differential Refractometer”

Detector de UV-VIS Merck L-4250

Detector de fluorescência Merck-Hitachi F-1050 “Fluorescence Spectrophotometer”

Detector de massa “Evaporative Light Scattering Mass Detector” ACS modelo 750/14

Cromatógrafo a gás Varian e Carlo Erba Fractovap 2900 séries Capillary

Integrador Merck-Hitachi Chromato-Integrator D-2500 e Spectra-Physics SP4290

Extrator tipo expeller Komet

Laminador de grãos Hafer boy Universal 15

Radio-CCD “Scanner” Berthold Radio-CCD LB 2722-21

LSC “Liquid Scintillation Counter” LKB Rackbeta

3.2. Métodos

A caracterização da fração insaponificável de óleos constitui um problema analítico de grande importância que envolve metodologia bastante diversificada.

Atualmente numerosas técnicas estão disponíveis para separação e identificação de componentes lipídicos. A cromatografia gasosa tem sido empregada neste campo, bem como a cromatografia líquida, que são consideradas poderosas ferramentas na pesquisa e avaliação de importantes constituintes presentes em óleos vegetais.

Através da revisão bibliográfica e testes em laboratório foram selecionadas metodologias a serem empregadas na análise dos compostos de interesse, visando-se obter a melhor sensibilidade na resposta analítica.

3.2.1 Extração dos lipídios em escala piloto

a. Extração por solvente

As sementes foram laminadas e os lipídios extraídos em soxhlet com hexana por 16h. O solvente foi eliminado através de evaporador rotativo.

b. Extração por prensagem

A matéria prima foi colocada em extrator tipo expeller e o óleo foi obtido por prensagem. No caso da soja, esta foi laminada anteriormente.

3.2.2. Refino em planta piloto

Amostras de óleos obtidos em laboratório através de extração por solvente foram submetidas ao refino químico clássico em planta piloto de acordo com as etapas descritas a seguir:

a) Degomagem

O óleo bruto foi mantido por 20 minutos a 70°C sob agitação com adição de 2% de água. Posteriormente foi centrifugado a 4,5 G por 10 minutos e as gomas foram removidas.

b) Neutralização

O processo de neutralização foi conduzido empregando-se solução de NaOH 18°Bé, com 3% de excesso, segundo a fórmula:

$$\% \text{ tratamento} = \frac{(\text{fator} \times \% \text{AGL}) + \% \text{Excesso}}{\text{NaOH}/100}$$

O óleo foi mantido a 80°C sob vigorosa agitação por 10 minutos. Os sabões formados foram removidos por centrifugação a 10,5 G por 6 minutos. O óleo foi lavado com água quente até pH neutro. Logo após foi efetuada a etapa de secagem por 15 minutos a 90°C sob vácuo de 3 mbar.

c) Clarificação ou branqueamento

O óleo neutro, lavado e seco foi submetido ao processo de clarificação efetuado a 98°C sob vácuo de 30mbar com adição de 1% de argila clarificante Tonsil Supreme FF. O óleo foi resfriado sob vácuo até 50°C e filtrado para remoção da terra clarificante.

d) Desodorização

O último estágio do refino foi a desodorização conduzida por 1 hora à temperatura de 200-220°C sob vácuo de 10-20mbar com emprego de vapor. O óleo foi resfriado ainda sob vácuo.

Após cada etapa do refino, parte da amostra foi estocada em frasco âmbar com atmosfera de nitrogênio em freezer para análises posteriores.

3.2.3. Determinação de tocoferóis e tocotrienóis

A concentração de tocoferóis e tocotrienóis foi determinada através de análise da amostra injetada diretamente sem tratamento prévio em sistema de CLAE com coluna de Diol, segundo método descrito por BALZ et alii (1992).

a) Preparo da amostra

Amostras de óleo foram dissolvidas em hexana na concentração de 5 mg/mL em frascos protegidos com filme de alumínio e mantidos sob atmosfera de nitrogênio.

b) Solução padrão

Soluções de α -tocoferol nas concentrações de 0,5; 1,0; 5,0; e 10,0 μ g/mL em hexana, preparadas diariamente a partir de uma solução estoque contendo 1mg/mL de α -tocoferol em hexana.

Solução de tocoferóis α , β , γ e δ isômeros (Merck n° 15496) em hexana, preparada diariamente a partir de solução estoque contendo 1mg/mL de cada tocoferol em hexana. As soluções estoques permaneceram estáveis por 7 dias quando mantidas a 0-4°C.

c) Sistema cromatográfico

Empregou-se nesta determinação o seguinte sistema:

-Bomba (Merck Darmstadt, Germany, Lichrography L-6200 Gradient pump), com injetor de 20 μ L (Rheodyne, Berkeley, CA, USA A, tipo 7125) acoplado a um detector de fluorescência (Merck-Hitachi, F-1050 Fluorescence Spectrophotometer) ajustado a 295nm de excitação e 330nm de emissão; e integrador (Merck-Hitachi, Chromato-Integrator D-2500)

-Coluna de aço inox, de 25cm de comprimento e 4mm de diâmetro interno, com LiChrospher 100 diol, tamanho de partícula 5 μ m (Merck n° 50836), conectada a uma pré-coluna de aço inox com 4mm X 4mm LiChrospher 100 diol (Merck n° 50960) com tamanho de partícula de 5 μ m.

-Fase móvel: n-hexana/tercbutilmetileter (TBME) (92:8) para a análise dos óleos de canola e soja e (94:6) para análise do óleo de milho. Todos os solventes foram degaseificados através de banho de ultra-som e vácuo em intervalos de 4-5h de trabalho.

-Vazão de fase móvel de 1,3mL/min

d) Identificação e quantificação

Tocoferóis foram identificados através da comparação de tempo de retenção dos picos da amostra com o de padrões injetados nas mesmas condições.

A quantificação foi feita pelo método de padrão externo, através da relação da área dos picos versus a concentração de α -tocoferol obtida nas mesmas condições através da curva analítica.

3.2.4. Determinação da composição em ácidos graxos - incluindo *trans* isômeros

a) Preparo dos ácidos graxos livres

Ácidos graxos livres foram preparados segundo KATES (1982). Cerca de 15 a 30mg de lipídios foram pesados em tubo de ensaio com tampa rosqueável, 2,5mL de etanol e 0,2mL de KOH 33% aquoso foram adicionados. O tubo foi transferido para um banho a 80-90°C por 1,5h.

A solução foi resfriada, adicionou-se 2,5mL de água destilada e 0,5mL de HCl concentrado.

Extraiu-se os ácidos graxos de 3 a 5 vezes com 5mL de hexana. O extrato hexânico foi lavado com água destilada até pH neutro.

b) Preparo de ésteres metílicos dos ácidos graxos por derivatização

Os ácidos graxos livres foram convertidos em ésteres metílicos pelo tratamento de 15-30mg de ácidos graxos dissolvidos em 2 a 3 gotas de metanol, com adição de pequena quantidade de diazometano sob banho de gelo por 30 minutos.

Posteriormente esta solução foi evaporada e os ésteres metílicos diluídos em hexana para 1%, sendo então analisados em CG capilar.

c) Fracionamento dos ésteres metílicos dos ácidos graxos através de CG capilar

Ésteres metílicos dos ácidos graxos foram analisados por CG capilar usando-se um cromatógrafo a gás Varian equipado com detector de ionização em chama e coluna Sato-10 de 50m X 0,32mm de diâmetro interno, com espessura de filme de 0,25 μ m, split de 1:100 e programação de temperatura de 100°C, com

gradiente de 1,5°C por minuto até 220°C. Injetor a 200°C e detector a 240°C. Helio (15psi) foi usado como gás de arraste.

Os componentes foram identificados por comparação com o tempo de retenção de padrões de ésteres metílicos, a quantificação feita por normalização das áreas calculadas por meio de integrador (Merck-Hitachi, Chromato-Integrator D-2500).

3.2.5. Determinação de esteróis

Esteróis foram determinados pelo método descrito por ARENS et alii (1990) com as alterações propostas neste trabalho, descritas na Tabela 5.

Tabela 5- Esquema geral e condições analíticas utilizadas para identificação de esteróis.

Esquema geral	Método ARENS et alii (1990)	Método modificado
1- Preparo da matéria insaponificável	250mg de óleo 5mL KOH etanólica 0,5N 1mL padrão interno Betulina (1mg/mL) 15min de refluxo	100 mg de óleo 3mL KOH etanólica 0,5N 1mL padrão interno Betulina (1mg/mL) 15 min de refluxo extração com 3x5mL éter etílico
2- Fracionamento da matéria insaponificável	Cromatografia líquida coluna de óxido de alumínio eluente éter etílico	CCD preparativa sílica gel 60, 0,3mm espessura eluente hexana/éter etílico (1:1) revelação spray de metanol
3- Recuperação dos esteróis	Coleta da fração de esteróis evaporação do éter sob nitrogênio	Remoção da faixa de esteróis da sílica e extração com 3ml de éter etílico evaporação do solvente sob nitrogênio
4- Derivatização	Silanização com 100µL de BSTFA:metilimidazol 15min a 100°C	Silanização com 100µL de BSTFA:metilimidazol 10min a 110°C
5- CG análise		
coluna	OV-1701, 30m 0,25µm	Ultra 8 25m, 0,25µm
injetor, detector	300°C	300°C
programação de temperatura	240 a 260°C a 4°C/min	260°C 35min 15°C/min a 285°C 10min

Para esta análise foi utilizado um cromatógrafo Carlo Erba Fractovap 2900 séries Capillary, equipado com detector de FID, e integrador Spectra-Physics

SP4290. A identificação dos esteróis foi feita através de padrões e tempo de retenção relativo. A quantificação através do padrão interno (Betulina 1mg/mL).

3.2.6. Determinação de esteróis esterificados

Para a separação da fração de esteróis esterificados, foram testadas várias fases móveis com diferentes polaridades para efetuar a separação destes componentes através da coluna cromatográfica. Após vários testes a separação da fração de esteróis esterificados foi efetuada da seguinte maneira:

Amostras de óleo foram dissolvidas em éter de petróleo; esta solução foi passada através de uma coluna com sílica gel, e a fração de esteróis esterificados foi eluída com éter de petróleo/diclorometano (8,5:1,5). O solvente foi evaporado e o resíduo transferido para uma mini coluna, onde uma segunda purificação foi efetuada. O solvente foi evaporado e o resíduo redissolvido em exatos 500µL de diclorometano. Esta fração de esteróis esterificados então foi analisada por CLAE utilizando-se detector de massa.

a) Material e reagentes

- Coluna de vidro de 10 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento com um reservatório de 25mL no topo, sem torneira; frasco de 2 mL, 5 mL e 10 mL.

- Sílica gel 60, 170-230 mesh (Merck nº7734), ativada por 4 h a 160°C em estufa e resfriada em dessecador a temperatura ambiente. Ajustar o teor de água para 5%, agitar vigorosamente por cerca de 30 min, deixar em repouso por pelo menos uma noite antes do uso em frasco tampado.

- Algodão desengordurado por extração com éter de petróleo em um aparelho soxhlet por 8 horas.

- Éter de petróleo 40-60°C p.a. destilado sob suspensão de sódio.

- Diclorometano p.a.

- Acetonitrila, metanol e diclorometano para CLAE.

b) Solução padrão

β -sitosteril oleato foi preparado através de reação de esterificação de β -sitosterol e ácido oleico. 100mg de β -sitosterol (Merck art 3741) foi seco por 30min sob vácuo a 60°C. Adicionou-se 5ml de diclorometano seco sob peneira molecular (4Å), 50mg de 4-dimetil amino piridina (Aldrich) como catalisador da reação e 60mg de oleoyl chloride (Nu-Chek). Esta solução foi mantida sob atmosfera de nitrogênio em tubo fechado com agitação magnética a temperatura ambiente por uma noite.

Verificou-se através de CCD, utilizando-se hexana/éter etílico (85:15) como fase móvel, se a reação foi completa.

A purificação do esteróis esterificados produzidos foi feita da seguinte maneira.

A mistura foi concentrada até a secura, redissolvendo-a em 4-5mL de hexana a 40-50°C. A solução foi resfriada e transferida para uma coluna de 20cm de comprimento por 1cm de diâmetro interno, contendo sílica gel 60 (Merck art 7734) e 2cm de óxido de alumínio neutro (Merck art 1077) no topo.

Depois foi feita a eluição com 10mL de hexana, 20 mL de hexana/éter etílico (95:5), descartando-se estas duas frações e, finalmente, com 50mL de hexana/éter etílico (9:1). O solvente foi evaporado e o esterol esterificado recolhido.

Soluções nas concentrações de 1, 2, 3, 5 e 10mg/mg de β -sitosteril oleato foram preparadas.

c) Preparo da amostra

Para a separação da fração de esteróis esterificados, as amostras de óleo, 500 mg, foram devidamente pesadas em tubo de ensaio com tampa e então dissolvidas em 2 mL de éter de petróleo. Esta solução foi transferida para uma coluna com 5g de sílica gel com 5% de umidade. O tubo de ensaio foi lavado 2 vezes com o mesmo solvente, eluiu-se uma primeira fração foi eluída com 20mL

de éter de petróleo e uma segunda fração com 15mL de éter de petróleo/diclorometano (8,5:1,5), estas duas frações foram descartadas e uma terceira fração com 20mL de éter de petróleo/diclorometano (8,5:1,5) foi então eluída para um frasco. O solvente foi evaporado até a secura em evaporador rotativo e o remanescente foi transferido para uma mini coluna em pipeta Pasteur com 0,6g de sílica gel onde uma segunda purificação foi efetuada utilizando-se 10mL da mistura éter de petróleo/diclorometano (8,5:1,5) visando-se eliminar provável contaminação com triacilgliceróis. O solvente foi evaporado e o resíduo dissolvido em exatos 500µL de diclorometano. Esta fração de esteróis esterificados foi analisada em GPC utilizando-se detector de massa.

d) Sistema cromatográfico.

Para esta determinação foram testadas diferentes fases móveis e dois tipos de detectores. Melhores resultados foram obtidos empregando-se o sistema descrito a seguir:

- Bomba para CLAE (Merck, Lichrograph L-6200, com injetor de 20µL (Rheodyne, tipo 7125); acoplada ao detector de massa (Evaporative Light Scattering Mass Detector) ACS modelo 750/14 e integrador Merck D-2500.

- 2 colunas RP-18 de 125X4 mm , com 5µm de tamanho de partícula, recheadas com Lichrospher 100 RP-18 Merck n° 50943 com correspondentes partes e conexões.

- Fase móvel acetonitrila/metanol/diclorometano (1:1:1), com vazão de 1 mL/min. A mistura de solventes foi degaseificada por imersão do frasco em banho ultra-sônico, sob vácuo de trompa d'água.

e) Cálculo dos resultados

As áreas de todos os picos foram somadas e o total foi calculado pelo uso de β -sitosteril oleato como padrão externo. Todos os resultados foram expressos em mg/100g de amostra.

f) Determinação da composição em ácidos graxos da fração de esteróis esterificados

Ácidos graxos presentes na fração de esteróis esterificados foram analisados através de CG após conversão dos ácidos graxos em ésteres metílicos por transesterificação com metóxido de sódio.

Uma alíquota da fração de esteróis esterificados, contendo 0,5mg de material, foi evaporada até a secura em corrente de nitrogênio, adicionou-se 500µL de éter de petróleo e 20µL de solução de NaOCH₃, após 2 horas de reação a temperatura ambiente um pouco de CaCl₂ foi adicionado, centrifugou-se a solução, e os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram analisados em cromatografo Varian, modelo 3700, com coluna DB-23 de 25m x 0,25mm, com espessura de filme de 0,25µm, com split de 1:15. Hidrogênio (0,35 Bar) foi usado como gás de arraste, e temperatura da coluna foi de 150°C 5°C/min até 230°C. Injetor a 280°C e detector a 250°C.

Os picos foram identificados por comparação com tempo de retenção de padrões e a área dos picos foi calculada por meio do integrador Merck Hitachi D-2500 Chromato-Integrator.

g) Determinação da composição em esteróis da fração de esteróis esterificados

Para se determinar a composição em esteróis da fração de esteróis esterificados, foi evaporado o solvente da solução preparada para a determinação da composição em ácidos graxos. Foi adicionado diclorometano, a solução foi agitada e centrifugada. O diclorometano foi transferido com pipeta Pasteur para outro frasco, onde este foi evaporado sob corrente de nitrogênio. Foram adicionados 100µL da mistura de MSHFBA 1mL + 50µL de metilimidazol. A mistura foi aquecida a 110°C por 10min e os esteróis foram analisados em CG utilizando-se as mesmas condições para a determinação de esteróis totais, como descrito no item 3.2.4.

3.2.7. Determinação de esteroldienos

Esteroldienos foram determinados pelo método descrito por SCHULTE (1994), onde as amostras foram dissolvidas em éter de petróleo e esta solução foi passada através de uma coluna com sílica gel, os compostos polares foram eluídos com éter de petróleo. Esta fração então concentrada foi analisada em CLAE de fase reversa utilizando-se detector de UV a 235 nm.

a) Material e reagentes

- Coluna de vidro de 10 mm de diâmetro interno e 150 mm de comprimento com um reservatório de 25ml no topo, sem torneira; frasco de 2 mL, 5 mL e 10 mL.

- Sílica gel 60, 170-230 mesh (Merck nº7734), ativada por 4 h a 160°C em estufa e resfriada em dessecador a temperatura ambiente. Ajustar o teor de água para 5%, agitar vigorosamente por cerca de 30 min., e deixar em repouso por uma noite pelo menos antes do uso em frasco tampado.

- Algodão desengordurado por extração com éter de petróleo em um aparelho soxhlet por 8 horas.

- Éter de petróleo 40-60°C p.a. destilado sob suspensão de sódio.

- Acetonitrila para UV.

- Tercbutilmetil éter (TBME) para CLAE.

b) Solução padrão

Colestadieno, 5 mg, foi dissolvido em 5 mL de TBME, 100µL desta solução estoque foram diluídos 1:100 com acetonitrila/TBME (1:1).

c) Sistema cromatográfico.

- Bomba para CLAE (Merck, Lichrograph L-6200, com injetor de 10µL (Rheodyne, tipo 7125); acoplada a detector UV-vis Merck L-4250 ajustado a 235 nm e integrador Merck D-2500.

- Coluna RP-18 de 250X4 mm com precoluna RP-18 de 4X4 mm, com 5µm de tamanho de partícula, recheadas com Lichrospher 100 RP-18, Merck nº50838 e 50962 com correspondentes partes e conexões.

- Fase móvel acetonitrila/TBME (7:3), com vazão de 1 mL/min. A mistura de solventes foi degaseificada por imersão do frasco em banho ultra-sônico sob vácuo de trompa d'água.

d) Preparo da amostra

Amostras de óleo, 500 mg, foram devidamente pesadas em tubo de ensaio com tampa e então dissolvidas em 2 mL de éter de petróleo. Esta solução foi transferida para a coluna de sílica gel. O tubo de ensaio foi lavado 2 vezes com o mesmo solvente, as substâncias polares foram então eluídas com 20mL de éter de petróleo para um frasco. O solvente foi evaporado em evaporador rotativo e o remanescente foi transferido para um frasco de 2mL utilizando-se 2 vezes 0,5mL de éter de petróleo. O solvente foi removido com corrente de nitrogênio e o resíduo foi dissolvido em 500µL de acetonitrila/TBME (1:1). Um volume de 10µL foi usado para análise em CLAE.

e) Cálculo dos resultados

As áreas de todos os picos na faixa do esteroldienos foram somadas e o total foi calculado pelo uso de colestadieno como padrão externo. Todos os resultados foram expressos em mg/kg (ppm). A pureza do padrão de colestadieno foi determinada por CG utilizando-se colestano como padrão.

3.2.8. Determinação de triacilgliceróis poliméricos

Triacilgliceróis poliméricos foram determinados através de cromatografia de permeação em gel (GPC) segundo o método descrito por BELJAARS et alii (1994), empregando-se diclorometano como fase móvel, e quantificados através de detector de índice de refração.

a) Preparo da amostra

As amostras foram bem homogeneizadas, solução contendo 50mg/mL de óleo em diclorometano foram preparadas para análise em GPC.

b) Sistema cromatográfico

-Bomba para CLAE (Merck hitachi I-6200 Intelligent Pump), com injetor de 10µL (Rheodyne tipo 7125); acoplado com detector de índice de refração (Knauer Differential Refractometer) estabilizado a 20°C, e integrador (Merck Hitachi D-2000 Chromato-Integrator

-Coluna Phenogel 5 100Å, 300 X 7,8mm (n° 10420 Phenomenex)

-Eluente diclorometano, com vazão de 0,5mL/min mantido a 20°C e degaseificado através de ultra-som e vácuo.

c) Identificação e quantificação

A identificação foi feita através da comparação do tempo de retenção de padrões e a quantificação através de normalização de áreas.

3.2.9. Determinação de cobre e ferro

O teor de metais cobre e ferro presentes nas amostras foram determinados através de espectrofotometria de absorção atômica pelo método Ca 15-75 da AOCS (1995).

3.2.10. Determinação do teor de clorofila

O teor de clorofila das amostras foi determinado pelo método Cc 13d-55 oficial da AOCS (1995).

3.2.11. Reações de interesterificação

a) Interesterificação química

Óleo refinado (10g) e 15mg de metóxido de sódio foram colocados num balão de fundo redondo e a mistura foi mantida sob agitação magnética a 110°C por 30min sob vácuo gerado por uma trompa d'água. Os produtos da reação

foram resfriados à temperatura ambiente, dissolvidos em hexana e lavados repetidas vezes com solução de cloreto de sódio 1%, para remover completamente os sabões formados. A solução do produto da esterificação foi seca sob sulfato de sódio e estocada em refrigerador sob atmosfera de nitrogênio.

De maneira similar óleo refinado (1g) foi esterificado em presença de 2 μ Ci [4-¹⁴C] β -sitosterol (atividade específica de 56mCi/mmol) e 20mg de β -sitosterol usando 1,5mg de metóxido de sódio como catalisador, e os produtos da reação foram preparados como descrito anteriormente.

b) Interesterificação enzimática

Óleo refinado (10g) e 500mg de Lipozyme foram pesados dentro de um balão de fundo redondo e a mistura mantida sob agitação magnética a 40°C por 2, 4 e 24 horas. Os produtos da reação foram dissolvidos em hexana e a enzima separada por centrifugação.

De maneira similar óleo refinado (1g) foi esterificado na presença de 2 μ Ci [4-¹⁴C] β -sitosterol (atividade específica de 56mCi/mmol) e 20mg de β -sitosterol usando 100mg de cada enzima Lipozyme ou *Candida cylindracea* como catalisador, e os produtos da reação foram preparados como descrito no parágrafo acima.

3.2.12. Análise dos produtos de reação de interesterificação

a) Hidrólise com lipase pancreática

Os triacilgliceróis e suas espécies moleculares foram hidrolisados por tratamento com lipase pancreática (CHRISTIE, 1982). Os monoglicerídios resultantes foram isolados por CCD em placa de sílica gel H contendo 8% (p/p) de ácido bórico. Os cromatogramas foram desenvolvidos com hexana/éter etílico/ácido acético (50:50:1) (THOMAS et alii, 1965). Monoglicerídios foram eluídos com éter etílico saturado com água, transmetilados, e os ésteres metílicos analisados por CG.

b) Determinação de esteróis esterificados

Esteróis esterificados foram determinados depois da separação desta fração via breve purificação em mini coluna de sílica gel. O teor total de esteróis esterificados foi determinado através de análise em CLAE empregando-se coluna RP-18, acetonitrila/diclorometano/metanol (1:1:1, vol/vol/vol) 1mL/min como fase móvel para eluição e detector de massa para quantificação. O detector foi calibrado utilizando-se β -Sitosteril oleato como padrão.

c) Distribuição posicional dos ácidos graxos na molécula dos triacilgliceróis

Amostras de triacilgliceróis foram submetidos à hidrólise com lipase pancreática (Pancreatina Merck) e os sn-2-acilgliceróis formados foram isolados por cromatografia de placa (CHRISTIE, 1982). A composição dos ácidos graxos presentes nos triacilgliceróis e sn-2-acilgliceróis formados após lipólise foram determinados por tratamento com hidróxido de trimetil sulfônio (SCHULTE, 1993), os ésteres metílicos foram analisados em cromatógrafo a gás Varian modelo 3700 equipado com detector de ionização em chama. A separação foi efetuada utilizando-se coluna DB-23 de 25mx0,25mm, espessura do filme 0,25 μ m, a temperatura foi programada de 150 a 230°C 5°C/min utilizando-se H₂ a 3,5x10⁴Pa como gás de arraste. Outras condições foram injetor a 280°C, detector a 250°C e split de 1:15 no injetor.

d) Análise das substâncias radioativas

Os produtos formados por interesterificação em presença de [4-¹⁴C] β -Sitosterol radioativamente marcado foram fracionados por cromatografia de placa em sílica gel H utilizando-se hexana/éter etílico/ácido acético (85:15:1, vol/vol/vol) como solvente para o desenvolvimento. Os cromatogramas foram analisados por um "Scanner" Berthold Radio-CCD LB 2722-21 (Laboratorium Prof. Dr. Berthold GmbH & Co., Wildbad, Alemanha) para se determinar as proporções relativas da radioatividade nas frações de esteróis e esteróis esterificados. Alternativamente, a placa de cromatografia foi rapidamente exposta

a vapor de iodo para visualização das frações de lipídios. As frações de esteróis e esteróis esterificados foram raspadas e a radioatividade presente nas mesmas foi medida num LKB Rackbeta Liquid Scintillation Counter (Pharmacia, Freiburg, Alemanha), utilizando-se Aquasol 2 [Dupont de Nemours (Alemanha) GmbH, Bad Homburg, Alemanha] como coquetel cintilador.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos de sementes de soja, canola e de germe de milho foram extraídos, posteriormente refinados em laboratório, e alguns compostos minoritários foram determinados durante as diversas etapas do processo.

Da mesma forma amostras de cada etapa do refino dos óleos de milho, soja e canola foram coletadas em indústrias brasileiras, e alguns dos compostos minoritários destes óleos foram também determinados, visando-se conhecer de que forma estes compostos são afetados ao longo do processo de refino.

4.1. Composição de tocoferóis e tocotrienóis

A curva padrão de α tocoferol determinada nas mesmas condições que as amostras, pode ser vista na Figura 8.

Cromatogramas típicos da composição de tocoferóis e tocotrienóis presentes nas amostras de óleos de milho, soja e canola, determinados através de CLAE usando-se coluna diol podem ser vistos na Figura 9.

O perfil dos tocoferóis e tocotrienóis e as alterações ocorridas durante o processo de refino industrial do óleo de milho podem ser observados na Figura 10.

Na Tabela 6 pode-se observar a distribuição relativa dos tocoferóis e tocotrienóis em termos de porcentagem em todas as etapas do refino.

Observa-se uma perda total de 56,9% de tocoferóis e tocotrienóis, a qual ocorre principalmente após a desodorização, com perdas maiores de γ e β -tocoferol em relação aos demais.

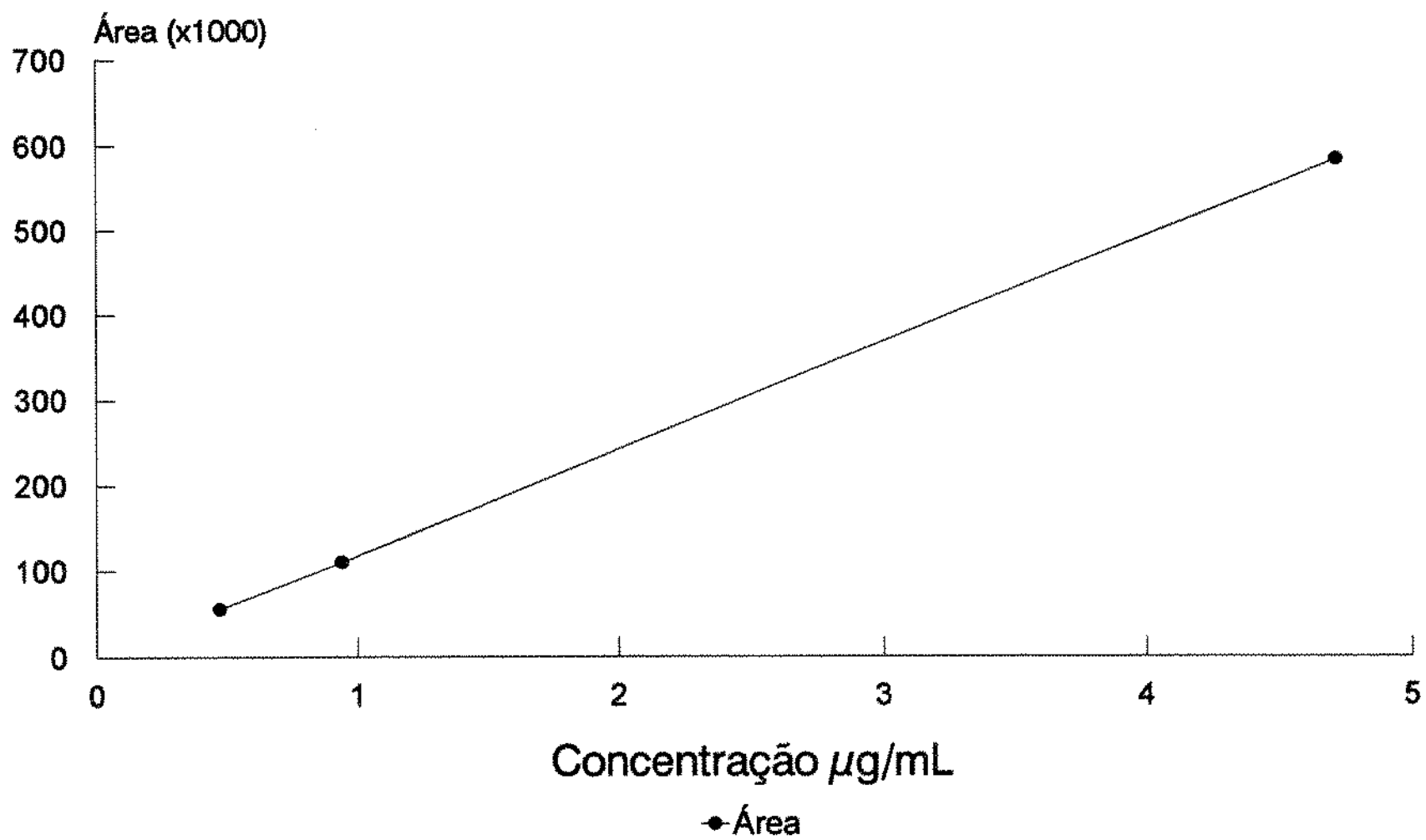


Figura 8. Curva padrão de α -tocoferol

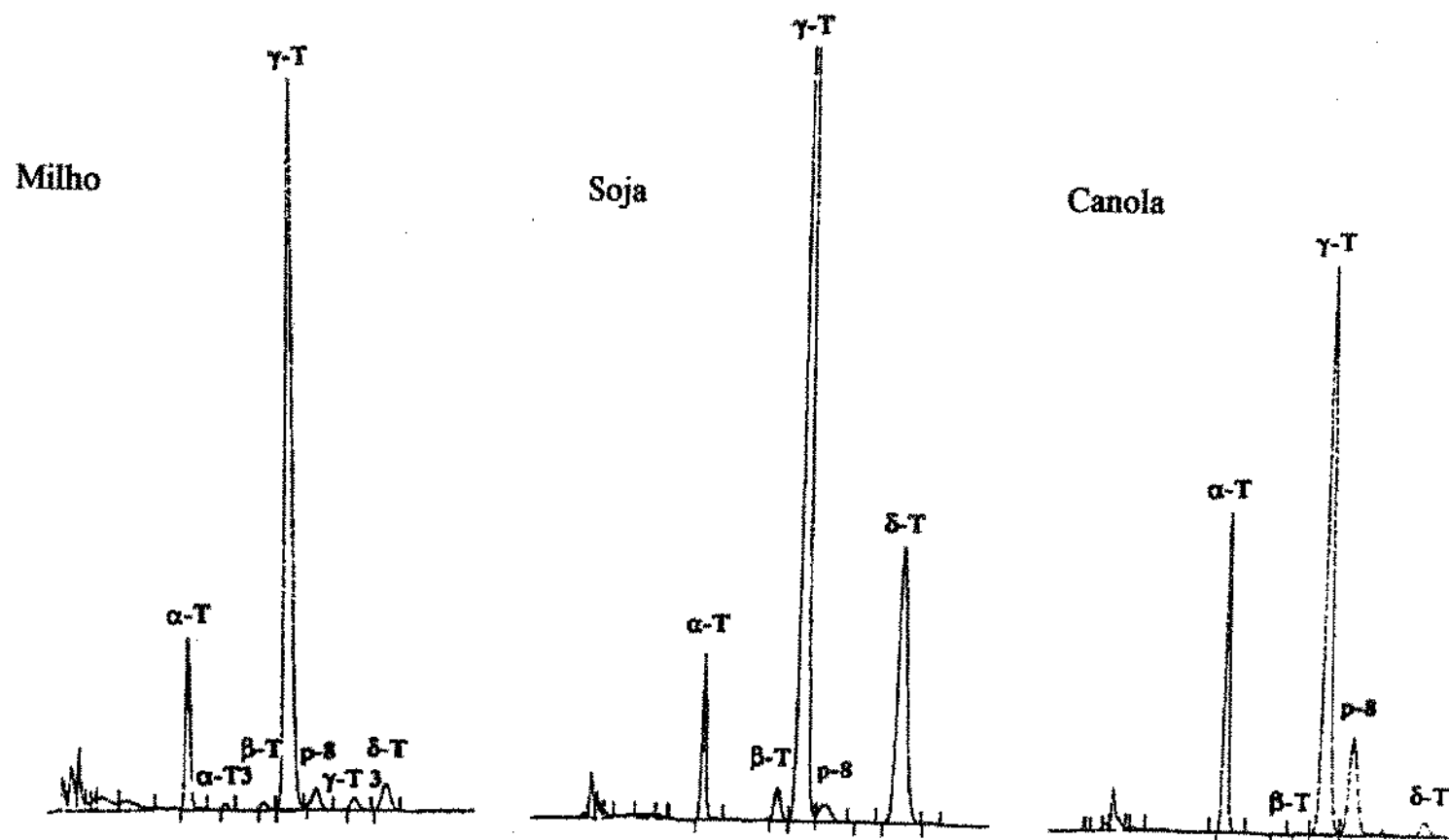


Figura 9. Cromatogramas típicos da composição de tocoferóis e tocotrienóis em amostras de óleos de milho, soja e canola conforme condições cromatográficas descritas no texto. Onde α -T é alfa tocoferol; α -T3 é alfa tocotrienol; β -T é beta tocoferol; γ -T é gama tocoferol; p-8 é plastocromanol 8; γ -T3 é gama tocotrienol e δ -T é delta tocoferol.

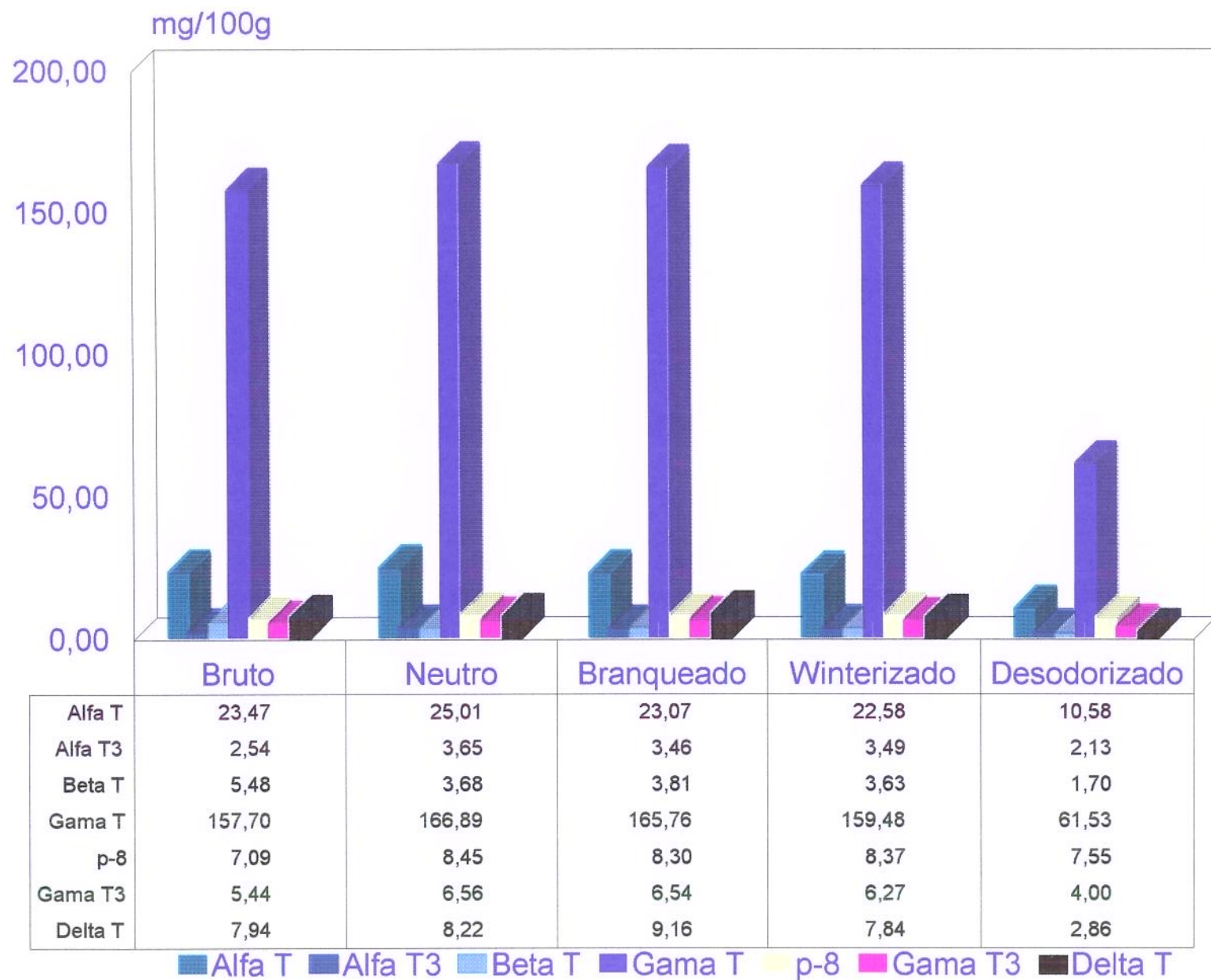


Figura 10. Perfil de tocoferóis e tocotrienóis durante o refino industrial de óleo de milho

Tabela 6- Distribuição relativa de tocoferóis e tocotrienóis, em termos de porcentagem, em todas as etapas do refino industrial de óleo de milho

Amostra	α -T	α -T3	β -T	γ -T	p-8	γ -T3	δ -T
Bruto	11,19	1,21	2,61	75,22	3,38	2,59	3,79
Neutro	11,24	1,64	1,65	75,02	3,80	2,95	3,69
Branqueado	10,48	1,57	1,73	75,31	3,77	2,97	4,16
Winterizado	10,67	1,65	1,71	75,35	3,95	2,96	3,70
Desodorizado	11,71	3,36	1,88	68,10	8,36	4,43	3,16

Na Tabela 7 pode ser observada a distribuição relativa dos teores de tocoferóis presentes no óleo de soja refinado em indústria. Na Figura 11 observa-se o perfil dos tocoferóis após cada etapa do refino industrial do óleo de soja. A composição relativa dos tocoferóis presentes no óleo de canola refinado em indústria estão relacionados na Tabela 8. No gráfico exibido na Figura 12 pode-se observar a variação dos tocoferóis individuais presentes no óleo de canola refinado em indústria após cada etapa do processo tecnológico de refino.

Tabela 7- Distribuição relativa de tocoferóis, em termos de porcentagem, em todas as etapas do refino industrial de óleo de soja.

Amostra	α -T	α -T3	β -T	γ -T	p-8	γ -T3	δ -T
Bruto	8,45	-	3,59	50,82	3,55	-	33,58
Degomado	7,19	-	2,67	63,63	1,36	-	25,14
Neutro	7,34	-	2,78	61,85	1,45	-	26,57
Branqueado	7,29	-	2,71	64,28	1,45	-	24,28
Desodorizado	7,41	-	2,45	63,60	2,56	-	23,98

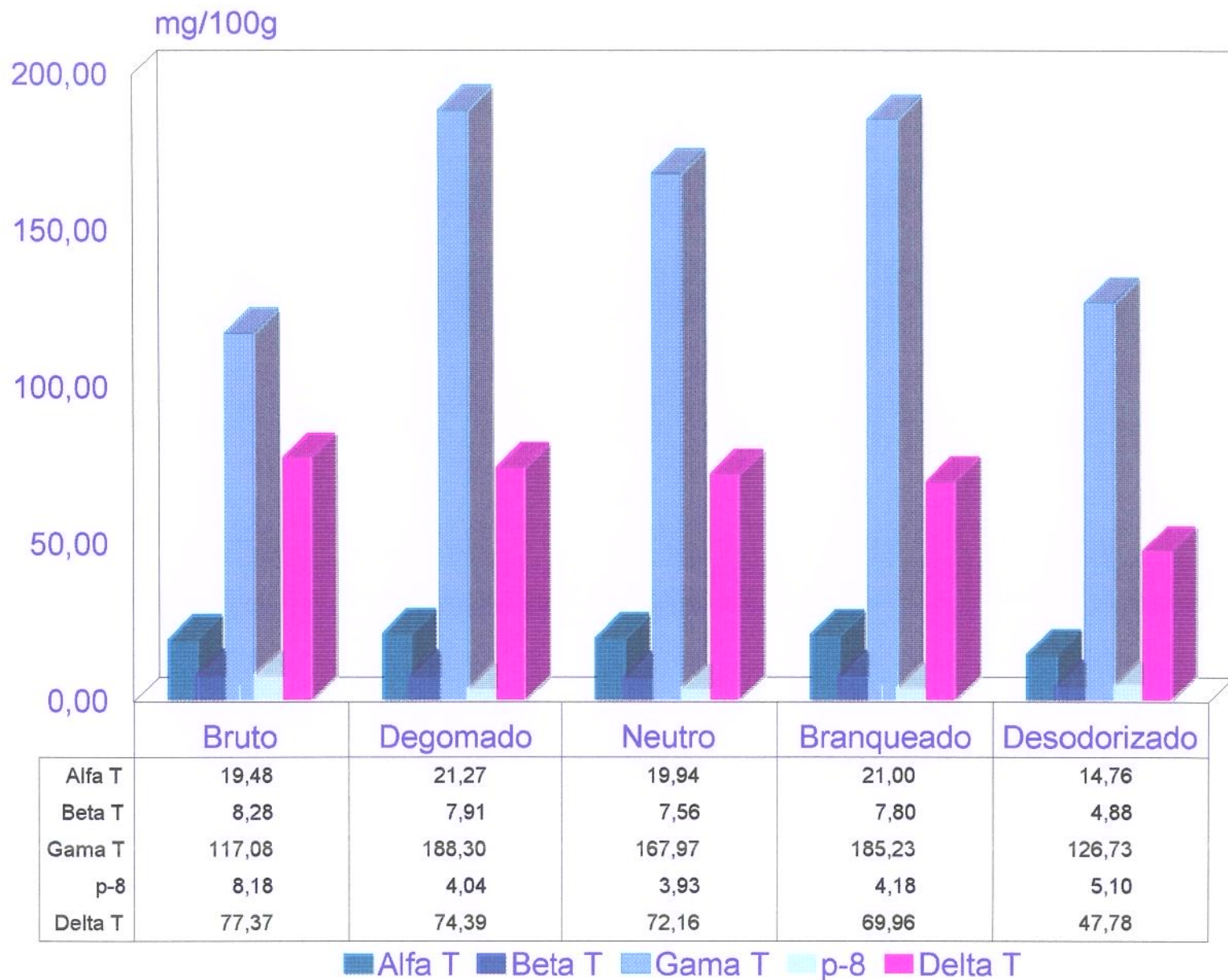


Figura 11. Perfil de tocoferóis e tocotrienóis durante o refino industrial de óleo de soja

Tabela 8- Distribuição relativa de tocoferóis, em termos de porcentagem, em todas as etapas do refino industrial de óleo de canola

Amostra	α -T	α -T3	β -T	γ -T	p-8	γ -T3	δ -T
Bruto solvente	22,60	-	1,06	55,52	17,65	-	3,17
Bruto prensa	22,90	-	-	62,49	11,70	-	3,19
Degomado	21,49	-	0,91	60,03	13,57	-	4,00
Neutro	21,67	-	0,86	57,09	17,67	-	2,70
Branqueado	20,54	-	1,27	60,64	13,32	-	4,22
Desodorizado	21,29	-	1,39	56,08	17,33	-	3,91

Os níveis de variação no teor de tocoferóis totais dos 3 diferentes tipos de óleo aqui analisados durante o processo de refino industrial podem ser verificados na Figura 13.

Pode-se constatar, no caso do refino de soja em indústria, que ocorre perda total de 13,52% de tocoferóis e no caso da canola esta perda ficou na casa de 36,16%. Com relação ao óleo de soja, observa-se uma redução dos tocoferóis com pouca perda de γ -tocoferol em relação aos demais. Já no caso da canola a perda foi proporcional para todos os tocoferóis.

Após o refino industrial os óleos de milho e canola apresentaram níveis próximos de teor de tocoferóis totais, enquanto que o óleo de soja apresentou um nível mais elevado, com praticamente o dobro do valor encontrado nos demais.

Nas Tabelas 9, 11 e 13 podem ser observados os teores de tocoferóis e tocotrienóis existentes nas amostras de óleos de milho, soja e canola procedentes de refino em laboratório, com os resultados expressos em termos de mg/100g de amostra. Já os teores relativos de cada tocoferol e tocotrienol podem ser observados nas Tabelas 10, 12 e 14 respectivamente para os óleos de milho, soja e canola.

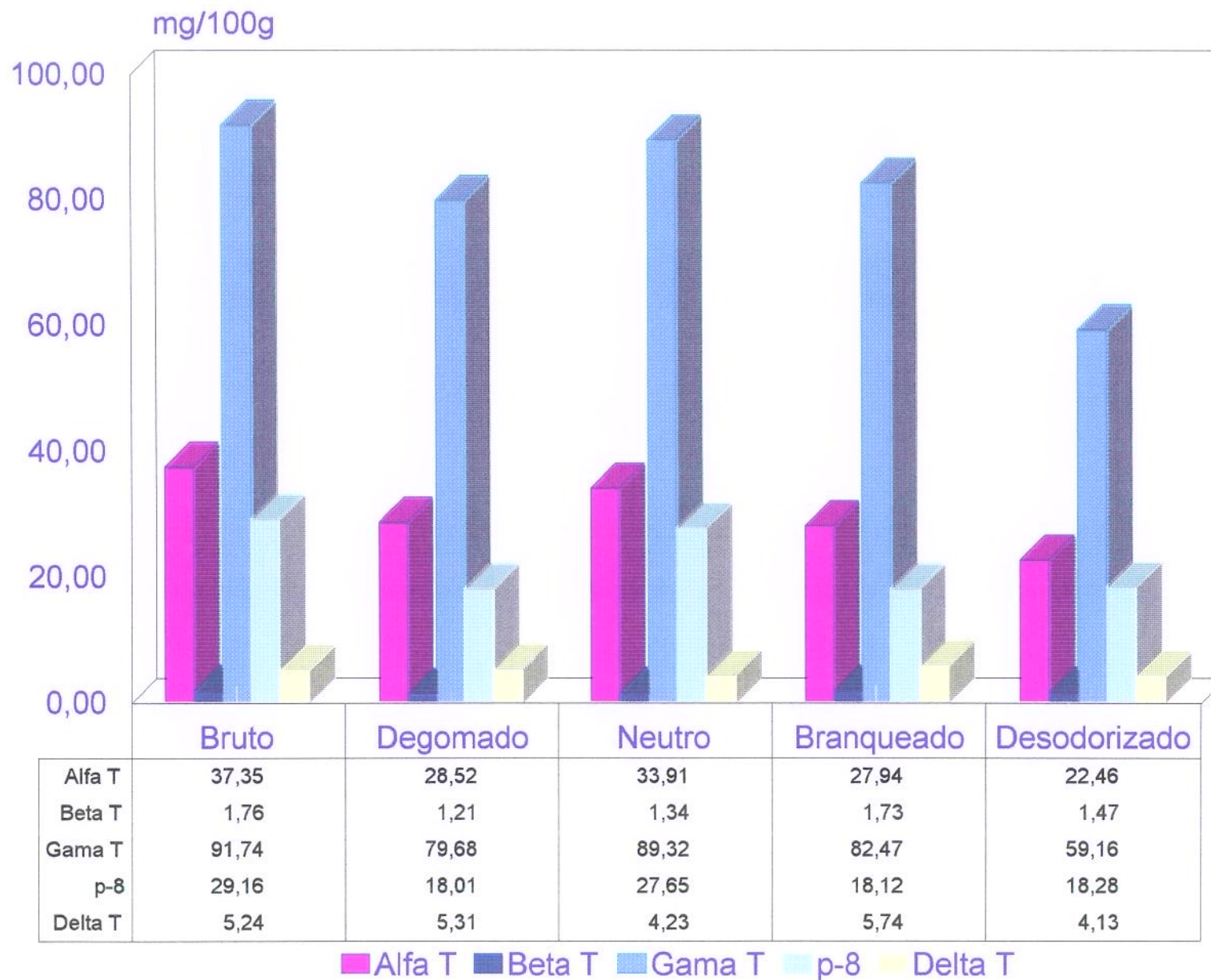


Figura 12. Perfil de tocoferóis e tocotrienóis durante o refino industrial de óleo de canola

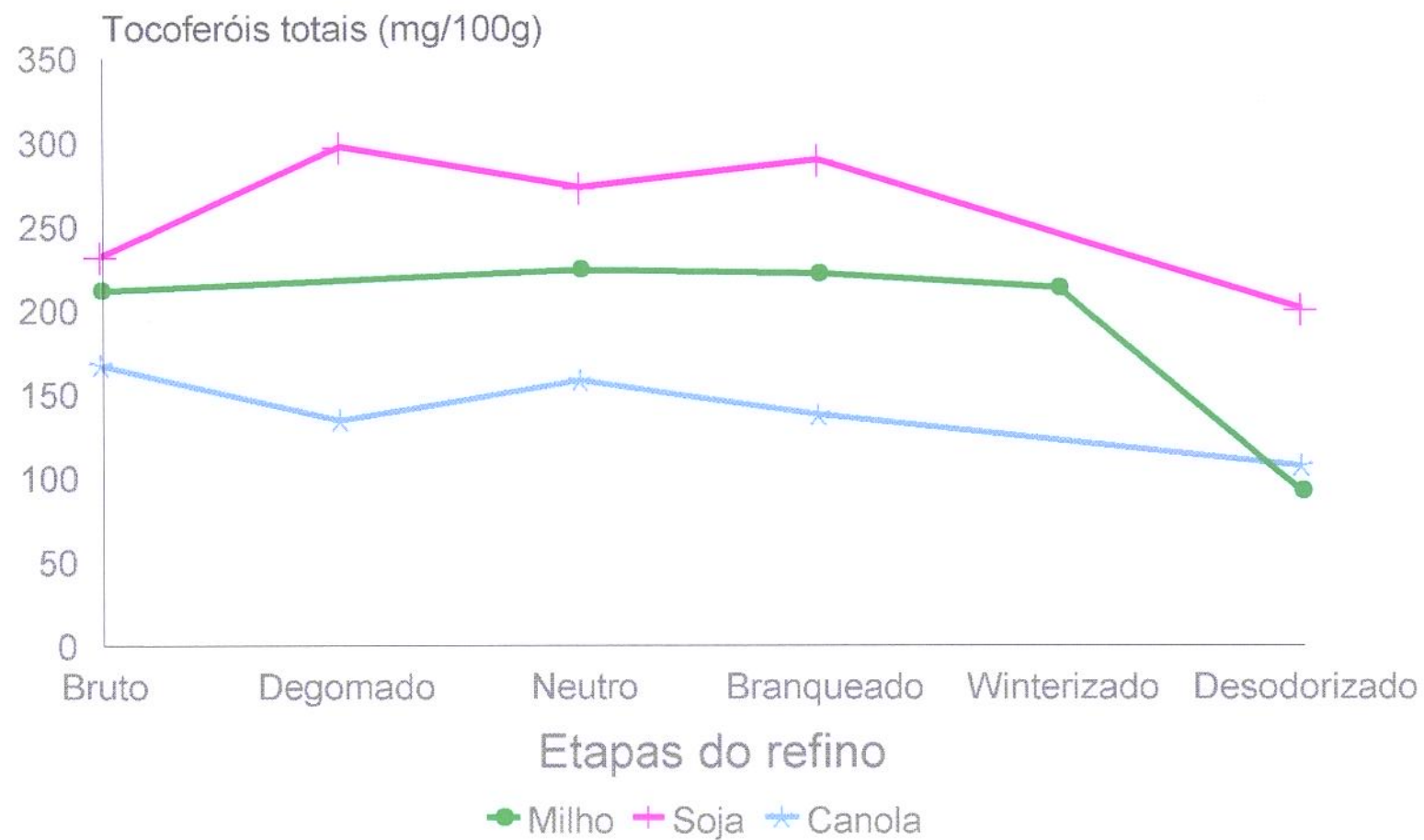


Figura 13. Níveis de variação no teor de tocoferóis totais dos óleos de milho, soja e canola durante o processo de refino industrial

No caso do refino em laboratório se observa perda de 10,12% dos tocoferóis e tocotrienóis do óleo de milho, 7,66% no caso da canola, com nenhuma perda em relação ao óleo de soja.

Tabela 9- Concentração de tocoferóis e tocotrienóis expressos em mg/100g de amostra de óleo de milho refinado em laboratório

Amostra	α -T	α -T3	β -T	γ -T	p-8	γ -T3	δ -T	Total
Bruto solvente	18,87	1,99	4,72	137,25	5,76	3,79	7,99	180,37
Bruto prensa	20,56	2,00	4,32	151,07	6,22	4,53	8,48	197,18
Degomado	25,36	3,81	4,42	181,11	8,11	6,06	10,96	239,73
Neutro	10,89	2,55	3,94	159,98	7,33	5,10	9,60	199,39
Branqueado	13,38	4,60	3,58	152,76	7,04	4,69	9,92	195,97
Desodorizado	20,20	2,24	2,82	118,74	6,44	4,31	7,37	162,12

Tabela 10- Distribuição relativa de tocoferóis e tocotrienóis, em termos de porcentagem, em todas as etapas do refino laboratorial de óleo de milho

Amostra	α -T	α -T3	β -T	γ -T	p-8	γ -T3	δ -T
Bruto solvente	10,46	1,10	2,62	76,09	3,19	2,10	4,43
Bruto prensa	10,43	1,01	2,19	76,61	3,15	2,30	4,30
Degomado	10,58	1,59	1,80	75,55	3,38	2,53	4,57
Neutro	5,46	1,28	1,98	80,23	3,68	2,56	4,81
Branqueado	6,83	2,35	1,83	77,95	3,59	2,39	5,06
Desodorizado	12,46	1,38	1,74	73,24	3,97	2,66	4,55

Tabela 11- Concentração de tocoferóis expressos em mg/100g de amostra de óleo de soja refinado em laboratório

Amostra	α -T	α -T3	β -T	γ -T	p-8	γ -T3	δ -T	Total
Bruto	11,85	-	5,28	116,81	4,90	-	61,63	200,47
Degomado	14,02	-	6,56	125,78	4,25	-	62,83	213,44
Neutro	13,57	-	6,53	122,22	3,81	-	62,98	209,11
Branqueado	14,91	-	7,39	133,79	4,38	-	65,80	226,27
Desodorizado	13,39	-	5,41	122,95	6,04	-	63,26	211,05

Tabela 12- Distribuição relativa de tocoferóis, em termos de porcentagem, em todas as etapas do refino laboratorial de óleo de soja

Amostra	α -T	α -T3	β -T	γ -T	p-8	γ -T3	δ -T
Bruto	5,91	-	2,63	58,27	2,44	-	30,74
Degomado	6,57	-	3,07	58,93	1,99	-	29,44
Neutro	6,49	-	3,12	58,45	1,82	-	30,12
Branqueado	6,59	-	3,27	59,13	1,94	-	29,08
Desodorizado	6,34	-	2,56	58,26	2,86	-	29,97

Tabela 13- Concentração de tocoferóis expressos em mg/100g de amostra de óleo de canola refinado em laboratório

Amostra	α -T	α -T3	β -T	γ -T	p-8	γ -T3	δ -T	Total
Bruto solvente	31,23	-	-	86,92	19,78	-	4,74	142,67
Bruto prensa	27,59	-	-	81,22	16,27	-	3,95	129,03
Degomado	29,98	-	1,09	82,22	17,59	-	4,11	134,99
Neutro	29,73	-	1,12	81,43	17,86	-	3,34	133,48
Branqueado	27,35	-	1,21	76,86	17,65	-	3,40	126,47
Desodorizado	29,44	-	1,44	78,49	18,49	-	3,88	131,74

Tabela 14- Distribuição relativa de tocoferóis, em termos de porcentagem, em todas as etapas do refino laboratorial de óleo de canola

Amostra	α -T	α -T3	β -T	γ -T	p-8	γ -T3	δ -T
Bruto solvente	21,89	-	-	60,92	13,86	-	3,32
Bruto prensa	21,38	-	-	62,95	12,61	-	3,06
Degomado	22,21	-	0,81	60,91	13,03	-	3,04
Neutro	22,27	-	0,84	61,00	13,38	-	2,50
Branqueado	21,63	-	0,96	60,77	13,96	-	2,69
Desodorizado	22,35	-	1,09	59,58	14,03	-	2,94

Óleo bruto de soja obtido em indústria apresentou o teor mais elevado de tocoferol total (230,39mg/100g), tendo o δ -tocoferol sido detectado em elevada concentração em óleo de soja. Óleo de canola apresentou um elevado teor de α -tocoferol. O γ -tocoferol aparece como principal componente dentre os tocoferóis, o qual constitui mais de 68% no óleo de milho, 50% no óleo de soja e 55% no óleo de canola.

O teor de tocoferol total diminui durante as diversas etapas do refino, mas a composição relativa é constante durante estas etapas no caso do refino em laboratório. Em geral foi observado maior perda de tocoferóis no processamento industrial que no de laboratório.

Existe uma relação entre a composição em ácidos graxos dos óleos e o tipo de tocoferol. Óleos ricos em ácidos graxos insaturados apresentam quantidades consideráveis de tocoferóis, os quais atuam como antioxidantes naturais. O γ -tocoferol é citado como melhor antioxidante que o α -tocoferol (PONGRACZ et alii, 1995).

O processamento tecnológico e a oxidação afetam os níveis de tocoferóis dos óleos. Desodorização foi o principal responsável pelo decréscimo no conteúdo de tocoferol durante o processamento.

Óleo de milho apresentou elevado teor de tocotrienóis, os quais não estão presentes nos óleos de soja e canola.

As técnicas de refino empregadas nas indústrias brasileiras, onde foram coletadas as amostras, não apresentaram grandes perdas nos teores de tocoferóis do ponto de vista de estabilidade oxidativa e valor nutricional.

O método de análise foi considerado relativamente rápido, devido a não necessidade de saponificação do óleo para subsequente determinação dos tocoferóis e tocotrienóis.

Tocóferóis são mais susceptíveis à oxidação que os outros componentes da matéria insaponificável.

A determinação dos níveis de tocoferóis pode auxiliar na detecção da presença de adulteração em óleos (GUTFINGER & LETAN, 1975).

Como foi mostrado, o conteúdo de tocoferóis decresce durante cada etapa do refino, e pode ser reduzido de forma marcante durante a desodorização, pois os tocoferóis são voláteis sob condições de operação. Por que os tocoferóis são poderosos antioxidantes naturais, deve-se otimizar as condições de processamento, para que estes componentes sejam retidos em sua forma ativa. O abuso da exposição do óleo ao ar e ao aquecimento reduz o conteúdo destes compostos através da oxidação e polimerização.

4.2. Teor de ácidos graxos - incluindo *trans* isômeros

Muitos isômeros geométricos e posicionais dos ácidos graxos insaturados podem ser formados durante a desodorização de óleos (WOLFF, 1992).

O teor de ácidos graxos - incluindo *trans* isômeros, obtidos através da análise em CG capilar dos ésteres metílicos dos ácidos graxos das amostras em coluna Sato-10, dos óleos de milho, soja e canola refinados em indústria são apresentados nas Tabelas 15, 16 e 17. Cromatogramas característicos das 3 diferentes tipos de amostras podem ser vistos nas Figuras 14, 15 e 16.

Os ácidos graxos polinsaturados são maioria nos óleos de milho e soja, e não no de canola, os monoinsaturados são os predominantes, prevalecendo o ácido oleico.

Ácidos graxos *trans* foram encontrados em todas as amostras em faixa de 0,1 a 4,8% do total dos ácidos graxos, com um acréscimo mais acentuado após a etapa de desodorização. Óleo de soja desodorizado apresentou o teor mais elevado de *trans* isômeros como pode ser observados na Figura 17.

No óleo de milho o maior grupo de isômeros presente foi o de C18:2 *trans*, enquanto que C18:3 *trans* foi o maior grupo tanto no óleo de soja quanto no de canola.

Tabela 15-Teor de ácidos graxos, incluindo *trans* isômeros, em cada etapa do refino de óleo de milho procedente de indústria

Ácido graxo	Composição (%)				
	Bruto	Neutro	Branqueado	Winterizado	Desodorizado
16:0	13,1	12,4	12,8	12,0	12,5
Σ 16:1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
18:0	2,1	2,2	2,3	2,3	2,3
Σ 18:1	34,1	34,6	35,5	34,9	34,8
Σ 18:2 <i>trans</i> *	0,1	0,1	0,1	0,1	1,2
18:2	47,9	47,9	46,5	47,8	46,4
20:0	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Σ 18:3 <i>trans</i> **	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,2
18:3	0,9	0,9	0,8	0,9	0,6
Σ 20:1	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5
22:0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
24:0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
outros	0,1	0,2	0,3	0,2	0,3
Σ <i>trans</i>	0,1	0,2	0,1	0,1	1,4

* Constituído principalmente de 18:2 Δ 9 *trans*, 12 *trans*, 18:2 Δ 9 *cis*, 12 *trans* e 18:2 Δ 9 *trans*, 12 *cis*

** Constituído principalmente de 18:3 Δ 6 *trans*, 9 *cis*, 12 *trans*, 18:3 Δ 6 *cis*, 9 *cis*, 12 *trans*, 18:3 Δ 6 *cis*, 9 *trans*, 12 *cis* e 18:3 Δ 6 *trans*, 9 *cis*, 12 *cis*

Tabela 16- Teor de ácidos graxos, incluindo *trans* isômeros, em cada etapa do refino de óleo de soja procedente de indústria

Ácido graxo	Composição (%)				
	Bruto	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
16:0	11,5	10,8	10,7	10,8	11,2
Σ 16:1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
17:0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
17:1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
18:0	3,3	3,5	3,6	3,5	3,5
Σ 18:1 <i>trans</i> *	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	0,1
Σ 18:1	24,2	24,7	25,0	24,8	24,9
Σ 18:2 <i>trans</i> **	0,1	0,1	0,1	0,6	2,0
18:2	52,6	52,5	52,2	52,2	50,2
20:0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Σ 18:3 <i>trans</i> ***	<0,1	<0,1	<0,1	0,1	2,7
18:3	6,4	6,3	6,5	6,2	3,5
Σ 20:1	0,4	0,5	0,5	0,4	0,4
22:0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
24:0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
outros	0,2	0,3	0,1	<0,1	0,2
Σ <i>trans</i>	0,1	0,2	0,2	0,7	4,8

* Constituído principalmente de 18:1 Δ 9 *trans*

** Constituído principalmente de 18:2 Δ 9 *trans*, 12 *trans*; 18:2 Δ 9 *cis*, 12 *trans* e 18:2 Δ 9 *trans*, 12 *cis*

*** Constituído principalmente de 18:3 Δ 6 *trans*, 9 *cis*, 12 *trans*; 18:3 Δ 6 *cis*, 9 *cis*, 12 *trans*; 18:3 Δ 6 *cis*, 9 *trans*, 12 *cis* e 18:3 Δ 6 *trans*, 9 *cis*, 12 *cis*

Tabela 17-Teor de ácidos graxos, incluindo *trans* isômeros, em cada etapa do refino de óleo de canola procedente de indústria

Ácido graxo	Composição (%)				
	Bruto	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
16:0	4,5	4,5	4,4	4,5	4,5
Σ 16:1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2
18:0	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4
Σ 18:1 <i>trans</i> *	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Σ 18:1	64,6	64,4	64,5	64,0	64,6
Σ 18:2 <i>trans</i> **	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	0,4
18:2	17,9	17,9	17,7	18,3	17,4
20:0	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7
Σ 18:3 <i>trans</i> ***	<0,1	0,1	<0,1	0,2	2,0
18:3	7,9	7,5	7,6	7,3	5,3
Σ 20:1	1,1	1,2	1,2	1,2	1,3
22:0	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4
22:1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
24:0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
24:1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
outros	<0,1	0,2	0,4	0,4	0,3
Σ <i>trans</i>	0,1	0,2	0,2	0,3	2,8

* Constituído principalmente de 18:1 Δ 9 *trans*

** Constituído principalmente de 18:2 Δ 9 *trans*, 12 *trans*; 18:2 Δ 9 *cis*, 12 *trans* e 18:2 Δ 9 *trans*, 12 *cis*

*** Constituído principalmente de 18:3 Δ 6 *trans*, 9 *cis*, 12 *trans*; 18:3 Δ 6 *cis*, 9 *cis*, 12 *trans*; 18:3 Δ 6 *cis*, 9 *trans*, 12 *cis* e 18:3 Δ 6 *trans*, 9 *cis*, 12 *cis*

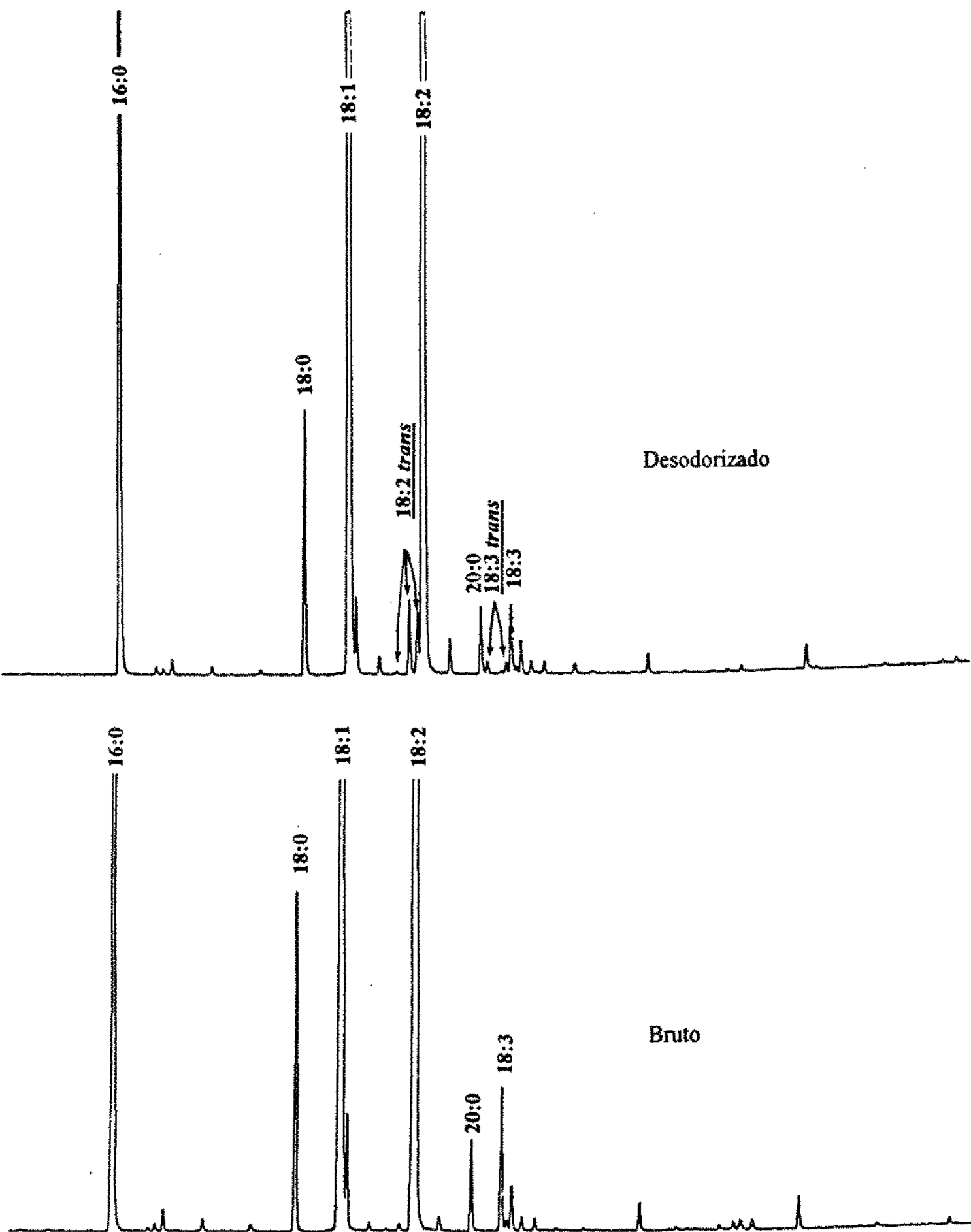


Figura 14. Cromatograma (CG) da composição em ácidos graxos incluindo trans isômeros do óleo de milho bruto e desodorizado. Condições cromatográficas no texto.

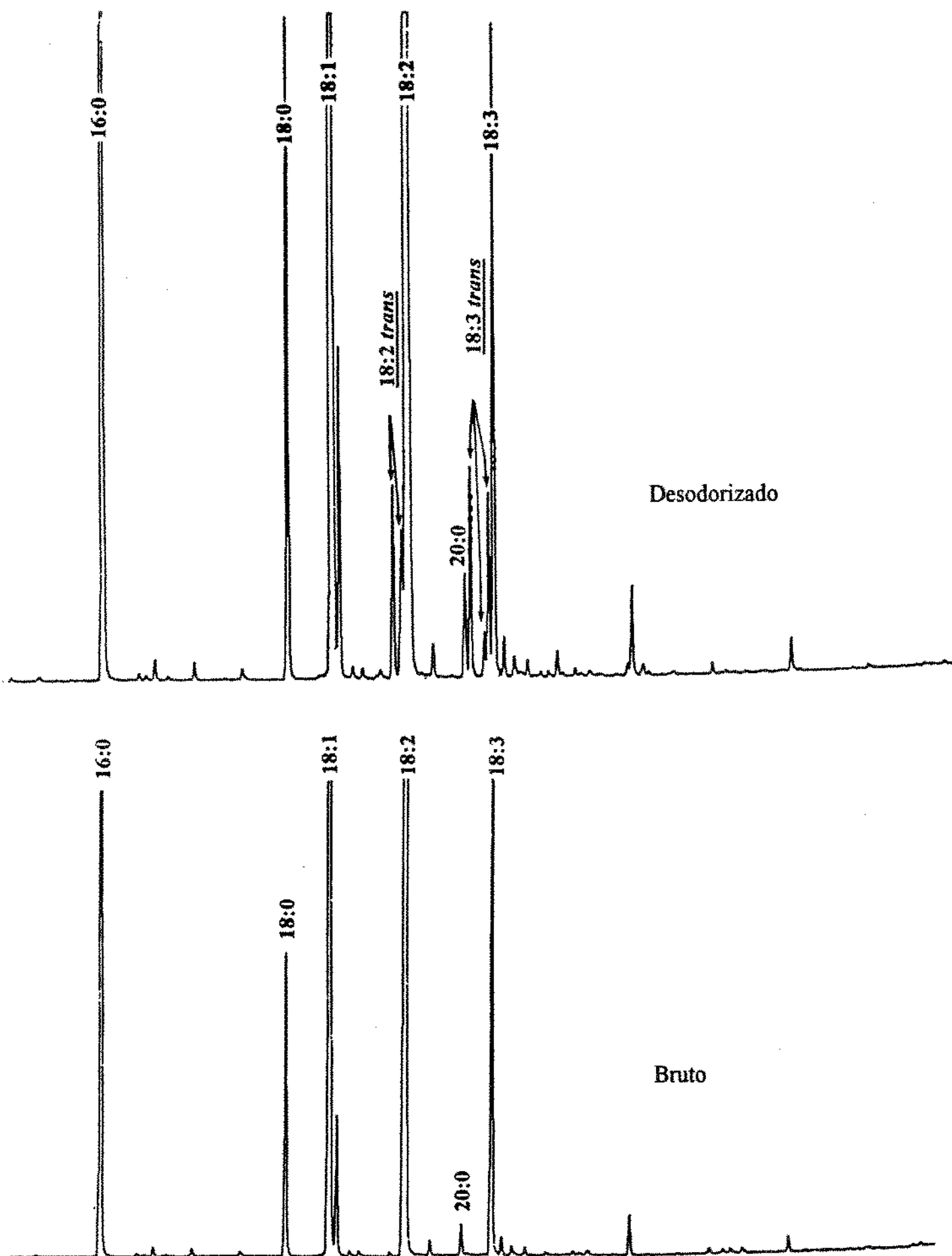


Figura 15. Cromatograma (CG) da composição em ácidos graxos incluindo trans isômeros

do óleo de soja bruto e desodorizado. Condições cromatográficas no texto.

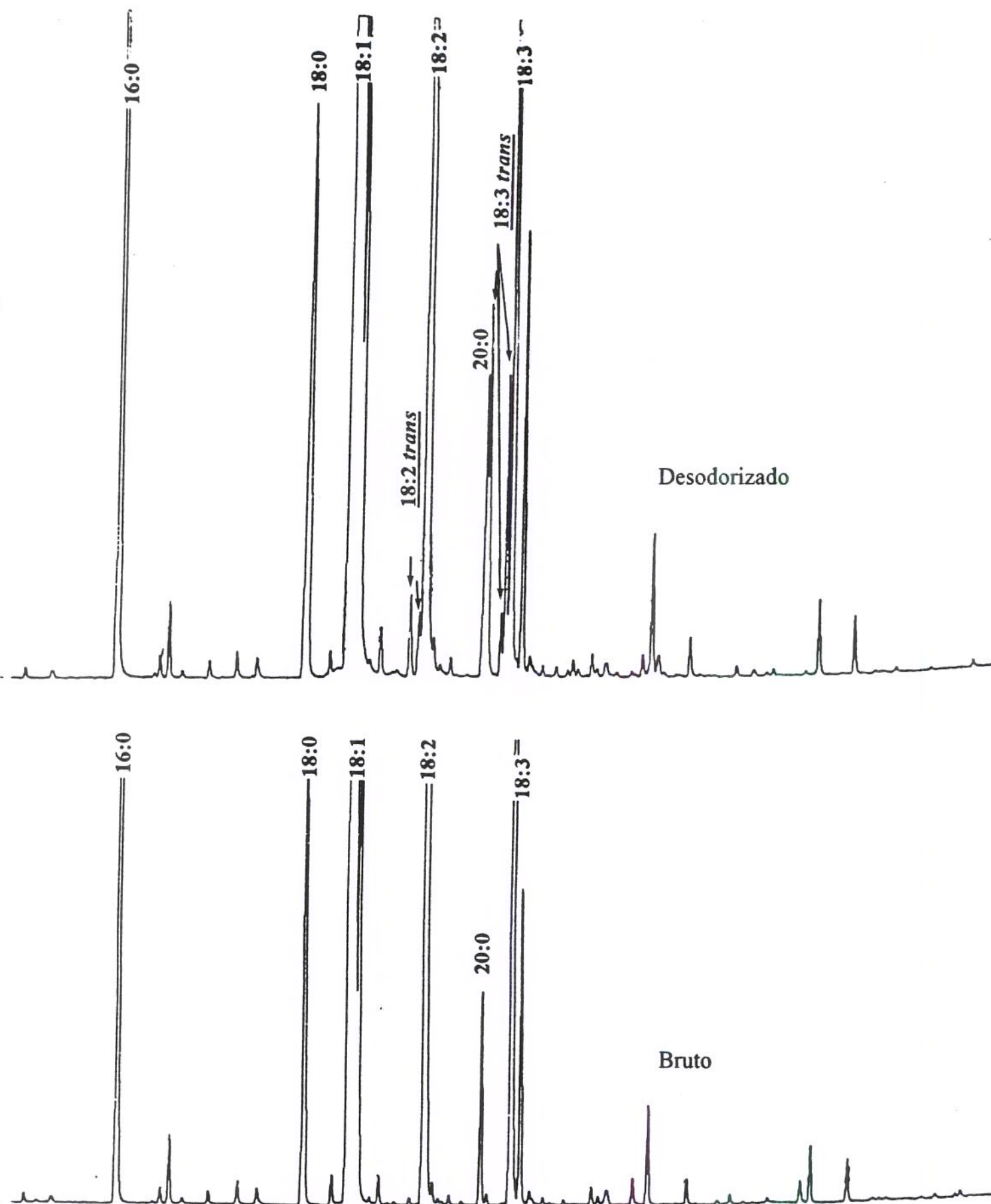


Figura 16. Cromatograma (CG) da composição em ácidos graxos incluindo trans isômeros do óleo de canola bruto e desodorizado. Condições cromatográficas no texto.

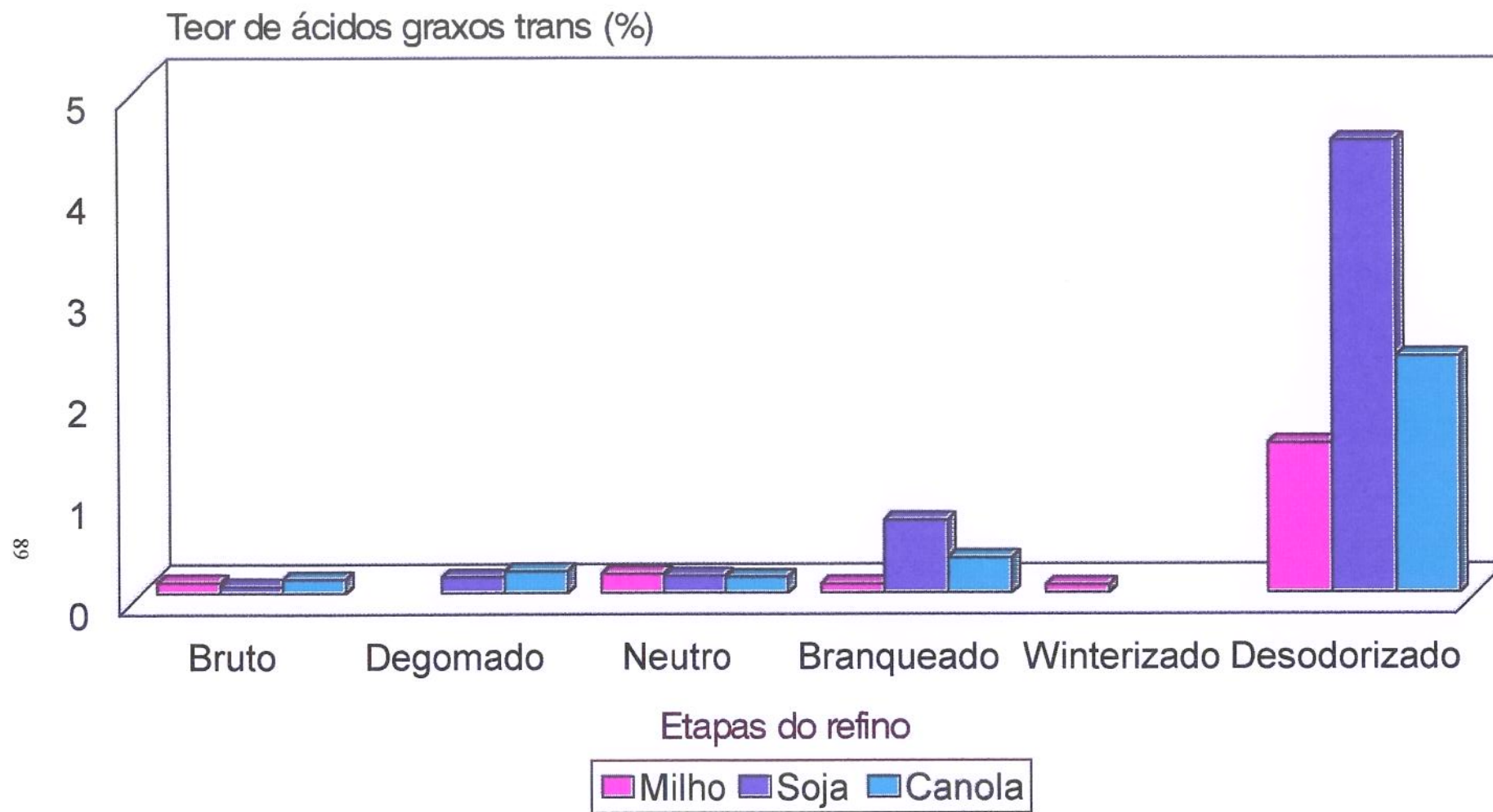


Figura 17. Gráfico da variação do teor de trans isômeros durante etapas do refino industrial de óleos de milho, soja e canola

Com exceção dos ácidos graxos C18:2 e C18:3, após a desodorização onde uma parte é convertida em *trans* isômeros, a composição de ácidos graxos não sofre mudanças significativas durante as etapas do processo de refino. Pequenas quantidades de mono-*trans* isômeros foram detectados nas amostras.

Óleo de canola exibe o menor teor de ácidos graxos saturados; conseqüentemente possui o maior nível de insaturados, enquanto que os níveis existentes nos óleos de soja e milho são equivalentes. O óleo de soja exibe o maior teor de ácidos graxos polinsaturados em relação às amostras analisadas.

4.3. Composição em esteróis

Devido ao elevado teor de esteróis dentre os compostos minoritários, especial atenção foi dada a esta fração. Cromatogramas típicos da fração de esteróis totais dos óleos de milho, soja e canola são apresentados na Figura 18.

As Tabelas 18, 20, 22, 24, 26 e 28 mostram a composição de esteróis totais de óleos de milho, soja e canola refinados em indústria e em laboratório respectivamente. E nas Tabelas 19, 21, 23, 25, 27 e 29 pode-se observar a composição relativa de esteróis totais de óleos de milho, soja e canola refinados em indústria e em laboratório, respectivamente.

A fração esterólica dos 3 óleos estudados apresentam, como característica 5 esteróis principais. E em todos os casos ocorre a predominância do β -sitosterol que esta na proporção de 65-68% para os esteróis do óleo de milho, 52-54% no caso do óleo de soja e 51-55% para o óleo de canola. Todos os óleos apresentaram pequena proporção de colesterol. Brassicasterol é um esterol característico do óleo de canola, e foi encontrado na faixa de 10% do total dos esteróis. Campesterol perfaz cerca de 20% do total dos esteróis em óleo de milho e soja, enquanto no caso da canola corresponde a cerca de 30% do total. Stigmasterol presente na faixa de 6,5% em óleo de milho, representa de 17-18% dos esteróis da soja e 0,3% no caso da canola. O gráfico com teor de esteróis totais durante as diferentes etapas do refino industrial pode ser visto na Figura 19.

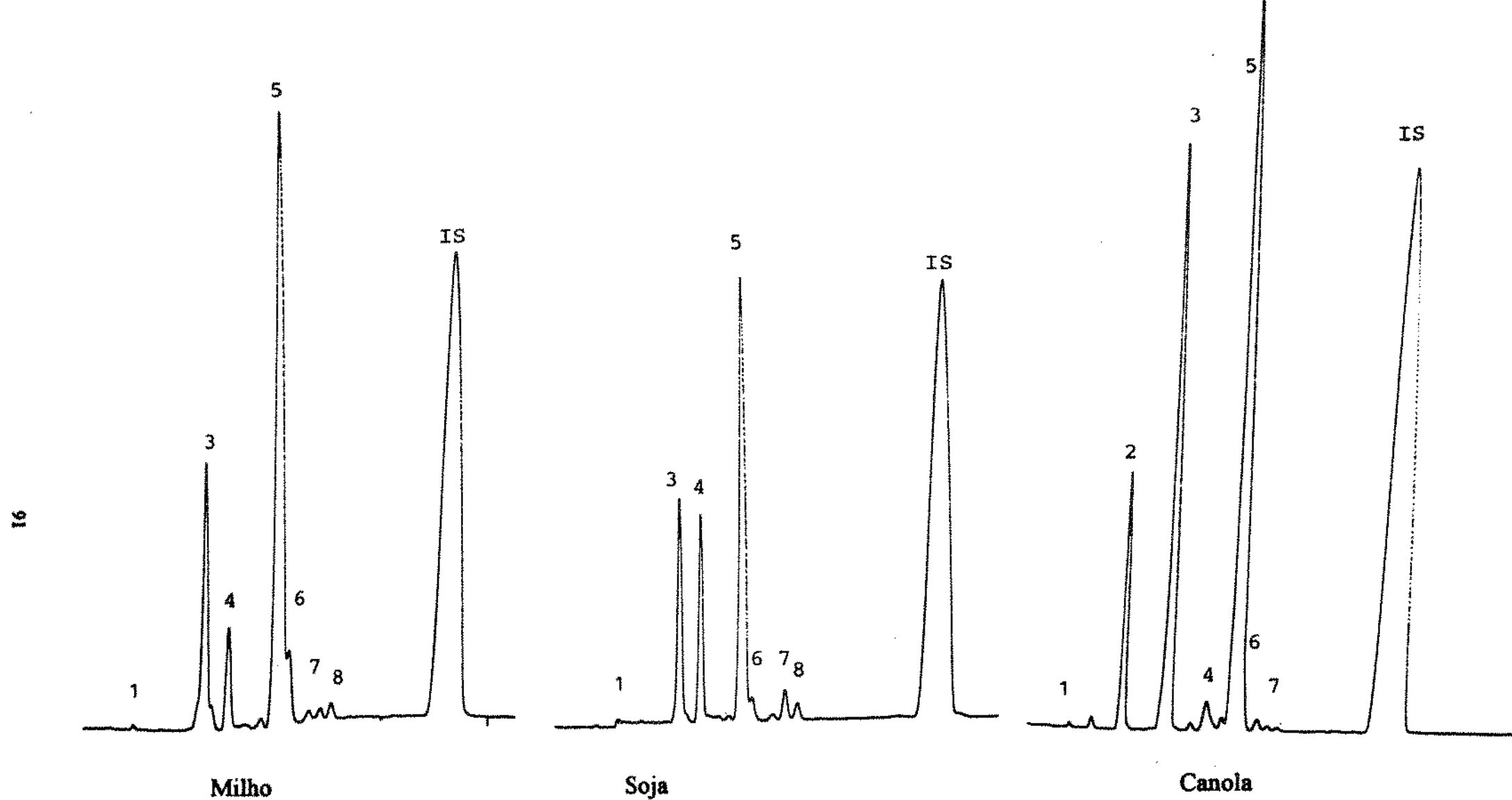


Figura 18. Cromatogramas típicos da composição de esteróis totais em amostras de óleos de milho, soja e canola, onde 1 é colesterol; 2 é brassicasterol; 3 é campesterol; 4 é estigmasterol; 5 é β -sitosterol; 6 é Δ^5 avenasterol; 7 é Δ^7 estigmasterol; 8 é Δ^7 avenasterol e IS é betulina. Condições cromatográficas no texto.

Tabela 18- Teor de esteróis (mg/kg) em óleo de milho proveniente de indústria.

Esterol	Bruto	Neutro	Branqueado	Winterizado	Desodorizado
Colesterol	29,4	18,1	11,0	17,6	24,4
Campesterol	2060,0	1631,3	1677,5	1527,6	1293,8
Estigmasterol	749,0	546,3	557,8	531,2	464,5
β -Sitosterol	7144,6	5652,9	5622,6	5620,6	4718,3
Δ^5 Avenasterol	1034,4	559,6	454,8	321,8	464,5
Δ^7 Estigmasterol	54,2	71,4	72,7	61,9	81,5
Δ^7 Avenasterol	67,4	112,2	91,3	102,7	105,6
Total	11139,0	8591,8	8487,6	8183,4	7152,6

Tabela 19- Teor de esteróis (%) em óleo de milho proveniente de indústria.

Esterol	Bruto	Neutro	Branqueado	Winterizado	Desodorizado
Colesterol	0,26	0,21	0,12	0,21	0,34
Campesterol	18,49	18,99	19,76	18,67	18,04
Estigmasterol	6,72	6,36	6,57	6,49	6,48
β -Sitosterol	64,14	65,79	66,24	68,68	65,80
Δ^5 Avenasterol	9,29	6,51	5,36	3,93	6,72
Δ^7 Estigmasterol	0,49	0,83	0,86	0,76	1,14
Δ^7 Avenasterol	0,60	1,31	1,08	1,25	1,47

Tabela 20- Teor de esteróis (mg/kg) em óleo de soja proveniente de indústria.

Esterol	Bruto	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
Colesterol	10,7	5,8	11,2	9,7	10,6
Campesterol	738,3	653,9	632,7	572,3	563,4
Estigmasterol	649,9	558,3	546,8	502,7	494,6
β -Sitosterol	1931,2	1737,7	1693,6	1555,3	1626,9
$\Delta 5$ Avenasterol	80,3	81,7	83,2	76,9	79,0
$\Delta 7$ Estigmasterol	118,8	112,7	111,6	113,2	117,0
$\Delta 7$ Avenasterol	65,3	64,5	60,2	58,1	62,6
Total	3594,5	3214,6	3139,3	2888,2	2954,1

Tabela 21- Teor de esteróis (%) em óleo de soja proveniente de indústria.

Esterol	Bruto	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
Colesterol	0,36	0,18	0,36	0,34	0,36
Campesterol	25,07	20,34	20,15	19,81	19,07
Estigmasterol	22,07	17,37	17,42	17,40	16,74
β -Sitosterol	65,59	54,06	53,94	53,85	55,07
$\Delta 5$ Avenasterol	2,73	2,54	2,65	2,66	2,67
$\Delta 7$ Estigmasterol	4,04	3,51	3,55	3,92	3,96
$\Delta 7$ Avenasterol	2,22	2,00	1,92	2,01	2,12

Tabela 22- Teor de esteróis (mg/kg) em óleo de canola proveniente de indústria.

Esterol	Bruto solvente	Bruto prensa	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
Colesterol	30,4	27,0	23,5	30,0	19,5	17,0
Brassicasterol	884,9	828,8	818,0	823,6	611,9	582,3
Campesterol	2458,7	2446,4	2444,1	2511,3	2110,8	2084,5
Estigmasterol	41,0	29,2	33,1	21,6	25,0	28,4
β -Sitosterol	4476,3	4196,2	4208,1	4538,2	3647,5	3414,6
$\Delta 5$ Avenasterol	245,3	148,7	161,0	39,4	64,6	91,3
$\Delta 7$ Estigmasterol	43,0	37,5	32,0	13,4	24,9	15,4
$\Delta 7$ Avenasterol	25,9	13,5	-	-	-	-
Total	8205,5	7727,3	7719,8	7977,6	6504,2	6233,5

Tabela 23- Teor de esteróis (%) em óleo de canola proveniente de indústria.

Esterol (%)	Bruto solvente	Bruto prensa	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
Colesterol	0,37	0,35	0,30	0,38	0,30	0,27
Brassicasterol	10,78	10,72	10,60	10,32	9,41	9,34
Campesterol	29,96	31,66	31,66	31,48	32,45	33,44
Estigmasterol	0,50	0,38	0,43	0,27	0,38	0,45
β -Sitosterol	54,55	54,30	54,51	56,89	56,08	54,78
$\Delta 5$ Avenasterol	2,99	1,92	2,08	0,49	0,99	1,46
$\Delta 7$ Estigmasterol	0,52	0,48	0,41	0,17	0,38	0,25
$\Delta 7$ Avenasterol	0,32	0,17	-	-	-	-

Tabela 24- Teor de esteróis (mg/kg) em óleo de milho proveniente de refino em laboratório.

Esterol	Bruto solvente	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado	Bruto prensa
Colesterol	20,2	27,7	14,7	18,0	17,0	18,0
Campesterol	1974,7	1949,6	1635,5	1687,0	1696,9	1844,9
Estigmasterol	732,6	672,7	621,9	651,9	658,5	662,7
β -Sitosterol	7222,8	7130,9	6104,1	6202,2	6109,5	6739,7
Δ 5Avenasterol	412,4	380,7	406,0	372,1	395,1	409,3
Δ 7Estigmasterol	130,9	81,3	90,5	108,6	155,3	114,8
Δ 7Avenasterol	98,6	140,3	97,5	95,2	92,7	97,6
Total	10592,2	10383,2	8970,2	9135,0	9125,0	9887,0

Tabela 25- Teor de esteróis (%) em óleo de milho proveniente de refino em laboratório.

Esterol	Bruto solvente	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado	Bruto prensa
Colesterol	0,19	0,27	0,16	0,20	0,19	0,18
Campesterol	18,64	18,78	18,23	18,47	18,60	18,66
Estigmasterol	6,92	6,48	6,93	7,14	7,22	6,70
β -Sitosterol	68,19	68,68	68,05	67,89	66,95	68,17
Δ 5Avenasterol	3,89	3,67	4,53	4,07	4,33	4,14
Δ 7Estigmasterol	1,24	0,78	1,01	1,19	1,70	1,16
Δ 7Avenasterol	0,93	1,35	1,09	1,04	1,02	0,99

Tabela 26- Teor de esteróis (mg/kg) em óleo de soja proveniente de refino em laboratório.

Esterol	Bruto	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
Colesterol	9,5	18,4	23,0	18,9	24,5
Campesterol	609,1	579,4	547,6	551,4	544,8
Estigmasterol	583,7	563,4	539,4	555,7	573,0
β -Sitosterol	1633,0	1552,4	1530,0	1528,4	1525,2
$\Delta 5$ Avenasterol	90,8	94,9	94,5	95,5	118,2
$\Delta 7$ Estigmasterol	108,2	117,9	120,7	135,2	163,8
$\Delta 7$ Avenasterol	52,6	49,2	54,1	50,1	50,7
Total	3086,9	2975,6	2909,3	2935,2	3000,2

Tabela 27- Teor de esteróis (%) em óleo de soja proveniente de refino em laboratório.

Esterol	Bruto	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
Colesterol	0,31	0,62	0,79	0,64	0,82
Campesterol	19,73	19,47	18,82	18,79	18,16
Estigmasterol	18,91	18,93	18,54	18,93	19,10
β -Sitosterol	52,90	52,17	52,59	52,07	50,83
$\Delta 5$ Avenasterol	2,94	3,19	3,25	3,25	3,94
$\Delta 7$ Estigmasterol	3,50	3,96	4,15	4,60	5,46
$\Delta 7$ Avenasterol	1,70	1,98	1,86	1,71	1,69

Tabela 28- Teor de esteróis (mg/kg) em óleo de canola proveniente de refino em laboratório.

Esterol	Bruto solvente	Bruto prensa	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
Colesterol	25,7	41,0	36,9	44,9	40,7	37,2
Brassicasterol	798,2	952,4	919,9	930,1	961,3	898,7
Campesterol	2368,7	2507,5	231,8	2500,8	2514,6	2482,3
Estigmasterol	43,1	27,4	27,7	26,9	25,6	22,2
β -Sitosterol	3890,9	4036,5	3841,7	4062,9	4067,0	4007,7
$\Delta 5$ Avenasterol	254,9	279,4	293,6	309,7	279,5	292,4
$\Delta 7$ Estigmasterol	27,1	23,7	51,3	67,0	70,3	90,9
$\Delta 7$ Avenasterol	-	25,3	-	-	-	-
Total	7408,6	7893,2	7532,9	7942,3	7959,0	7831,4

Tabela 29- Teor de esteróis (%) em óleo de canola proveniente de refino em laboratório.

Esterol (%)	Bruto solvente	Bruto prensa	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
Colesterol	0,35	0,52	0,49	0,56	0,51	0,47
Brassicasterol	10,77	12,07	12,21	11,71	12,08	11,48
Campesterol	31,97	31,77	31,35	31,49	31,59	31,70
Estigmasterol	0,58	0,35	0,37	0,34	0,32	0,28
β -Sitosterol	52,52	51,14	51,00	51,15	51,10	51,17
$\Delta 5$ Avenasterol	3,44	3,54	3,90	3,90	3,51	3,73
$\Delta 7$ Estigmasterol	0,36	0,30	0,68	0,84	0,88	1,16
$\Delta 7$ Avenasterol	-	0,32	-	-	-	-

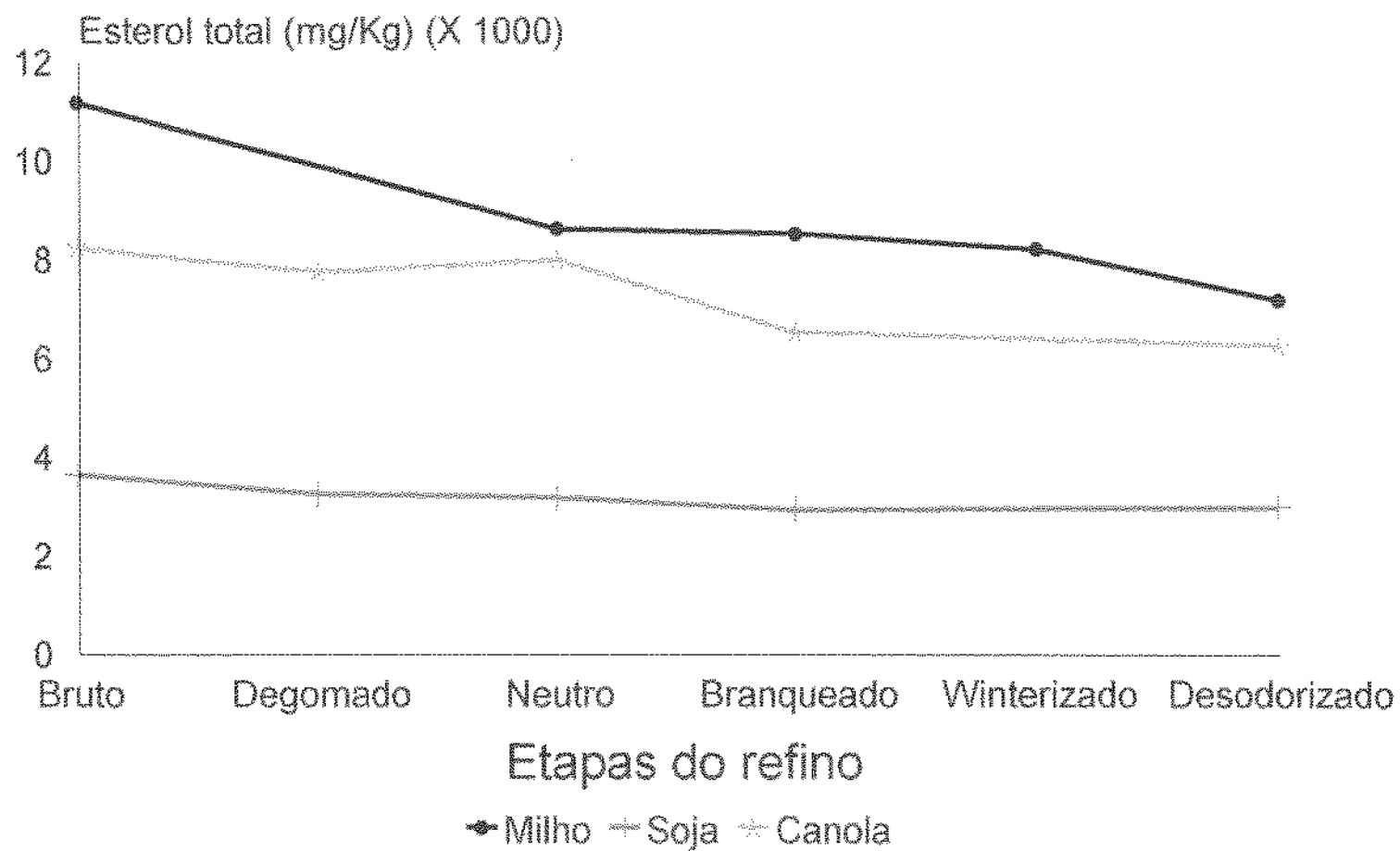


Figura 19. Teor de esteróis totais durante diferentes etapas do refino industrial de óleos de milho, soja e canola

O óleo bruto de milho possui, dentre as amostras analisadas, o teor mais elevado de esteróis totais. Óleo de milho e canola após completo refino apresentaram níveis de esteróis na faixa de 6.000 a 7.000 mg/kg de amostra, enquanto que a soja apresentou um nível menor de 2.900 mg/kg.

O perfil em esteróis durante as diferentes etapas do refino industrial pode ser visto nas Figuras 20, 21 e 22, para os óleos de milho, soja e canola, respectivamente.

Durante o refino industrial, observou-se perdas de 35,8% nos esteróis totais do óleo de milho, 17,8% no óleo de soja e 24,0% no óleo de canola. No refino efetuado em laboratório ocorreram perdas na faixa de 13,8% dos esteróis do óleo de milho, 2,8% no óleo de soja e nenhuma perda no óleo de canola.

4.4. Teor de esteróis esterificados

Realizou-se o fracionamento dos lipídios totais através de cromatografia em mini coluna de sílica gel, por eluição com éter de petróleo, a fração apolar dos lipídios pode ser usada para a análise de esteroldienos através de CLAE (SCHULTE, 1994), a segunda fração eluída com a mistura de éter de petróleo/diclorometano (85:15, v/v) possui a fração de esteróis esterificados com traços de triacilgliceróis. Uma rápida purificação desta fração em pipeta Pasteur, cheia com sílica gel, produziu uma fração pura de esteróis esterificados, a qual foi analisada por CLAE utilizando-se detector de massa.

A recuperação do padrão de β -sitosteril-oleato (sintetizado após reação de β -sitosterol e ácido oleico) após cromatografia em coluna de sílica gel foi entre 97 e 102%. A calibração do sistema de CLAE, equipado com detector de massa, utilizando-se β -sitosteril oleato como padrão externo, mostrou boa correlação entre a concentração do padrão e a área dos picos resultantes. O coeficiente de correlação foi de 0,9955. Acredita-se que colesterol estearato, disponível comercialmente, também pode ser empregado como padrão externo para calibração do detector no sistema CLAE.

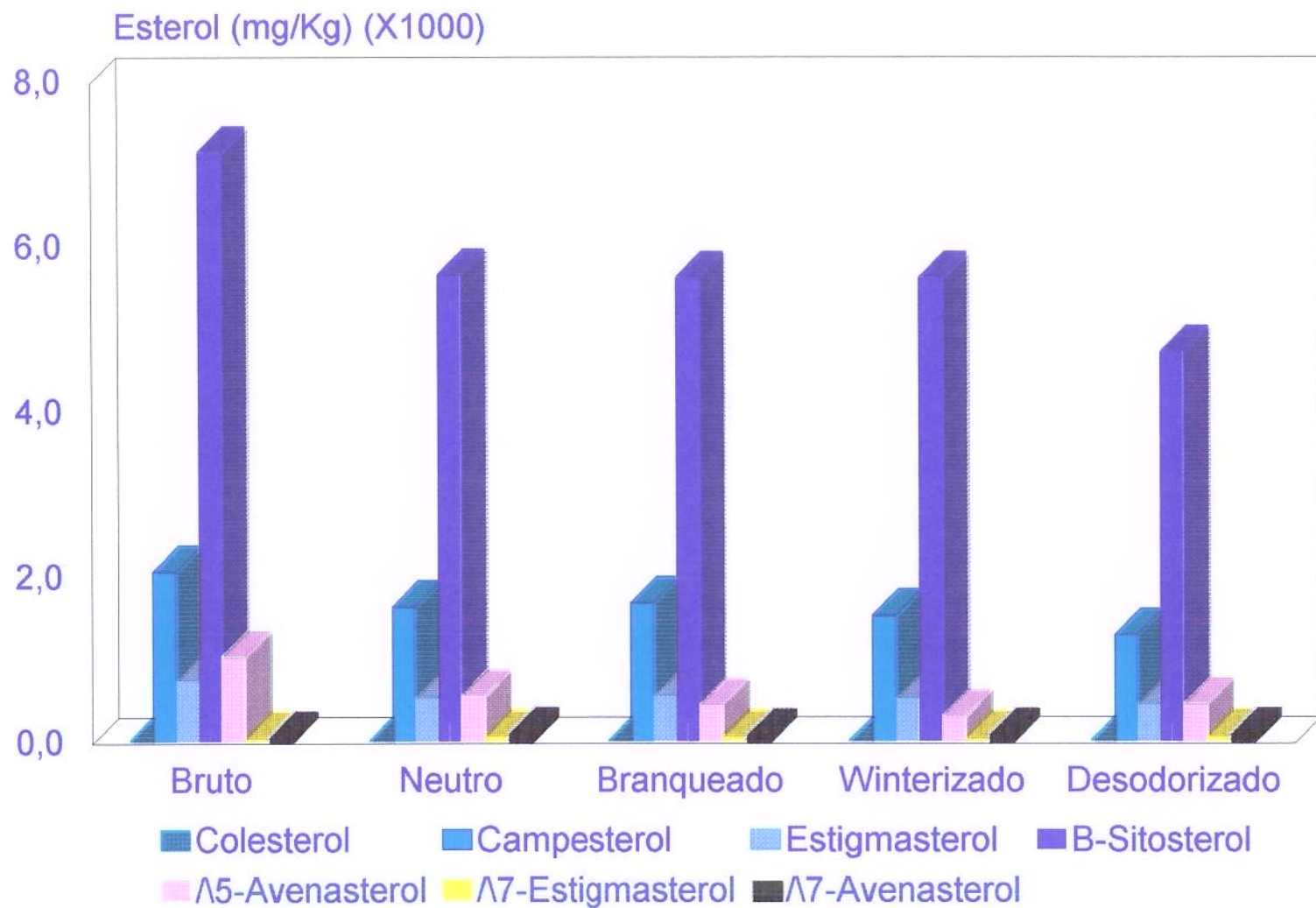


Figura 20. Variação no teor de esteróis durante o refino industrial do óleo de milho

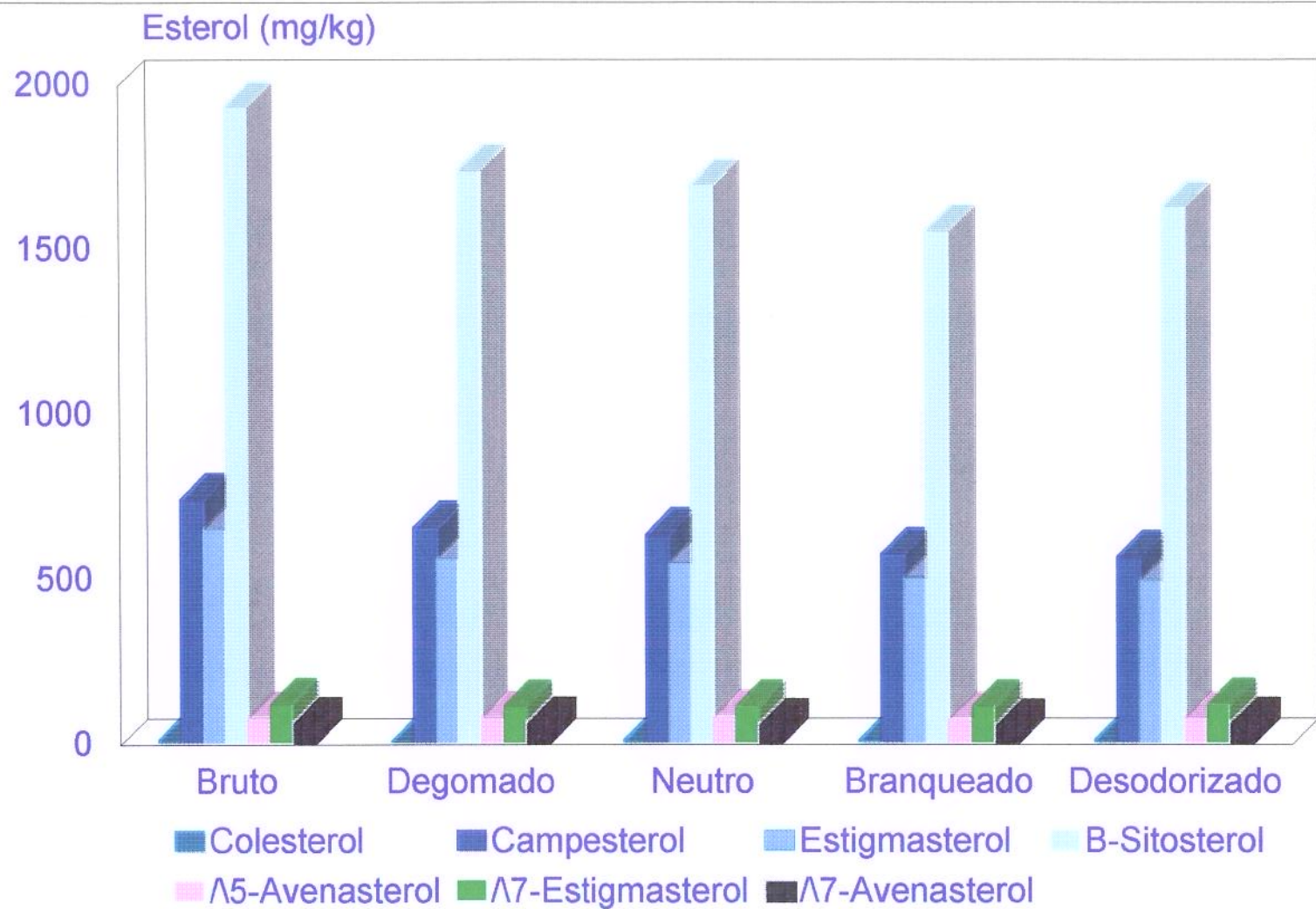


Figura 21. Variação no teor de esteróis durante o refino industrial do óleo de soja

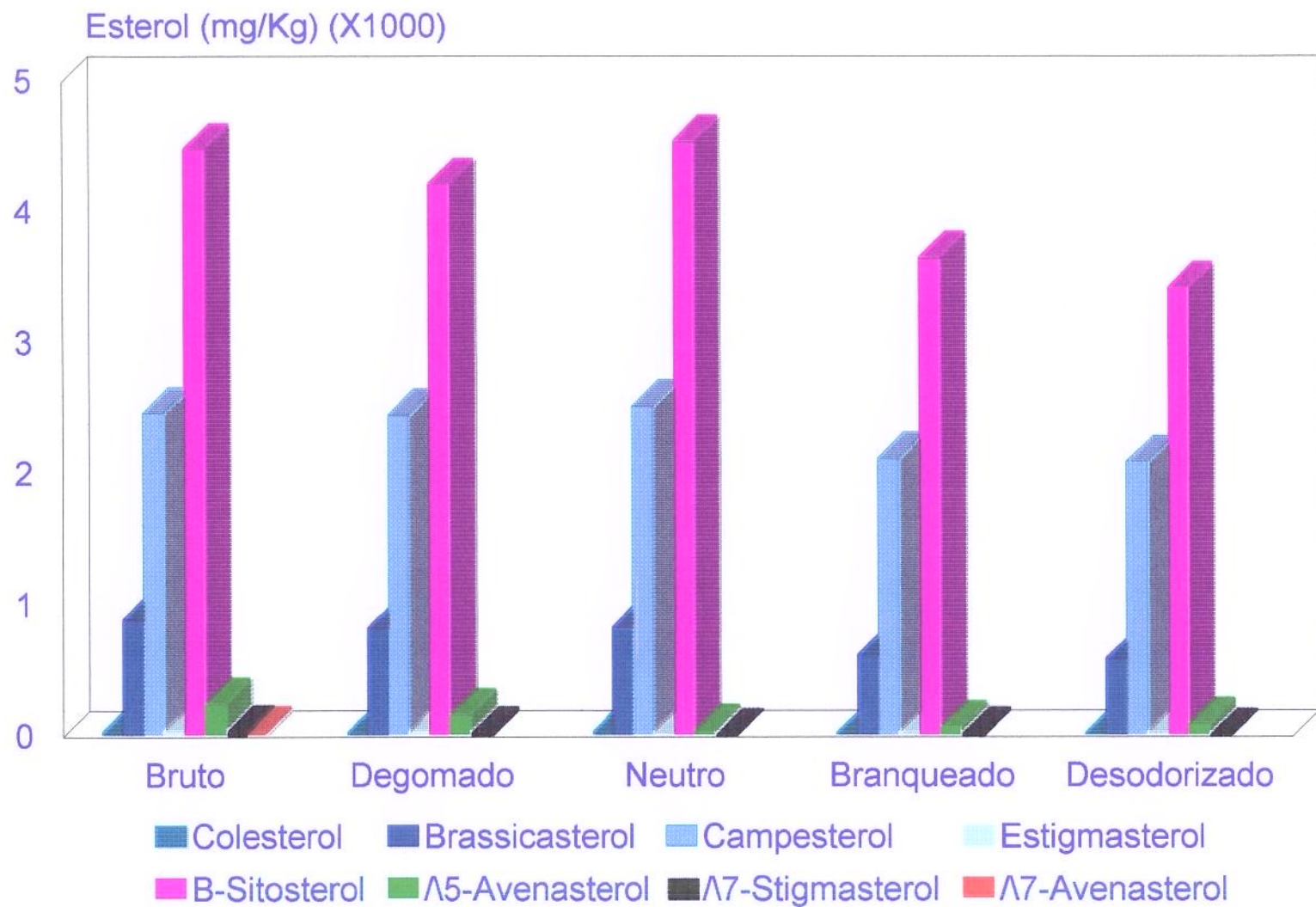


Figura 22. Variação no teor de esteróis durante o refino industrial do óleo de canola

Cromatogramas típicos dos esteróis esterificados das amostras dos óleos de milho, soja e canola obtidos após breve separação desta fração através de cromatografia em coluna, e posterior análise em CLAE com detector de massa, podem ser vistos na Figura 23. Fica evidente através da observação dos cromatogramas que cada tipo de óleo tem uma distribuição característica dos esteróis esterificados, a qual pode ser utilizada na identificação de óleos.

O teor total de esteróis esterificados nas amostras de óleos de milho, soja e canola refinados em indústria encontram-se na Tabela 30. Alterações no teor total de esteróis esterificados dos 3 diferentes tipos de óleos analisados podem ser observadas no gráfico da Figura 24.

Nota-se através dos resultados obtidos das amostras analisadas, que o óleo de milho é o mais rico em esteróis esterificados (cerca de 800mg/100g), seguido pelo óleo de canola (cerca de 700mg/100g) e óleo de soja (cerca de 120mg/100g). É também notório que em ambos óleos brutos, de milho e canola, a maior fração dos esteróis ocorre como esteróis esterificados, e no óleo de soja uma substancial parte dos esteróis ocorre como esteróis esterificados. Durante o refino não foram observadas perdas pronunciadas desta fração.

O teor total de esteróis esterificados das amostras refinadas em laboratório são exibidos na Tabela 31; pouca variação após cada etapa do refino foi também observada neste caso, porém os valores obtidos são, de uma forma geral, menores que os dos óleos refinados em indústria.

4.4.1. Ácidos graxos da fração de esteróis esterificados

Foi analisada a composição em ácidos graxos da fração de esteróis esterificados das amostras procedentes de refino industrial.

Uma alíquota da fração de esteróis esterificados foi transesterificada com metóxido de sódio e os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram determinados por CG. Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas de 32 a 34 para os óleos de milho, soja e canola respectivamente.

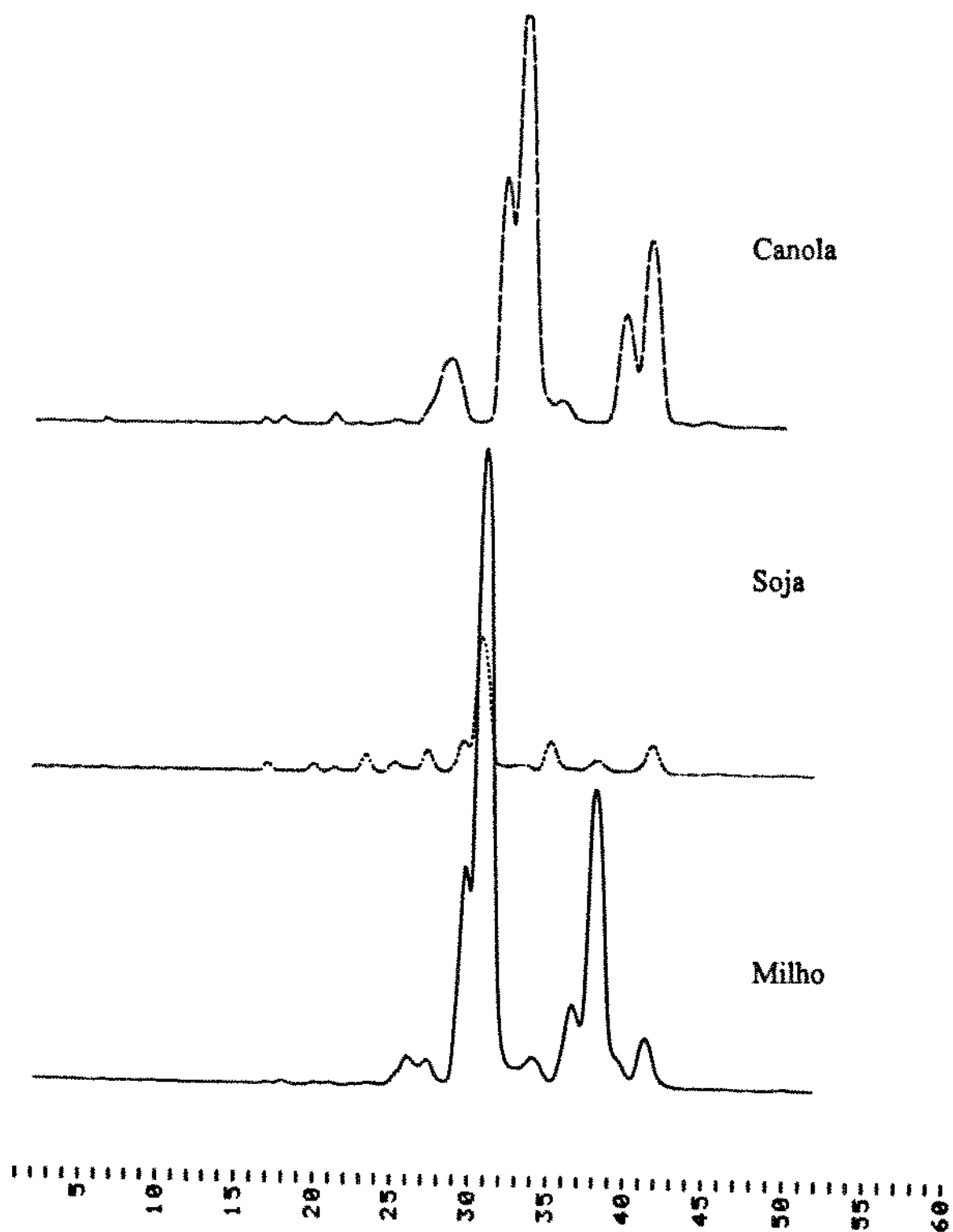


Figura 23. Perfil cromatográfico (CLAE) dos ésteres esterificados de amostras de óleos de milho, soja e canola. Condições cromatográficas contidas no texto.

A distribuição de ácidos graxos esterificados com esteróis difere proporcionalmente de forma considerável dos esterificados com glicerol nos óleos de soja e canola, no óleo de milho não se observou grande variação neste aspecto.

Tabela 30 -Teor total de esteróis esterificados em amostras de óleos refinados em indústrias

Tipo de óleo	Teor total de esteróis esterificados (mg/100g)
Milho Bruto	1094,64
Neutro	847,23
Branqueado	837,95
Winterizado	808,47
Desodorizado	711,30
Soja Bruto	121,31
Degomado	165,84
Neutro	132,10
Branqueado	126,44
Desodorizado	113,53
Canola Bruto	759,43
Degomado	740,44
Neutro	785,87
Branqueado	640,74
Desodorizado	615,08
Bruto Prensa	814,71

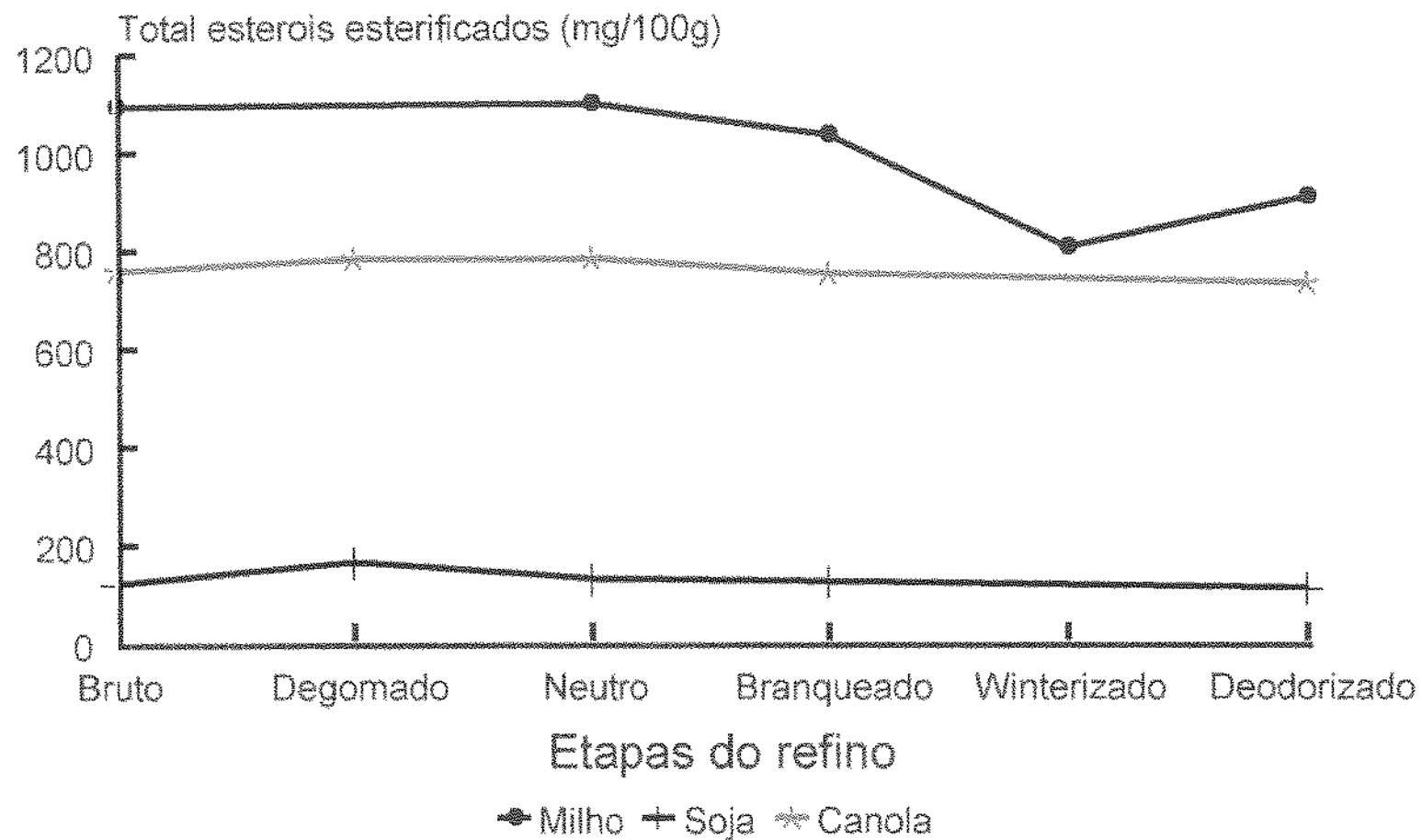


Figura 24. Gráfico da variação no teor de esteróis esterificados durante o refino industrial dos óleos de milho, soja e canola

Tabela 31- Teor total de esteróis esterificados em amostras refinadas em laboratório

Tipo de óleo	Teor total de esteróis esterificados (mg/100g)
Milho Bruto	707,28
Degomado	749,05
Neutro	796,68
Branqueado	792,00
Desodorizado	838,04
Bruto Prensa	686,82
Soja Bruto	102,83
Degomado	96,55
Neutro	108,41
Branqueado	99,56
Desodorizado	109,13
Canola Bruto	473,23
Degomado	442,46
Neutro	686,97
Branqueado	664,96
Desodorizado	671,99
Bruto Prensa	511,45

Tabela 32- Composição em ácidos graxos na fração de esteróis esterificados em cada etapa do refino de óleo de milho procedente de indústria

Ácido graxo	Composição (%)				
	Bruto	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
16:0	11,2	9,7	10,7	13,3	11,8
16:1	0,8	<0,1	1,0	<0,1	<0,1
18:0	2,1	1,2	1,5	1,8	1,3
18:1	28,7	28,1	28,2	30,5	29,7
18:2	53,4	57,5	56,3	52,0	56,1
18:3	0,7	1,0	<0,1	<0,1	<0,1
20:0	0,8	<0,1	<0,1	1,2	<0,1
22:0	0,9	0,8	0,8	<0,1	<0,1
24:0	1,3	1,5	1,5	1,2	1,1

Tabela 33- Composição em ácidos graxos na fração de esteróis esterificados em cada etapa do refino de óleo de soja procedente de indústria

Ácido graxo	Composição (%)				
	Bruto	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
14:0	1,0	0,5	0,7	0,5	0,7
16:0	11,5	10,5	12,6	11,8	15,2
16:1	0,6	0,4	0,8	0,6	0,9
17:0	1,6	0,3	0,4	1,0	0,4
18:0	3,6	3,3	3,7	3,6	4,5
18:1	8,4	10,0	10,0	10,0	13,7
18:2	26,4	27,7	27,5	26,9	32,5
18:3	19,4	20,3	19,0	19,1	11,7
20:0	2,8	2,4	2,6	2,6	2,3
20:1	0,9	1,2	0,8	1,3	0,9
22:0	12,6	12,3	11,9	11,9	9,2
24:0	11,2	10,9	9,9	10,8	8,0

Tabela 34- Composição em ácidos graxos na fração de esteróis esterificados em cada etapa do refino de óleo de canola procedente de indústria

Ácido graxo	Composição (%)				
	Bruto	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
14:0	0,6	<0,1	<0,1	0,3	0,4
16:0	3,4	3,5	3,6	3,1	2,9
16:1	0,6	<0,1	0,8	0,6	<0,1
18:0	0,4	1,0	0,9	0,6	0,7
18:1	31,3	36,5	32,0	33,7	34,2
18:2	51,7	50,1	50,0	55,1	55,5
18:3	11,5	8,8	11,7	6,2	6,0
20:0	0,5	<0,1	1,0	0,3	0,3

Esteróis esterificados de óleos de milho e canola apresentaram altos níveis de ácido linoleico (C18:2) e óleo de soja baixo nível deste ácido graxo que o correspondente no óleo total. Óleo de milho contém alto nível de ácido lignocérico (C24:0) nos esteróis esterificados em relação ao teor presente nos acilgliceróis. Esteróis esterificados de óleos de soja e canola contem também alto nível de ácido linolênico (C18:3) que o correspondente óleo total. Neste contexto é interessante notar que JOHANSSON & APPELQVIST (1978) e WORTHINGTON et alli (1984) também encontraram elevado teor de ácido linoleico e oleico na fração de esteróis esterificados de óleo de canola quando comparado com o teor existente no óleo total. Os esteróis esterificados do óleo de soja contem altos níveis de ácido araquídico (C20:0), gadoleico (C20:1), behênico (C22:0) e lignocérico (C24:0).

4.4.2. Esteróis presentes na fração de esteróis esterificados

Os esteróis presentes na fração de esteróis esterificados, de óleos refinados em indústrias, foram analisados através de CG e os resultados encontram-se nas Tabelas 35, 36 e 37.

Nos óleos de milho e soja, a distribuição dos esteróis nos esteróis esterificados foi diferente da fração de esteróis totais. A fração de esteróis esterificados no óleo de milho contém mais estigmasterol e Δ^7 estigmasterol e menos campesterol que na fração de esteróis totais. Já no óleo de soja os níveis de campesterol e estigmasterol são menores nos esteróis esterificados, enquanto que o Δ^7 estigmasterol e o Δ^7 avenasterol aparecem em quantidades maiores.

O óleo de canola não apresentou diferenças significativas em relação aos esteróis presentes na fração esterificada e total.

Tabela 35- Composição relativa de esteróis (%) presentes na fração de esteróis esterificados de óleo de milho refinado em indústria.

Esterol	Bruto	Neutro	Branqueado	Winterizado	Desodorizado
Colesterol	0,57	0,27	0,58	0,48	0,49
Campesterol	17,58	16,00	15,74	15,37	16,48
Estigmasterol	8,39	12,03	13,02	11,88	14,71
β -Sitosterol	71,39	62,69	58,85	61,35	55,85
Δ^5 Avenasterol	-	4,77	6,00	4,33	4,39
Δ^7 Estigmasterol	1,41	4,09	5,24	5,10	6,93
Δ^7 Avenasterol	0,65	0,15	0,57	1,49	1,13

Tabela 36- Composição relativa de esteróis (%) presentes na fração de esteróis esterificados de óleo de soja refinado em indústria.

Esterol	Bruto	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
Campesterol	9,35	12,65	10,33	11,29	15,31
Estigmasterol	14,94	14,36	14,26	15,16	11,34
β -Sitosterol	57,99	62,0	53,93	52,93	69,87
Δ^5 Avenasterol	3,09	-	5,24	5,25	-
Δ^7 Estigmasterol	9,52	7,07	11,47	10,72	3,48
Δ^7 Avenasterol	5,10	3,87	4,76	4,64	-

Tabela 37- Composição relativa de esteróis (%) presentes na fração de esteróis esterificados de óleo de canola refinado em indústria.

Esterol	Bruto	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodoriza do
Brassicasterol	7,66	9,01	9,19	11,34	7,88
Campesterol	33,96	32,61	33,05	29,50	34,45
Estigmasterol	0,41	1,92	-	3,00	1,16
β -Sitosterol + Δ 5Avenasterol	56,97	53,93	57,76	53,49	55,45
Δ 7Estigmasterol	0,63	1,66	-	2,67	1,06
Δ 7Avenasterol	0,36	0,87	-	-	-

4.5. Esteróis totais, esterificados e livres

Nas tabelas 38 e 39 estão os teores de estero total, esterificado e livre presentes nas amostras de óleos de milho, soja e canola refinados em indústria e em laboratório respectivamente.

Fica evidenciado através das análises realizadas em óleo de milho que quanto ao teor de estero livre e esterificado, a primeira fração está presente em forma minoritária (< 2%), ocorre o mesmo no caso do óleo de canola.

Quanto ao óleo de soja a fração esterólica é fundamentalmente apresentada no estado livre. A fração de estero esterificado é minoritária em relação aos esteróis totais.

No óleo de soja a fração esterólica apresenta uma relação inicial aproximada de 2:1, livre/esterificada, porém ao longo do processamento esta relação muda significativamente até 3:2 devido ao decréscimo no teor de estero livre, enquanto que os esterificados são mais estáveis.

Esta última observação de menores mudanças no teor de esteróis esterificados durante o processamento, também é válida para os óleos de canola e milho. No caso do óleo de canola, por exemplo, a quantidade residual corresponde a só 13% dos esteróis livres presentes no óleo bruto.

No caso do refino em laboratório, observa-se que todos os valores (esteróis totais e esterificados) são menores quando comparados com os do processo industrial, embora apresentem a mesma tendência de perdas maiores na fração de esteróis livres. Porém, os valores de esteróis livres em óleos de milho e canola são muito maiores que no processo industrial.

Tabela 38. Teor de esterol total, esterificado e livre em amostras refinadas em indústrias

Tipo de óleo	Esterol (mg/kg)		
	total	esterificado	livre
Milho bruto	11139,0	10946,4	192,6
Neutro	8591,8	8472,3	119,5
Branqueado	8487,6	8379,5	108,1
Winterizado	8183,4	8084,7	98,7
Desodorizado	7152,6	7113,0	39,6
Soja bruto	3594,5	1213,1	2381,4
Degomado	3214,6	1658,4	1556,2
Neutro	3139,3	1321,0	1818,3
Branqueado	2888,2	1264,4	1623,8
Desodorizado	2954,1	1135,3	1818,8
Canola bruto	8205,5	7594,3	611,2
Degomado	7719,8	7404,4	315,4
Neutro	7977,6	7858,7	118,9
Branqueado	6504,2	6407,4	96,8
Desodorizado	6233,5	6150,8	82,7

Tabela 39. Teor de esterol total, esterificado e livre em amostras refinadas em laboratório

Tipo de óleo	Esterol (mg/kg)		
	total	esterificado	livre
Milho bruto	10592,2	7072,8	3519,4
Degomado	10383,2	7490,5	2892,7
Neutro	8970,2	7966,8	1003,4
Branqueado	9135,0	7920,0	1215,0
Desodorizado	9125,0	8380,4	744,6
Soja bruto	3086,9	1028,3	2058,6
Degomado	2975,6	965,5	2009,5
Neutro	2909,3	1084,1	1825,2
Branqueado	2935,2	995,6	1939,6
Desodorizado	3000,2	1091,3	1908,9
Canola bruto	7408,6	4732,3	2676,3
Degomado	7532,9	4424,6	3108,3
Neutro	7942,3	6869,7	1072,6
Branqueado	7959,0	6649,6	1309,4
Desodorizado	7831,4	6719,9	1111,5

4.6. Teor de esteroldienos

Durante o tratamento térmico de óleos vegetais, novos hidrocarbonetos originários dos esteróis, como estigmastadieno, formado pela desidratação do β -sitosterol são formados. A presença destes compostos é indicativa da aplicação de processos térmicos relacionados diretamente com o refino (MARIANI et alli, 1991).

Na Figura 25 pode-se observar a curva padrão de colestadieno obtida através de análise em CLAE.

Cromatogramas de esteroldienos após cada etapa do refino de óleo de milho, soja e canola podem ser vistos nas Figuras 26, 27 e 28 respectivamente.

A concentração de esteroldienos, produtos da desidratação dos esteróis, encontrados nas amostras analisadas através de CLAE, podem ser vistas nas Tabelas 40, 41 e 42 para os óleos de milho, soja e canola refinados em indústria e nas Tabelas 43, 44 e 45 para óleos refinados em laboratório.

Na Figura 29 observa-se o total de esteroldienos após cada etapa do refino industrial dos óleos de milho, soja e canola.

Esta investigação mostra que esteroldienos não estão presentes em óleos brutos de milho e soja, mas encontram-se em pequena quantidade no óleo bruto de canola. As etapas de degomagem e neutralização de uma forma geral não contribuem para o acréscimo destes compostos.

Dos cinco estágios do refino de óleos vegetais investigados durante este estudo, principalmente após a etapa de clarificação é que se observa um acréscimo destes compostos.

A desodorização é a etapa onde o acréscimo destes compostos é mais marcante provavelmente como consequência das altas temperaturas utilizadas durante esta etapa.

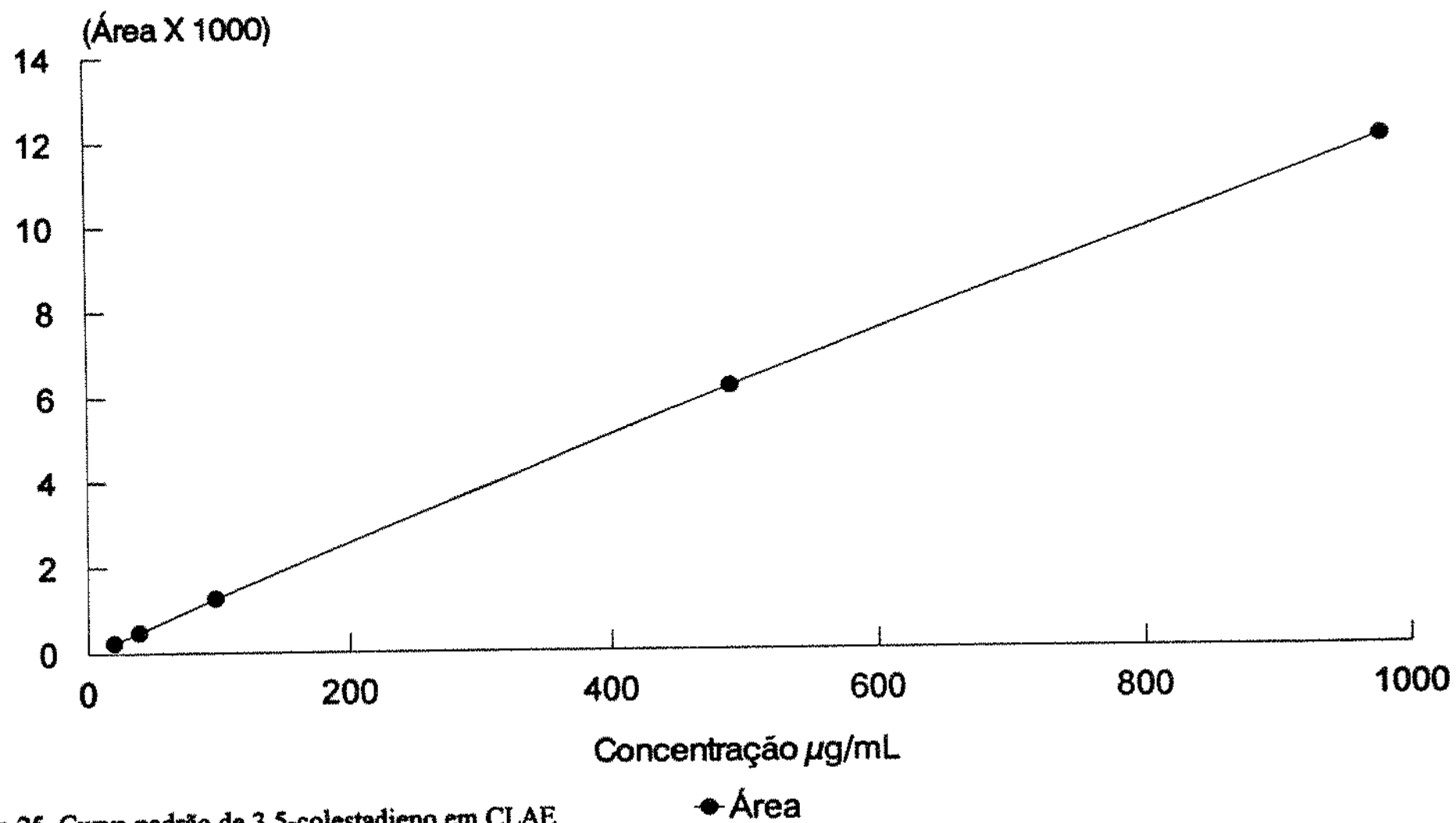


Figura 25. Curva padrão de 3,5-colestadieno em CLAE

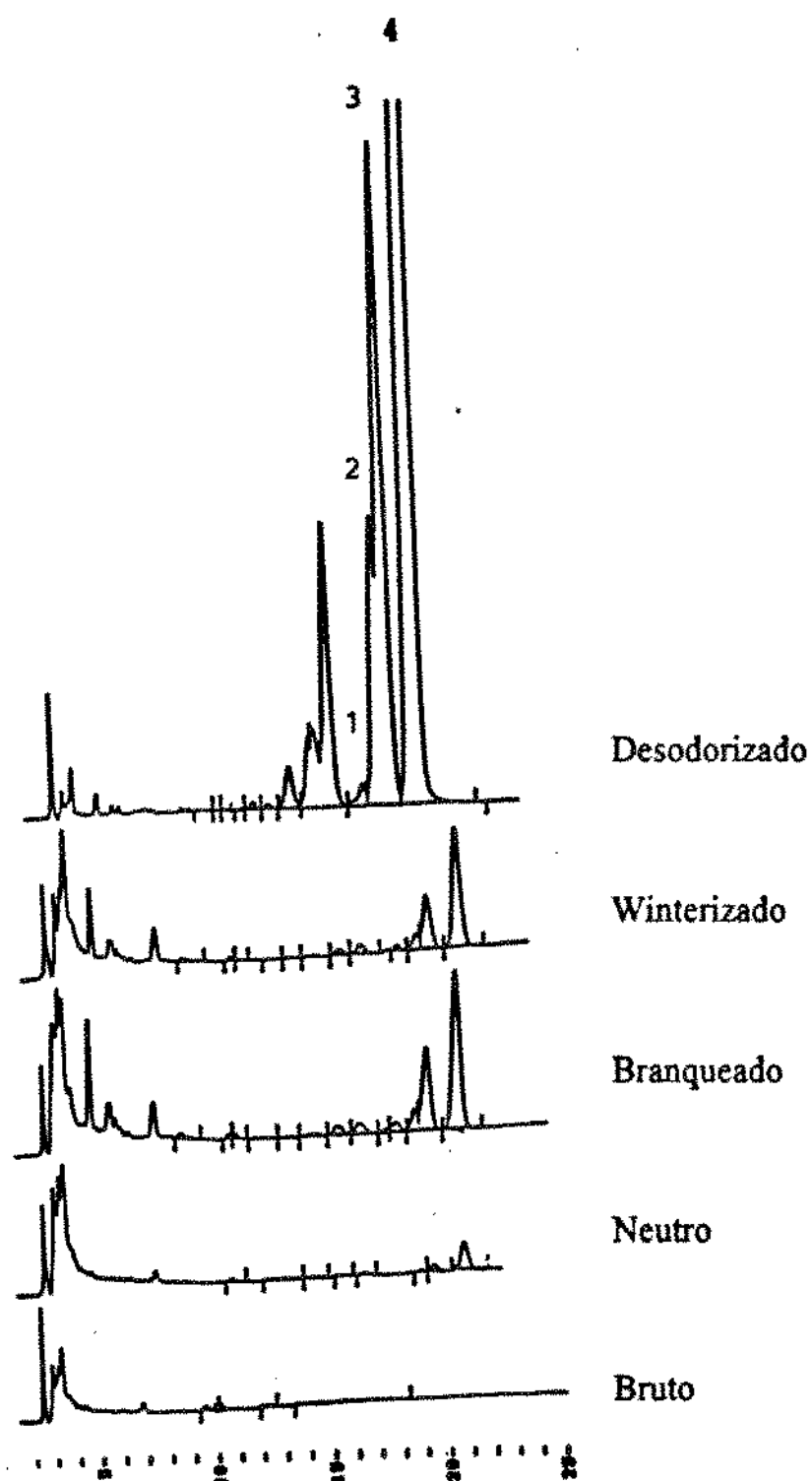


Figura 26. Cromatogramas (CLAE) de esteroldienos em etapas do refino industrial de óleo de milho, onde 1 é colestadieno; 2 é campestadieno; 3 é estigmastatrieno, 4 é estigmastadieno. Condições cromatográficas contidas no texto.

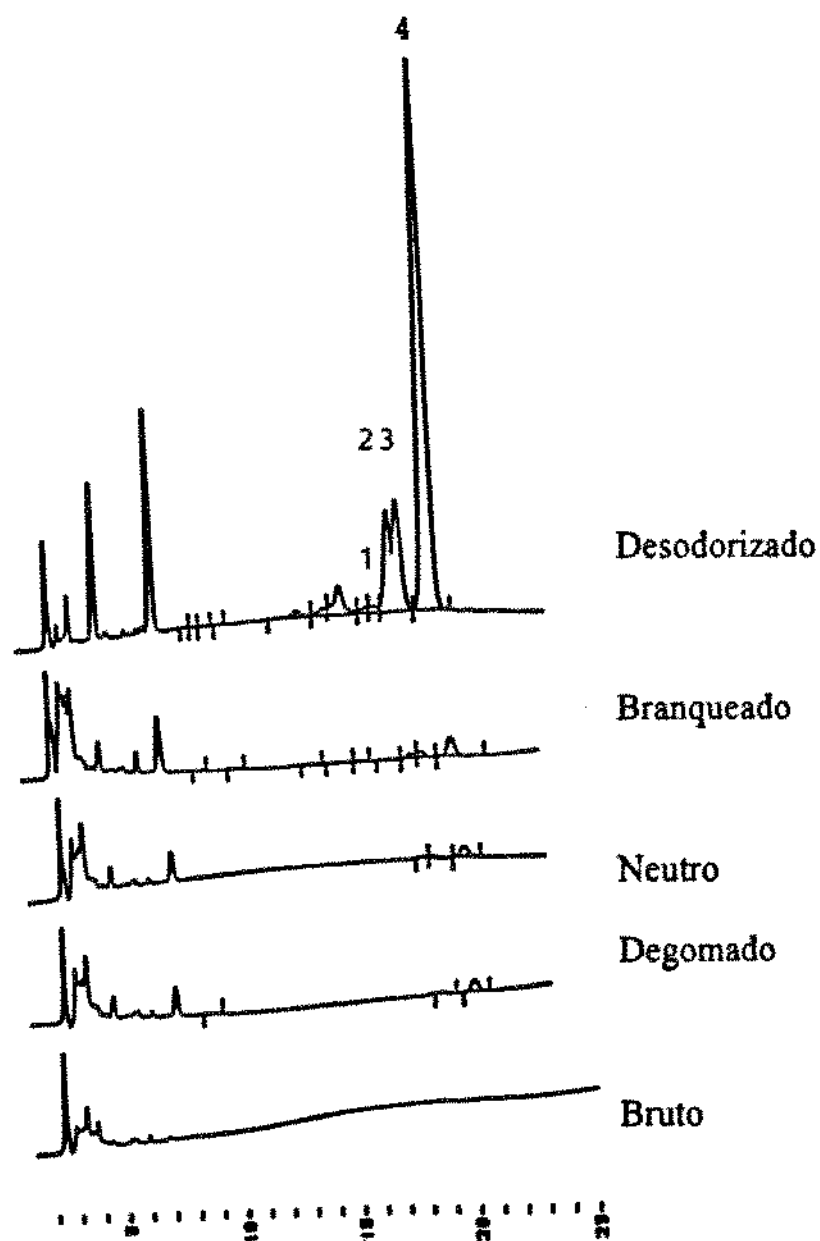


Figura 27. Cromatogramas (CLAE) de esteroldienos em etapas do refino industrial de óleo de soja, onde 1 é colestadieno; 2 é campestadieno; 3 é estigmastatrieno, 4 é estigmastadieno. Condições cromatográficas contidas no texto.

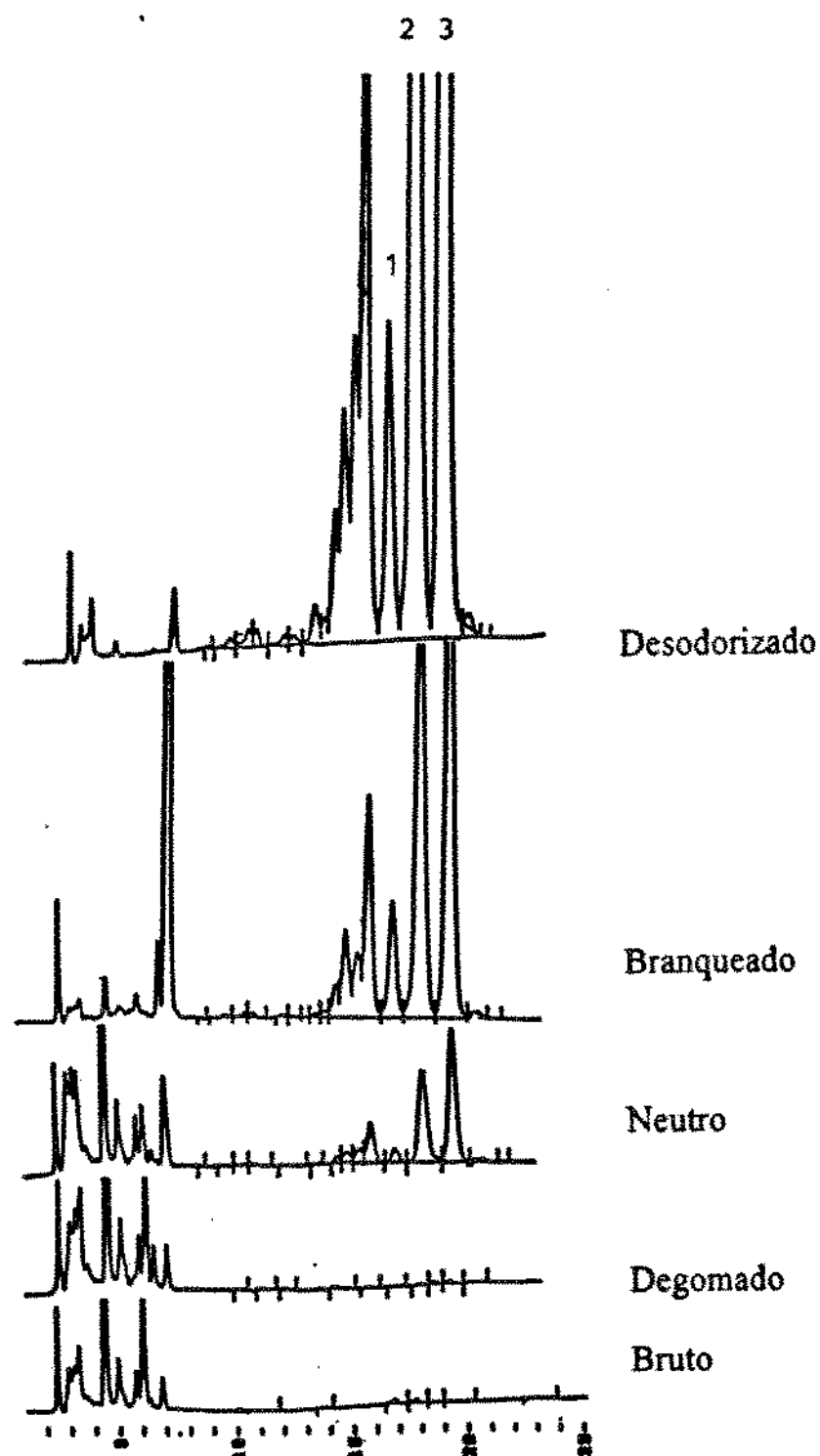


Figura 28. Cromatogramas (CLAE) de esteroldienos em etapas do refino industrial de óleo de canola, onde 1 é campestatrieno; 2 é campestadieno; 3 é estigmastadieno. Condições cromatográficas contidas no texto.

Tabela 40- Teor de esteroldienos óleo de milho proveniente de indústria

Esteroldieno (mg/kg)	Bruto	Neutro	Branqueado	Winterizado	Desodorizado
Colestadieno	-	-	0,12	0,13	0,81
Campestadieno	-	0,10	0,65	0,51	8,89
Estigmastatrieno	-	0,28	3,19	2,24	26,13
Estigmastadieno	-	1,09	5,91	4,79	99,04
n.i.*	-	-	-	-	0,84
Total	-	1,48	9,87	7,68	134,03

* n.i. = não identificado

Tabela 41- Teor de esteroldienos óleo de soja proveniente de indústria

Esteroldieno (mg/kg)	Bruto	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
Colestadieno	-	-	-	-	0,25
Campestadieno	-	-	0,06	0,21	3,28
Estigmastatrieno	-	0,06	0,11	0,28	4,32
Estigmastadieno	-	0,40	0,38	0,73	20,37
Total	-	0,46	0,55	1,22	28,22

Tabela 42- Teor de esteroldienos em óleo de canola proveniente de indústria

Esteroldieno (mg/kg)	Bruto	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
Campestatrieno	-	0,45	0,09	21,82	24,16
Campestadieno	0,35	3,65	0,17	95,84	158,19
Estigmastadieno	0,30	4,81	0,16	106,73	209,43
n.i.*	-	0,11	0,08	0,93	0,93
Total	0,65	9,02	0,50	225,32	392,71

* n.i. = não identificado

Tabela 43- Teor de esteroldienos em óleo de milho proveniente de refino em laboratório

Esteroldieno (mg/kg)	Bruto	Neutro	Branqueado	Winterizado	Desodorizado
Colestadieno	-	-	-	0,27	0,77
Campestadieno	-	-	-	0,59	4,66
Estigmastatrieno	-	-	-	0,71	9,16
Estigmastadieno	-	-	0,09	2,15	32,33
n.i.*	-	-	-	0,37	0,18
Total	-	-	0,09	4,09	47,10

* n.i. = não identificado

Tabela 44- Teor de esteroldienos em óleo de soja proveniente de refino em laboratório

Esteroldieno (mg/kg)	Bruto	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
Colestadieno	-	-	-	-	-
Campestadieno	-	-	-	-	0,78
Estigmastatrieno	-	-	-	0,32	0,90
Estigmastadieno	-	-	-	0,73	1,49
Total	-	-	-	1,05	3,17

Tabela 45- Teor de esteroldienos (mg/kg) em óleo de canola proveniente de refino em laboratório

Esteroldieno	Bruto	Degomado	Neutro	Branqueado	Desodorizado
Campestatrieno	-	-	-	-	1,16
Campestadieno	-	-	-	1,56	2,44
Estigmastadieno	-	-	-	2,50	4,39
n.i.*	-	-	-	-	0,21
Total	-	-	-	4,06	8,20

* n.i. = não identificado

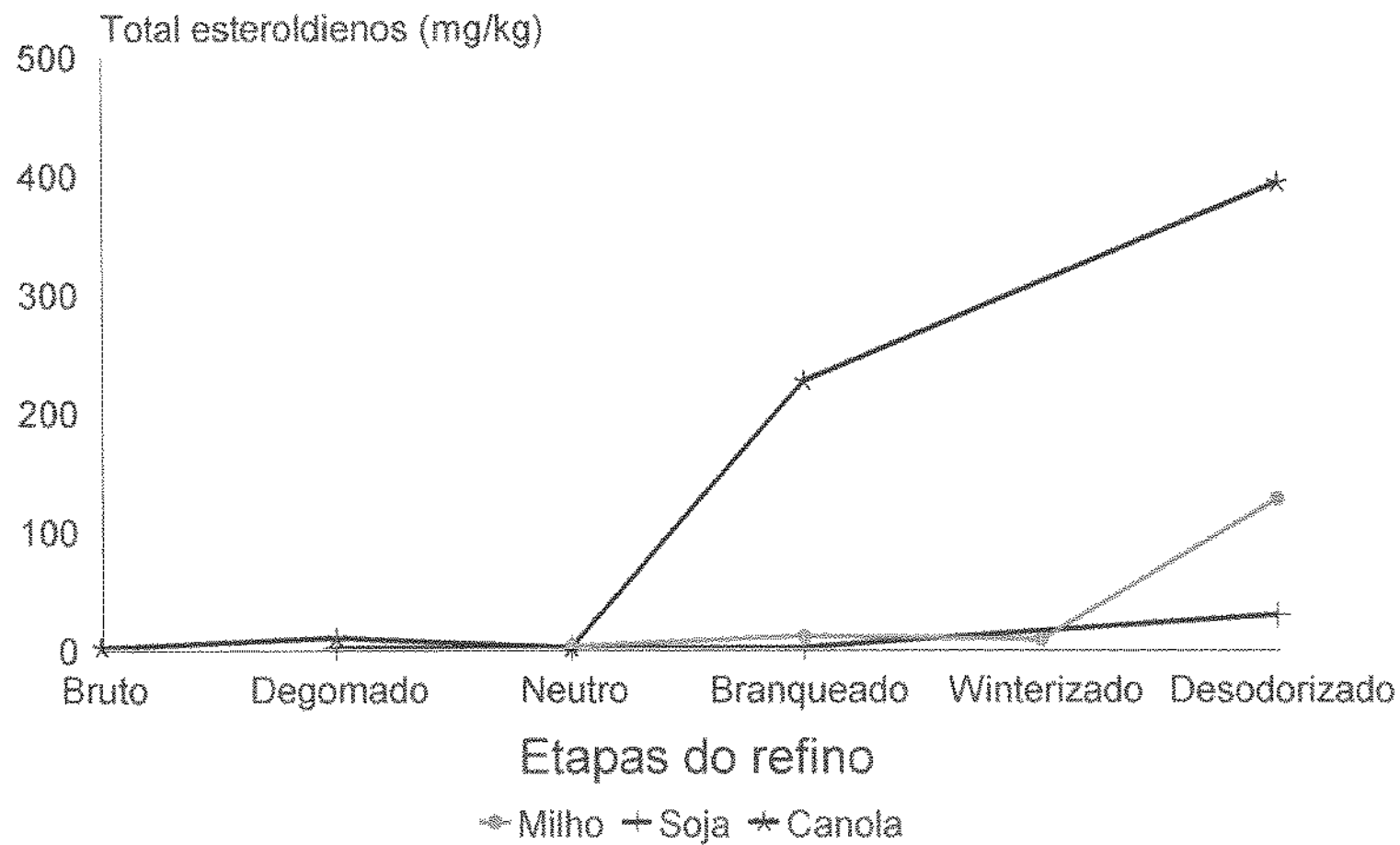


Figura 29. Gráfico da concentração de esteroldienos em etapas do refino de óleos de milho, soja e canola refinados em indústria

A análise do teor de esteroldienos serve para provar que refino foi utilizado em óleo, pois o conteúdo elevado de esteroldienos é consequência do refino.

A análise dos produtos de degradação de esteróis serve usualmente para dois propósitos: 1) para a determinação da concentração destes compostos e reconhecimento se o óleo foi submetido a tratamento térmico 2) a composição dos produtos de desidratação serve para verificar a identidade do produto, em particular, para detectar misturas de óleos refinados em óleos brutos.

A desodorização é normalmente efetuada pela passagem de vapor através do óleo em temperatura de 180-250°C. Durante este processo, os produtos da degradação olefinica são removidos e formados.

Óleo de canola refinado em indústria apresentou após refino o teor mais elevado de esteroldieno dentre as amostras analisadas, com acréscimo marcante após a etapa de clarificação.

As condições mais amenas empregadas no refino de óleos em laboratório promoveram a formação de quantidades menores de esteroldienos.

A adulteração de óleos pode ser detectada através do estudo dos esteróis e seus produtos de degradação olefinicos, como estigmastadieno originário da desidratação do β -sitosterol, estigmastatrieno do estigmasterol, campestadieno do campesterol e campestatrieno do brassicasterol. Estes são parcialmente removidos durante a desodorização e podem ser identificados através de CLAE usando um detector de UV. A presença de campestatrieno indica a presença de óleo de canola. A relação de estigmastadieno (do β -sitosterol) para o campestadieno (do campesterol) serve como um indicador da presença de óleos ricos em campesterol (soja, girassol, milho) em óleos com baixos teores de campesterol (oliva) (GROB et alli, 1994).

4.7. Triacilgliceróis poliméricos

A análise de triacilgliceróis polimerizados através de permeação em gel tem sido descrita por muitos autores (DOBARGANES et alli, 1988; ARROYO et alli, 1992; BELJAARS et alli, 1994). A fração que elui antes do pico dos triacilgliceróis tem sido identificada como o total de material polimerizado, que inclui os compostos dímeros, trímeros e oligoméricos.

O reconhecimento de que lipídios poliméricos podem estar presentes em óleos refinados tem despertado o interesse por métodos para sua determinação.

Recentemente, cromatografia de permeação em gel (GPC) também chamada de cromatografia de exclusão ou cromatografia de filtração tem sido usada como metodologia padrão para a análise de lipídios poliméricos. Este é um importante desenvolvimento, pois a presença destes compostos em óleos comerciais era ignorada no passado (CHRISTIE, 1995).

Cromatogramas obtidos através de cromatografia de permeação em gel dos óleos de milho, soja e canola, brutos e refinados em indústrias podem ser vistos na Figura 30.

O teor de triacilgliceróis poliméricos de óleos de milho, soja e canola brutos e refinados em indústria e em laboratório analisados através de cromatografia de permeação em gel são relacionados nas Tabela 46.

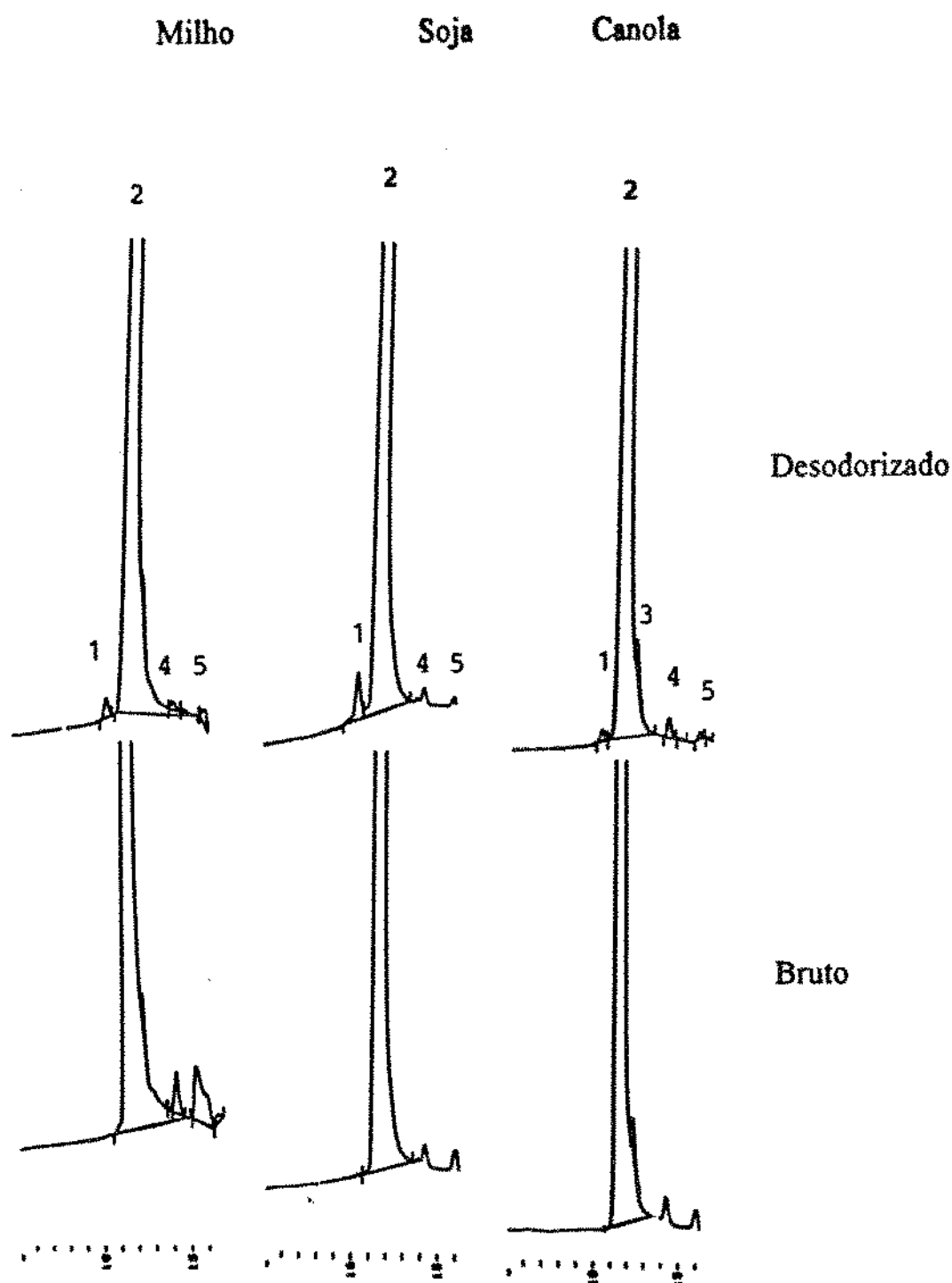


Figura 30. Cromatogramas (GPC) de triacilgliceróis poliméricos presentes em óleos de milho, soja e canola após refino industrial, onde 1 = triacilgliceróis poliméricos; 2 = triacilgliceróis; 3 = diacilgliceróis; 4 = monoacilgliceróis e 5 = ácidos graxos. Condições cromatográficas descritas no texto.

Tabela 46- Concentração (%)de triacilgliceróis poliméricos em amostras de óleos brutos e refinados.

Óleo	Concentração de Triacilgliceróis Poliméricos (%)
Milho bruto solvente laboratório	<0,01
Bruto solvente indústria	<0,01
Bruto prensa laboratório	<0,01
Refinado laboratório	0,5
Refinado indústria	0,5
Soja bruto solvente laboratório	0,1
Solvente indústria	0,1
Refinado laboratório	0,3
Refinado indústria	1,1
Canola bruto solvente laboratório	<0,01
Bruto solvente indústria	<0,01
Bruto prensa laboratório	<0,01
Bruto prensa indústria	<0,01
Refinado laboratório	0.15
Refinado indústria	0,3

O objetivo desta análise foi verificar as modificações produzidas como consequência de todo o processo de refino. É sabido, através de dados de literatura (PÉREZ-CAMINO et alli, 1993), que o aumento no teor de triacilgliceróis poliméricos começa a ser detectado após a etapa de clarificação, e está fundamentalmente relacionado com a temperatura utilizada na fase de desodorização.

Contudo, a quantidade de dímeros de triacilgliceróis não depende somente da temperatura empregada principalmente no processo de desodorização, mas também da qualidade inicial no óleo.

A elevação total no teor de triacilgliceróis poliméricos após refino industrial dos óleos de milho, soja e canola podem ser vistos na Figura 31.

O conteúdo total destes compostos está inversamente relacionado com a qualidade do óleo. A formação de produtos não voláteis de decomposição, devido à oxidação térmica e polimerização dos ácidos graxos insaturados, de uma forma geral o grau de oxidação é considerado como sendo proporcional ao grau de insaturação dos ácidos graxos presentes nas amostras.

Uma pequena quantidade de material polimérico foi encontrado nas amostras, demonstrando que o processamento efetuado não provocou formação de quantidades apreciáveis de sub produtos de oxidação de triacilgliceróis.

Neste estudo a cromatografia de permeação em gel foi aplicada para a análise de compostos minoritários formados durante a autooxidação das amostras. A autooxidação pode ser acompanhada através da medida do teor de polímeros nas amostras. Resultados de trabalhos realizados por outros autores (HOPIA et alli, 1993) indicam que este tipo de análise pode ser empregado para se detectar níveis de autooxidação e caracterizar produtos de diferentes pesos moleculares. Estes compostos são formados durante a autooxidação por meio de reação de lipídios insaturados e oxigênio atmosférico, com aumento na polaridade das moléculas.

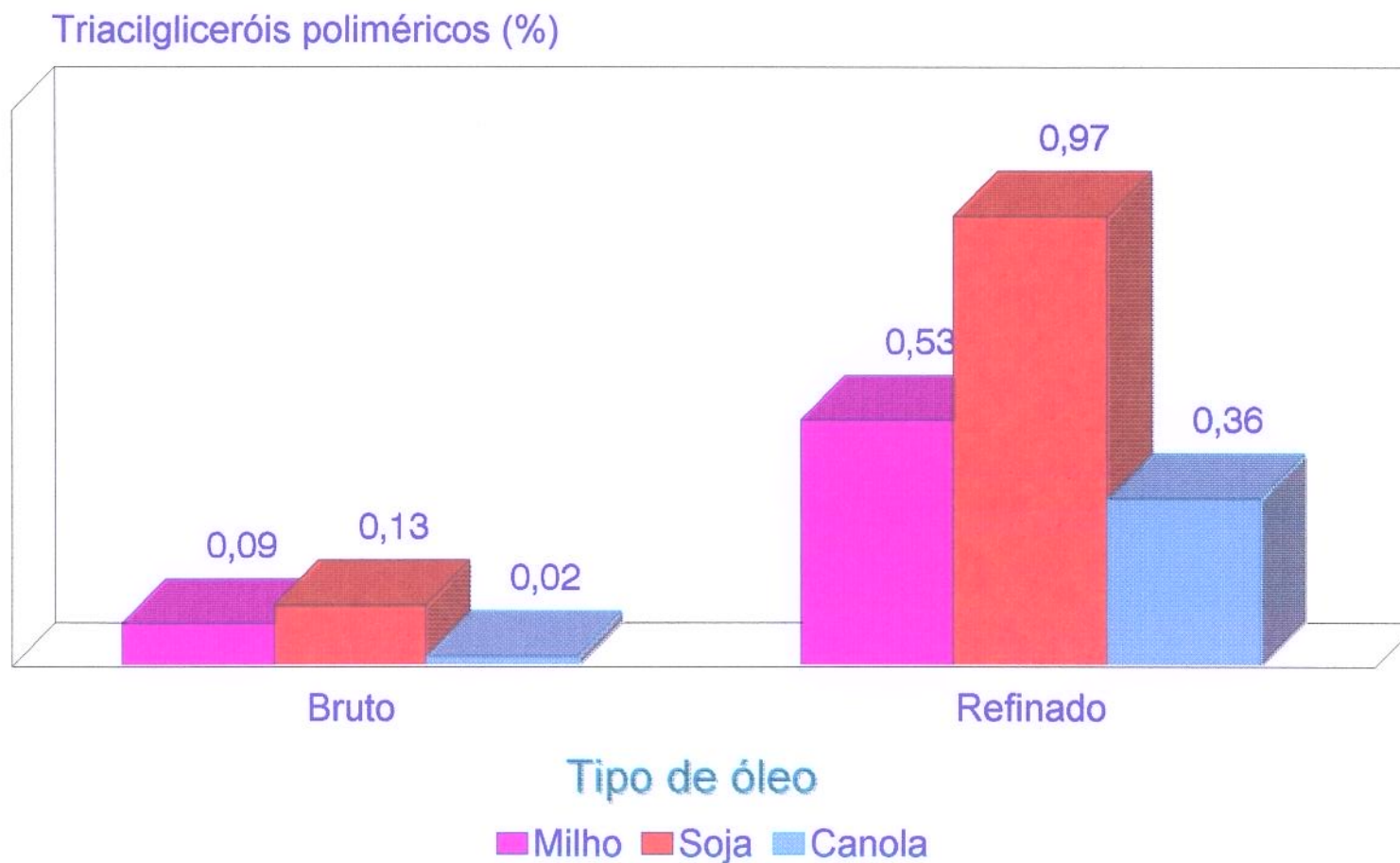


Figura 31. Gráfico da variação do total de triacilgliceróis poliméricos presentes em óleos de milho, soja e canola após refino industrial

4.8. Teor de cobre e ferro

O teor de cobre e ferro, das amostras provenientes de refino industrial, determinados via espectrometria de absorção atômica, expressos em mg/L encontram-se na Tabela 47. Observa-se que no caso dos óleos de milho e soja, os quais possuem elevado teor de ferro no óleo bruto, ocorre durante o processo de refino uma redução neste teor, com posterior elevação após a etapa de desodorização.

Todas as amostras de óleos analisadas apresentaram baixo teor de cobre.

Tabela 47- Teor de cobre e ferro (mg/L) em óleo de milho, soja e canola proveniente de indústria.

Etapa do refino	Óleo de Milho		Óleo de Soja		Óleo de Canola	
	Cobre	Ferro	Cobre	Ferro	Cobre	Ferro
Bruto	≤0,3	3,8	≤0,3	2,1	≤0,3	≤0,3
Degomado	-*	-	≤0,3	≤0,3	≤0,3	3,0
Neutro	≤0,3	≤0,3	≤0,3	≤0,3	≤0,3	2,8
Branqueado	≤0,3	≤0,3	≤0,3	≤0,3	≤0,3	1,1
Winterizado	≤0,3	≤0,3	-	-	-	-
Desodorizado	≤0,3	0,7	≤0,3	1,1	≤0,3	1,1

* - = não parte deste processo

4.9. Teor de clorofila

O teor de clorofila presente nas amostras de óleos de milho, soja e canola refinados em indústrias pode ser visto na Tabela 48.

Tabela 48- Teor de clorofila em óleos proveniente de indústrias

Tipo de óleo	Teor de Clorofila (ppm)
Milho bruto	0,07
Neutro	0,07
Branqueado	0,01
Winterizado	0,01
Desodorizado	0,00
Soja bruto	2,66
Degomado	2,04
Neutro	1,90
Branqueado	1,16
Desodorizado	0,37
Canola bruto	9,87
Degomado	8,22
Neutro	1,57
Branqueado	0,07
Desodorizado	0,02

Verifica-se que a etapa da degomagem tem pouca influência sobre a redução no teor destes pigmentos, os quais são removidos após a clarificação e

desodorização. Observa-se um elevado teor destes pigmentos no óleo bruto de canola, provenientes de grãos imaturos, fato normal nesta matéria-prima, e sua persistência após o refino completo, fato este que pode efetivamente comprometer a qualidade do produto porque pode acelerar o processo oxidativo da amostra.

Observando os dados da Tabela 48 pode-se notar que a clorofila foi praticamente eliminada durante o branqueamento que de maneira geral, com respeito ao teor de clorofila, os óleos tiveram um processo de refino adequado.

4.10. Influência dos processos de interesterificação química e enzimática no teor de esteróis esterificados de óleos de milho, soja e canola

No presente estudo óleo de milho, soja e canola refinados foram submetidos ao processo de interesterificação química, catalisada por metóxido de sódio, e interesterificação enzimática, catalisada por uma lipase imobilizada (Lipozyme) de *Rhizomucor miehei*. Os produtos resultantes foram analisados via lipólise seletiva catalisada por lipase pancreática com a finalidade de se determinar a composição dos grupos acilas na posição sn-2 dos triacilgliceróis. Os resultados, mostrados nas Tabelas de 49 a 51, mostram que a interesterificação química levou, conforme expectativa, à randomização dos grupos acilas, com uma evidente similaridade na composição do total de grupos acilas dos triacilgliceróis na posição sn-2.

Tabela 49- Distribuição percentual dos ácidos graxos em óleo de milho refinado antes e após interesterificação química e enzimática.

Ácido graxo	Total nos triglicerídios	Antes da interesterificação	Após a interesterificação	
			Química	Enzimática
			Posição sn-2	Posição sn-2
			2	
16:0	12,5	1,5	13,0	4,3
18:0	2,3	2,3	2,9	1,5
18:1	34,8	34,0	34,3	34,3
18:2	47,7	61,5	48,4	52,3
18:3	0,9	0,8	0,8	4,9

Tabela 50- Distribuição percentual dos ácidos graxos em óleo de soja refinado antes e após interesterificação química e enzimática.

Ácido graxo	Total nos triglicerídios	Antes da interesterificação	Após a interesterificação	
			Química	Enzimática
			Posição sn-2	Posição sn-2
16:0	11,1	1,9	11,1	5,1
18:0	3,5	0,9	4,1	0,9
18:1	24,7	24,3	25,9	24,9
18:2	51,7	66,7	52,5	64,0
18:3	5,9	5,5	6,3	5,0

Tabela 51- Distribuição percentual dos ácidos graxos em óleo de canola refinado antes e após interesterificação química e enzimática.

Ácido graxo	Total nos triglicerídios	Antes da interesterificação	Após a interesterificação	
			Química	Enzimática
			Posição sn-2	Posição sn-2
16:0	4,5	1,0	6,1	1,1
18:0	2,4	1,4	3,2	nd
18:1	64,1	57,3	63,7	58,2
18:2	17,6	28,4	17,7	29,1
18:3	7,2	11,8	7,6	11,6

Interesterificação enzimática, catalisada por Lipozyme, resultou produtos em que a composição dos grupos acilas na posição sn-2 foi similar à da anterior interesterificação (Tabelas 49 a 51). Estes resultados mostram que durante a interesterificação enzimática pouca alteração ocorreu entre a posição sn-2 e as posições sn-1,3, como esperado pela forte especificidade sn-1,3 da Lipozyme (SCHUCH et alli, 1988).

Pouco é sabido sobre o efeito da interesterificação química e enzimática sobre o conteúdo e a composição dos esteróis esterificados de óleos vegetais. O conteúdo de esteróis esterificados em óleos de milho, soja e canola antes e depois da interesterificação química tanto quanto da enzimática, catalisada por Lipozyme, foi determinada por breve "clean-up" em pequena coluna de sílica gel, seguida de CLAE. Os resultados, registrados na Tabela 52, mostram que a interesterificação química, levou a um aumento no conteúdo de esteróis esterificados em todos os 3 óleos, enquanto que a interesterificação enzimática resultou numa evidente redução no teor de esteróis esterificados. Pode-se

concluir através da análise destes dados que ocorre esterificação química, ao passo que alguma clivagem de esteróis esterificados ocorre durante a interesterificação enzimática, catalisada pela Lipozyme sn-1,3 específica.

Técnicas radioquímicas tem sido usadas no estudo de reações catalisadas por lipases (SCHUCH & MUKHERJEE, 1987; SCHUCH & MUKHERJEE, 1988; SCHUCH & MUKHERJEE, 1989). No presente estudo, a formação de esteróis esterificados durante a interesterificação química e enzimática, foi examinada pelo uso de $[4-^{14}\text{C}]\beta$ -sitosterol como composto radioativo marcado, adicionando-se ao óleo de canola refinado antes da interesterificação, e medindo-se a radioatividade dos esteróis esterificados formados. Os resultados apresentados na Tabela 53 mostram que a interesterificação química do óleo de canola resultou em moderada formação (10% do total da radioatividade) do β -sitosteril éster radioativo, enquanto que a interesterificação enzimática do óleo, catalisada por Lipozyme, levou a pequena formação de β -sitosteril éster radioativo. Estes resultados concordam com os dados da Tabela 52.

Tabela 52- Alterações no conteúdo de esteróis esterificados de óleos vegetais após interesterificação catalisada por metóxido de sódio ou Lipozyme

Catalisador da interesterificação	Tempo (h)	Esteróis esterificados (mg/100g óleo)		
		milho	soja	canola
-	-	911	114	735
Metóxido de sódio	0,5	1094	353	996
Lipozyme	1	774	18	352
Lipozyme	24	677	39	482

Tabela 53- Formação de β -sitosterol radioativo de ácidos graxos após interesterificação de canola catalisada por metóxido de sódio ou lipases na presença de [4- ^{14}C] β -sitosterol

Catalisador da interesterificação	Tempo (h)	Distribuição da Radioatividade		
		Esteróis esterificados	Esteróis	Outros
Controle*	0,5	3	97	traços
Metóxido de sódio	0,5	11	86	3
Controle	2	<1	96	3
Controle	6	<1	96	3
Controle	24	<1	96	3
Lipozyme	2	<1	98	1
Lipozyme	6	<1	97	3
Lipozyme	24	<1	98	1
<i>Candida cylindracea</i>	2	62	35	3
<i>Candida cylindracea</i>	6	80	15	5
<i>Candida cylindracea</i>	24	91	5	4

* Sem catalisador de interesterificação

A formação de esteróis esterificados radioativo de [4-¹⁴C]β-sitosterol como composto radioativo marcado foi também estudada utilizando-se uma lipase não específica preparada a partir de *Candida cylindracea* como catalisador para a interesterificação de óleo de canola. Com a lipase de *Candida cylindracea* como biocatalisador altas proporções (>90% do total da radioatividade) de ¹⁴C-marcado β-sitosterol esterres foram formados durante o curso da reação (Tabela 53), conforme pode-se observar através da Figura 32, que apresenta o teor de radioatividade nas frações de esteróis livres e esterificados medida através do “Liquid Cintillation Counter”. Obviamente, a randomização dos triacilgliceróis causada em ambas as interesterificações química, catalisada por metóxido de sódio, e enzimática, catalisada pela lipase não específica de *Candida cylindracea* resultou em extensiva formação de esteróis esterificados, apesar da pouca formação de esteróis esterificados formada pela interesterificação enzimática, catalisada pela lipase sn-1,3-específica, Lipozyme (Tabela 58). Neste contexto é interessante notar que durante a interesterificação enzimática de manteiga, catalisada por lipase não específica de *Pseudomonas fluorescens*, extensiva formação de colesterol ésteres foi também observada (KALO et alli, 1993).

No presente trabalho ficou evidenciado, juntamente com a observação sobre a manteiga (KALO et alli, 1993), que ambos os catalizadores de interesterificações química e enzimática causam randomização dos triacilgliceróis, e também favorecem a formação de esteróis esterificados durante a interesterificação. A simples e rápida técnica radioquímica descrita aqui pode ser utilizada para identificar lipases com relação à sua habilidade para esterificar esteróis com vistas a modificações dietárias de óleos contendo esteróis.

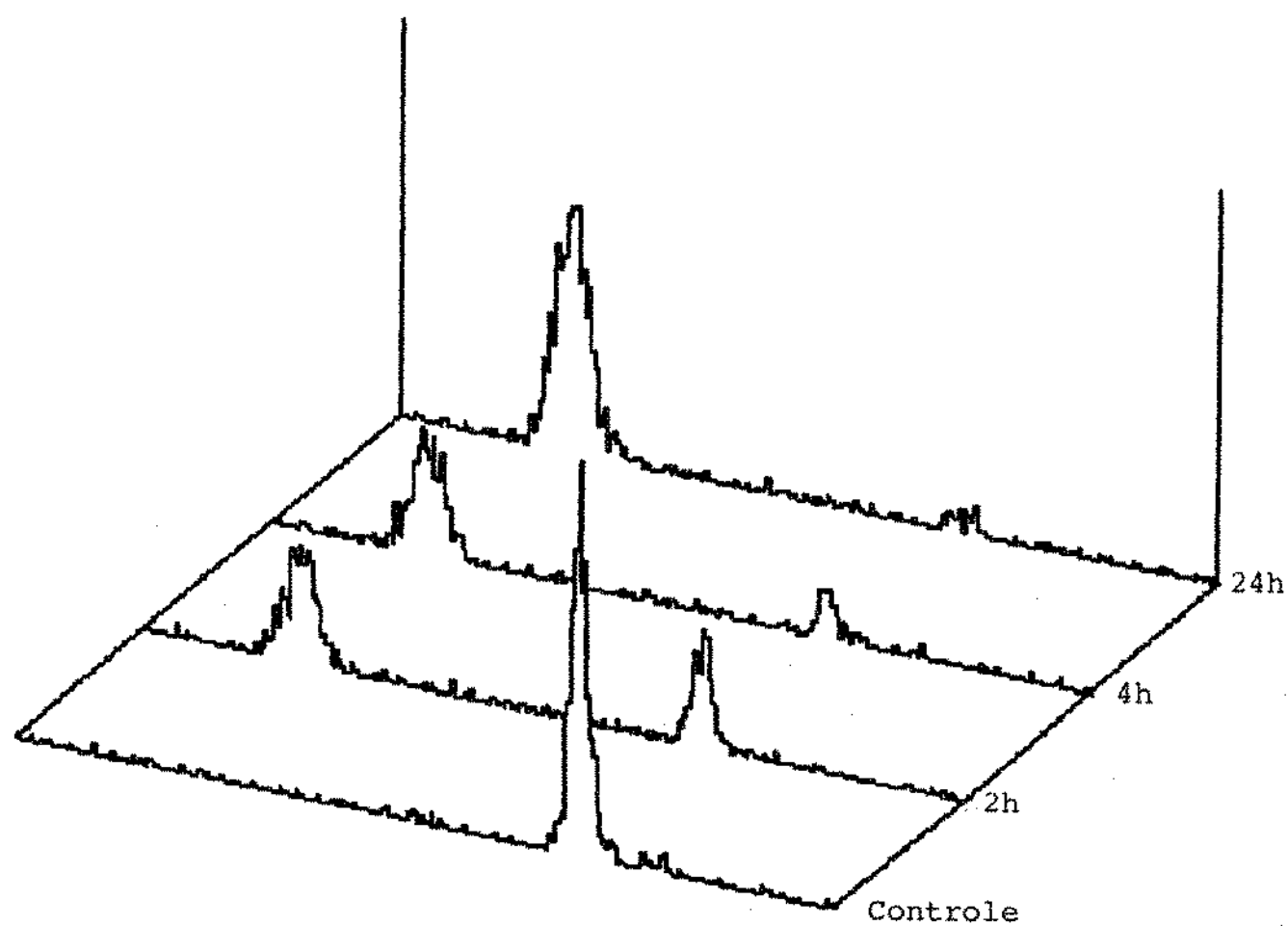


Figura 32. Teor de radioatividade na fração de esteróis e esteróis esterificados do óleo de canola após reação com *Candida cylindracea* medido através de Berthold Radio-CCD Scanner

5. CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos com este trabalho pode-se concluir que:

1- O processo de refino industrial introduz modificações apreciáveis nos compostos minoritários. Ao contrário do refino laboratorial usado, que não promoveu alterações marcantes na composição dos componentes minoritários.

2- Foi comprovado que os óleos vegetais aqui analisados (milho, soja e canola) apresentam características peculiares, e que a análise dos compostos minoritários é de fundamental importância para sua caracterização.

3- Houve um gradual decréscimo, após cada etapa do processo de refino, no teor de tocoferóis e esteróis e ligeiras alterações em suas distribuições relativas. Cada um destes compostos tem uma suscetibilidade diferenciada às etapas do processamento.

4- Não ocorreram alterações significativas no teor total de esteróis esterificados durante as diferentes etapas do processo do refino dos três óleos usados, fato este que sugere que a determinação do perfil cromatográfico dos esteróis esterificados é um parâmetro importante para a caracterização de um óleo e uma poderosa ferramenta no auxílio e detecção de adulteração.

5- A desodorização é a fase do refino químico que deve ser conduzida com grande cuidado e atenção, porque causa maiores perdas de componentes e acréscimo de indesejáveis.

6- A desodorização promoveu as maiores perdas e transformações dos compostos minoritários, e contribuiu para o aumento nos teores de esteroldienos, triacilgliceróis poliméricos e ácidos graxos *trans*.

7- As determinações de tocoferóis, esteróis, esteroldienos, esteróis esterificados e outros compostos minoritários são importantes para a identificação, caracterização e detecção de adulterações de óleos.

8- O processo de interesterificação de óleo de canola catalisado quimicamente com metóxido de sódio aumentou o teor de esteróis esterificados.

9- A reação de interesterificação catalisada pela lipase Lipozyme promoveu a clivagem de parte dos esteróis esterificados.

10- A reação de interesterificação catalisada pela lipase de *Candida cylindracea* elevou a formação de esteróis esterificados, fato de interesse quanto ao valor nutricional.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACKMAN, R.G. GLC: Early developments, practical applications. Inform. Champaign, 5(10):1119-1128, 1994.
2. ALMELA, L.; LÓPEZ-ROCA, J.M.; CANDELA, M.E.; ALCÁZAR, M.D. Separation and determination of individual carotenoids in a *Capsicum* cultivar by normal-phase high-performance liquid chromatography. J. of Chromatography, Amsterdam, 502:95-106, 1990.
3. AMELIO, M.; AMELOTTI, G.; COZZOLI, O.; FARAONE, A.; MARIANI, C.; MATTEI, A.; MARZO, S.; MORCHIO, G.; SERANI, A.; SPINETTI, M.; TISCORNIA, E. Determinazione degli acidi grassi trans insaturi negli oli non idrogenati mediante gascromatografia su colonna capillare. Risultati di una sperimentazione interlaboratorio. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 70(11):561-566, 1993.
4. AOCS. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society, 3. ed. Champaign, 1995 v.1-2.
5. ARENS, M.; FIEBIG, H.J.; HOMBERG, E. Sterine (isolierung und GC-untersuchung)- gemeinschaftsarbeiten der DGF, 114. Mitteilung: Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und Verwandten Stoffen, 86. Mitt.: Analyse von Fettbegleitstoffen VII- Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 92(5): 189-192, 1990.
6. ARROYO, R.; CUESTA, C.; GARRIDO-POLONIO, C.; LÓPEZ-VARELA, S.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J. High-performance size-exclusion chromatographic studies on polar components formed in sunflower oil used for frying. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 69(6): 557-563, 1992.
7. ARTHO, A.; GROB, K.; MARIANI, C. On line LC-GC for the analysis of minor components in edible oils and fats the direct method involving

- silylation. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 95(5): 176-180, 1993.
8. BAGGE, C. Techniques for enhancing quality in edible oil processing. In: PROCEEDINGS OF THE WORLD CONFERENCE ON OILSEED TECHNOLOGY AND UTILIZATION. Proceedings. Champaign, 1992. p.194-198.
 9. BALL, G.F.M. Fat-soluble vitamin assays in food analysis. Elsevier Applied Science, 1988. p. 34-50.
 10. BALZ; M.;SCHULTE; E.; THIER, H.P. Trennung von Tocopherolen und Tocotrienolen durch HPLC. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 94(6):209-213, 1992.
 11. BALZ; M.; SCHULTE; E.; THIER, H.P. Simultaneous determination of α -tocopheryl acetate, tocopherols and tocotrienols by HPLC with fluorescence detection in foods. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 95(3):215-220, 1993
 12. BELJAARS, P.R.; VAN DIJK, R.; HOUWEN-CLAASSEN, A:A.M. Determination of polymerized triglycerides in frying fats and oils by gel permeation chromatography Interlaboratory study. Journal of AOAC International, Arlington, 77(3): 667-671, 1994.
 13. BIEDERMANN, M; GROB, K.; MARIANI, C. Transesterification and on-line LC-GC for determining the sum of free and esterified sterols in edible oils and fats. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 95(4):127-133, 1993.
 14. BILLEK, G. Die veränderungen von nacrungsfetten bei höheren temperaturen. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 94(5): 161-172, 1992.
 15. BOOT, A.J.; SPEER, A.J. Determination of sum of dimer and polymer triglycerides and acid value of used frying fats and oils by near infrared

- reflectance spectroscopy. Journal of AOAC International, Arlington, 77(5):1184-1189, 1994.
16. BURKOW, I.C.; HENDERSON, R.J. Isolation and quantification of polymers from autoxidized fish oils by high-performance size-exclusion chromatography with an evaporative mass detector. Journal of Chromatography, Amsterdam, 552: 501-506, 1991.
17. BURTON, G.W.; INGOLD, K.U. Autoxidation of biological molecules. 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 103:6472-6477, 1981.
18. CHASE, G.W.; AKOH, C.C.; EITENMILLER, R.R. Analysis of tocopherols in vegetable oils by high-performance liquid chromatography: comparison of fluorescence and evaporative light-scattering detection. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 71(8): 877-880, 1994.
19. CHEN, Z.Y.; PELLETIER, G.; HOLLYWOOD, D.; RATNAYAKE, W.M.N. Trans fatty acid isomers in canadian human milk. Lipids, Champaign, 30(1):15-21, 1995
20. CHRISTIE, W.W. Lipid Analysis, 2nd ed., Pergamon Press, Oxford, 1982, pp.156-157.
21. CHRISTIE, W.W. Size exclusion chromatography of lipids in Lipid Technology p.17-18, 1995.
22. CHISTOPOULOU, C.N.; PERKINS, E.G. High performance size exclusion chromatography of monomer, dimer and trimer mixtures. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 66(9): 1338-1343, 1989.
23. CHOBANOV, D. & CHOBANOVA, R. Alterations in glyceride composition during interesterification of mixtures of sunflower oil with lard and tallow. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 54:47-50, 1977.

24. CHOBANOV, D. & TOPALOVA, M.R. Alterations in glyceride composition during direct interesterification of lard. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 56:581-584, 1979.
25. COTTIER, D. & ROSSELL, J.B. Food fats. US Patent 4,208,445, 1980.
26. CUESTA, C.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J.; LÓPEZ-VARELA, S. Dietary effects of sunflower oil containing high levels of polar material on lipemia in rats. Proceedings of the world conference on oilseed technology and utilization. 1992. p.444-447.
27. DASGUPTA, J.; ADHIKARI, S.; CHAKRABARTY, M.M.; BATTACHARYYA, D. Glyceride composition in interesterified fats. Fette, Seifen, Anstrichm., Hamburg, 84:111-4, 1982.
28. DEMARCHI, C. Canola, uma oleaginosa de inverno com excelente perspectiva de mercado. Espuma, São Paulo, (22):19-21, 1993.
29. DOBARGANES, M.C. & MÁRQUEZ-RUIZ, G. In: Advances in lipid methodology - two, pp.113-137, W.W. CHISTIE ed., Oily Press, Dundee, 1993.
30. DOBARGANES, M.C. & PÉREZ-CAMINO, M.C. Non-polar dimer formation during thermoxidation of edible fats. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 89(6): 216-220, 1987
31. DOBARGANES, M.C.; PÉREZ-CAMINO, M.C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. High performance size exclusion chromatography of polar compounds in heated and non-heated fats. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 90(8): 308-311, 1988.
32. EL-SHAMI, S.M.; HASSANEIN, M.M.; MURUI, T.; EL-MALLAH, M.H. Studies on changes in patterns of fatty acids, sterols and tocopherols of oil during seed maturation of oil crops. Part I Sunflower seeds. Grasas y Aceites, Sevilla, 45(4):227-231, 1994.

43. GROB, K.; BIEDERMANN, M.; ARTHO, A.; SCHMID, J.P. LC, GC and MS of sterol dehydration products. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 71(11): 533-538, 1994.
44. GROB, K.; BIEDERMANN, M.; BRONZ, M.; MARIANI, C. Composition of sterol dehydration products in refined olive oil. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 72(2):49-54, 1995.
45. GROB, K.; BRONZ, M. Analytical problems in determining 3,5-stigmastadiene and campestadiene in edible oils. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 71(6): 291-293, 1994.
46. GROB, K.; BRONZ, M. Tolerable concentration of olefinic sterol degradation products in edible fats and oils sold as non-refined. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 96(7): 252-255, 1994.
47. GROB, K.; GIUFFRÉ, A.M.; BIEDERMANN, M.; BRONZ, M. The detection of adulteration with desterolized oils. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 96(9): 341-345, 1994.
48. GROB, K.; GIUFFRÉ, A.M.; LEUZZI, U.; MINCIONE, B. Recognition of adulterated oils by direct analysis of the minor components. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 96(8): 286-290, 1994.
49. GROB, K.; LANFRANCHI, M.; MARIANI, C. Evaluation of olive oils through the fatty alcohols, the sterols and their esters by coupled LC-GC. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 67(10):626-634, 1990.
50. GUHR, G.; GERTZ, C.; WAIBEL, J.; ARENS, M. Bestimmung der polaren anteile in fritierfetten. Fette Seifen Anstrichmittel., Leinfeldn-Echterdingen, 83(10):373-376, 1981.
51. GÜMÜSKESEN, A.S.; ÇAKALOZ, T. Chemical and physical changes in cottonseed oil during deodorization. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 69(4):392-393, 1992.

52. GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L.; PADLEY, F.B. The lipid handbook. 2^oed. Chapman & Hall, London, 1994.
53. GUTFINGER, T.; LETAN, A. Studies of tocopherol dimers from soyabean oil by reaction gas chromatography. Lipids, Champaign, 7(7):483-487, 1972.
54. GUTFINGER, T.; LETAN, A. Tocopherols in several vegetable oils. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse. 52(6):191-194, 1975.
55. GUTIÉRREZ-ROLALES, F.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.; GALLARDO-GUERRERO, L.; GANDUL-ROJAS, B.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M.I. Action of chlorophylls on the stability of virgin olive oil. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 69(9):866-871, 1992.
56. HAMMOND, E. W. Chromatography for analysis of lipids CRC press 109-110, 1993.
57. HASSANIEN, F.R. & MUKHERJEE, K.D. Isolation of lipase from germinating oilseeds for biotechnological processes. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 63:893-897, 1986.
58. HERNÁNDEZ, N.; CODONY, R.; RAFECAS, M.; BOATELLA, J. Contenidos de isómeros trans de los ácidos grasos en productos cárnicos. (I) Embutidos. Grasas y Aceites, Sevilla, 42:143-147, 1991.
59. HOPIA, A.I.; LAMPI, A.M.; PIIRONEN, V.I.; HYVÖNEN, L.E.T.; KOIVISTOINE, N.P.E. Application of high-performance size-exclusion chromatography to study the autoxidation of unsaturated triacylglycerols. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 70(8): 779-784, 1993.
60. HOQ, M.M.; YAMANE, T.; SHIMIZU, S.; FUNADA, T.; ISHIDA, S. Continuous hydrolysis of olive oil by lipase in microporous hydrophobic membrane bioreactor. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 62:1016-1021, 1985.

61. JENSEN, R.G. Characteristics of the lipase from the mold, *Geotrichum candidum*: A review. Lipids, Champaign, 9:149-157, 1977.
62. JOHANSSON, A. & APPELQVIST, L.A. The content and composition of sterols and sterol esters in low erucic rapeseed (*Brassica napus*). Lipids, Champaign, 13:658-665, 1978.
63. JUNG, M.Y.; YOON, S.H.; MIN, D.B. Effects of processing steps on the contents of minor compounds and oxidation of soybean oil. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 66(1): 118-120, 1989.
64. KAIMAL, T.N.B.; LAKSHMINARAYANA, G.; SCHULTE, E.; WEBER, N. Artifacts, contaminants and autoxidation products of edible fats and oils In: Handbook of Chromatography p.203-240, 1993.
65. KALO, P.; RINNE, J.; HUOTARI, H.; ANTILA, M. Changes in the contents of cholesterol and cholesteryl esters occurring during lipase-catalysed interesterification reactions. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 95(2):58-62, 1993.
66. KARLESKIND, A. Manuel des Corps Gras pp.87-113, Paris, 1992.
67. KATES, M. Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. 3 ed. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1982. 363p.
68. KEMENY, T.; WEINBRENNER, Z.; JERANEK, M. Investigation of oxidative stability of vegetable oils during heat treatment. In: World conference on oilseed technology and utilization, Proceeding 1992. p.486-488, 1992.
69. KHOR, H.T.; TAN, N.H.; CHUA, C.L. Lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 63:538-540, 1986.
70. KIDGER, D.P. Compound coatings. US Patent 3,361,568, 1968.
71. KIN, K.H.; KWON, D.Y.; RHEE, J.S. Effects of organic solvents on lipase for fat splitting. Lipids, Champaign, 19:975-977, 1984.

61. JENSEN, R.G. Characteristics of the lipase from the mold, *Geotrichum candidum*: A review. Lipids, Champaign, 9:149-157, 1977.
62. JOHANSSON, A. & APPELQVIST, L.A. The content and composition of sterols and sterol esters in low erucic rapeseed (*Brassica napus*). Lipids, Champaign, 13:658-665, 1978.
63. JUNG, M.Y.; YOON, S.H.; MIN, D.B. Effects of processing steps on the contents of minor compounds and oxidation of soybean oil. J. Am. Oil Chem. Soc., Champaign, 66(1): 118-120, 1989.
64. KAIMAL, T.N.B.; LAKSHMINARAYANA, G.; SCHULTE, E.; WEBER, N. Artifacts, contaminants and autoxidation products of edible fats and oils In: Handbook of Chromatography p.203-240, 1993.
65. KALO, P.; RINNE, J.; HUOTARI, H.; ANTILA, M. Changes in the contents of cholesterol and cholesteryl esters occurring during lipase-catalysed interesterification reactions. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 95(2):58-62, 1993.
66. KARLESKIND, A. Manuel des Corps Gras pp.87-113, Paris, 1992.
67. KATES, M. Techniques of lipidology. Isolation, analysis and identification of lipids. 3 ed. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1982. 363p.
68. KEMENY, T.; WEINBRENNER, Z.; JERANEK, M. Investigation of oxidative stability of vegetable oils during heat treatment. In: World conference on oilseed technology and utilization, Proceeding 1992. p.486-488, 1992.
69. KHOR, H.T.; TAN, N.H.; CHUA, C.L. Lipase-catalyzed hydrolysis of palm oil. J. Am. Oil Chem. Soc., Champaign, 63:538-540, 1986.
70. KIDGER, D.P. Compound coatings. US Patent 3,361,568, 1968.
71. KIN, K.H.; KWON, D.Y.; RHEE, J.S. Effects of organic solvents on lipase for fat splitting. Lipids, Champaign, 19:975-977, 1984.

72. KIRSCHENBAUER, H.G. Fats and oils an outline of their chemistry and technology . London: Chapman & Hall, Ltd., 1960. 169p.
73. KOCHHAR, S.P. Influence of processing on sterols of edible oils. Prog. Lipid Res., Oxford, 22:161-188, 1983.
74. KUKSIS, A.; MYHER, J.J.; MARAI, L.; LITTLE, J.A.; McARTHUR, R.G.; RONCARI, D.A.K. Fatty acid composition of individual plasma sterol esters in phytosterolemia and xanthomatosis. Lipids, Champaign, 21(6):371-377, 1986.
75. KUPRANYCZ, D.B.; AMER, M.A.; BAKER, B.E. Effects of thermal oxidation on the constitution of butterfat, butterfat fractions and certain vegetable oils. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 63(3): 332-337, 1986.
76. LANDERS, R.E. & RATHMANN, D.M. Vegetable oils: Effects of processing, storage and use on nutritional values. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 3:255-259, 1981.
77. LANDER, V.; BOOS, H. Bestimmung von Vitamin A und Vitamin E in Kosmetischen Mitteln. SÖFW-Journal, Augsburg, 120(8):444-449, 1994.
78. LANUZZA, F.; MICALI, G.; CALABRÒ, G. Analisi degli steroli nell' olio di oliva mediante transesterificazione ed accoppiamento on-line HPLC-HRGC. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 72(3):105-109, 1995.
79. LANZÓN, A.; ALBI, T.; GRACIÁN, J. Alteraciones registradas en los componentes alcohólicos del insaponificable del aceite de oliva en el proceso de refinación. Primeros ensayos. Grasas y Aceites, Sevilla, 38(4):203-209, 1987.

80. LANZÓN, A.; CERT, A.; ALBI, T. Detección de la presencia de aceite de oliva refinado en el aceite de oliva virgen. Grasas y Aceites, Sevilla, 40(6): 385-388, 1989.
81. LARSSON, B.K. National food administration, internal report, 1983.
82. LARSSON, B.K.; ERIKSSON, A.T.; CERVENKA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in crude and deodorized vegetable oils. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 64:365-370, 1987.
83. LEONE, A.M.; LIUZZI, V.; LA NOTTE, E.; SANTORO, M. Steroli, metilsteroli e dimetilsteroli di alcuni oli vegetali con particolare riguardo a quelli di oliva. Possibile loro ruolo nella caratterizzazione di alcuni prodotti. Loro variazione nel processo di rettifica. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 61(2): 69-89, 1984.
84. LINFIELD, W.M.; BARAUSKAS, R.A.; SIVIERI, L.; SEROTA, S.; STEVENSON, S.R.W. Enzymatic fat hydrolysis and synthesis. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 61:191-195, 1984.
85. LIST, G.R.; MOUNTS, T.L.; LANSER, A.C.; HOLLOWAY, R.K. Effect of moisture, microwave heating, and live steam treatment on phospholipase D activity in soybeans and soy flakes. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 67(11):867-871, 1990.
86. LONGNAY, G.; LACOSTE, F.; MARLIER, M.; MORDRET, F.; AUGÉ, C.; ROUX, R.; WAGSTAFFE, P.J.; BOENKE, A.; SEVERIN, M. The certification of identity of individual sterols in three BCR oil and fat reference materials by GC-MS. Fat Sci. Technol., Leinfelden-Echterdingen, 95(3): 98-104, 1993.
87. LOZANO, Y.F.; MAYER, C.D.; BANNON, C.; GAYDOU, E.M. Unsaponifiable matter, total sterols and tocopherol contents of avocado oil varieties. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 70(9):837-841, 1993.

88. MACRAE, A.R. Microbial lipases as catalysts for the interesterification of oils and fats. In: RATLEDGE, C.; DAWSON, P.; RATTRAY, J., eds. Biotechnology for the oils and fats industry. American Oil Chemists' Society, Champaign, 1984. p.189-198.
89. MANGOLD, H.K.; KAMMERECK, R.; MALINS, D.C. Thin-layer chromatography as an analytical and preparative tool in lipid radiochemistry. Microchem. J., Symp. Ser., New York, 2:697-714, 1962
90. MARIANI, C.; BELLAN, G.; GROB, K. Sulla complessità della frazione sterolica delle sostanze grasse. Separazione del campesterolo in due epimeri. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 72(3):97-104, 1995.
91. MARIANI, C.; FEDELI, E.; GROB, K. Valutazione dei componenti minori liberi ed esterificati nelle sostanze grasse. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 68(3):233-242, 1991.
92. MARIANI, C.; FEDELI, E.; GROB, K.; BIEDERMANN, M. Individuazione di oli di oliva rettificati trattati con anidride maleica mediante LC-GC on line. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 69(11) 535-539, 1992.
93. MARIANI, C.; VENTURINI, S.; FEDELI, E. Valutazione di idrocarburi di neoformazione e componenti minore liberi ed esterificati nelle varie classi di oli di oliva. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 70(7): 321-327, 1993.
94. MATSUO, T.; SAWAMURA, N.; HASHIDA, W. Method for producing cacao butter substitute. US Patent 4,268,527, 1981.
95. MATSUO, T.; SAWAMURA, N.; HASHIMOTO, Y.; HASHIDA, W. Producing a cacao butter substitute by transesterification of fats and oils. UK Patent Application 2 035 359 A, 1980.

96. MENEGHETTI, O.; AMELOTI, G.; GRIFFINI, A. Identificazione di steroli da oli vegetali grezzi e raffinati mediante gascromatografia-spettrometria di massa in ionizzazione elettronica. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 64(11): 461-468, 1987.
97. MENNIE, D.; MOFFAT, C.F.; MCGILL, A.S. Identification of sterene compounds produced during the processing of edible oils. Journal of High Resolution Chromatography, Heidelberg, 17(12):831-838, 1994.
98. MENSINK, R.P. & KATAN, M.B. Trans monounsaturated fatty acids in nutrition and their impact on serum lipoprotein levels in man. Prog. Lipid Res., Oxford, 32:111-122, 1993.
99. MILLER, L.A.D.; GORDON, M.H. A novel method for the isolation and analysis of sterol esters in edible oils. In: Congress of 2nd EUROLIPID, Münster. Proceedings, 1994. p.28.
100. MORCHIO, G.; DEADREIS, R.; FEDELI, E. Indagine sul contenuto di steroli totali in oli di oliva e sulle variazioni nel ciclo di raffinazione. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 64(5): 185-192, 1987.
101. MORDRET, F.; AJANA, H.; GAUCHET, C. Fractionnement de l'insaponifiable par CLHP isolement de la fraction stérolique. Revue Francaise des Corps Gras, Paris, 31(8-9): 305-310, 1985.
102. MOUNTS, T.L.; ABIDI, S.L.; RENNICK, K.A. HPLC analysis of phospholipids by evaporative laser light-scattering detection. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 69(5):438-442, 1992.
103. MUKATAKA, S.; KOBAYASHI, T.; TAKAHASHI, J. Kinetics of enzymatic hydrolysis of lipids in biphasic organic-aqueous systems. J. Ferment. Technol., Suita, 63:461-466, 1985.
104. MUKHERJEE, K.D. Radioactively labeled lipids. In: MANGOLD, H.K. ed. Lipids, Boca Raton, CRC Press, 1984, v.2. p.233-239.

105. MUKHERJEE, K.D. Lipase-catalyzed reactions for modification of fats and other lipids. Biocatalysis, 3:277, 1990.
106. MUKHERJEE, K.D. & MANGOLD, H.K. Recent developments in the chromatographic analysis and purification of radioactively labelled lipids. J. Labell. Compd., Brussel, 9:779-803, 1974.
107. NOGALA-KATUCKA, M.; GOGOLEWSKI, M.; SWIATKIEWICZ, E. Changes in the composition of tocopherols and fatty acids in postdeodorisation condensates during refining of various oils. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 95(4): 144-147, 1993.
108. OHFUJI, T. & KANEDA, T. Characterization of toxic compound in thermally oxidized oil. Lipids, Champaign, 8(6):353-359, 1973.
109. PÉREZ-CAMINO, M.C.; RUIZ-MÉNDEZ, M.V.; MÁRQUEZ-RUIZ, G.; DOBARGANES, M.C. Aceites de oliva virgenes y refinados: Diferencias en componentes menores glicéricos. Grasas y Aceites, 44(2): 91-96, 1993.
110. PERKINS, E. G.; HENDREN, D.J.; BAUER, J.E.; EL-HAMDY, A.H. High performance reversed phase chromatography of cholesterol and cholesteryl esters of human plasma lipoproteins. Lipids, Champaign, 16(8):609-613, 1981.
111. PFALZGRAF, A.; FRIGG, M.; STEINHART, H.; KIRCHGEBNER, M.; ROTH, F.X. Influence of dietary fat and vitamin E on the lipids in pork meat. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 97(1):13-20, 1995.
112. PONGRACZ, G.; WEISER, H.; MATZINGER, D. Tocopherole antioxidantien der natur. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 97(3):90-104, 1995.

113. POSORSKE, L.H. Industrial-scale application of enzymes to the fats and oil industry. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 61:1758-1760, 1984.
114. PREGNOLATTO, W. Soybean oil in Brazil and Latin America: uses, characteristics and legislation. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 58(3):247-249, 1981.
115. PRZYBYLSKI, R. & ESKIN, N.A.M. Phospholipid composition of canola oils during the early stages of processing as measured by TLC with flame ionization detector. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 68(4):241-245, 1991.
116. RABASCALL, N.H. & RIERA, J.B. Variaciones del contenido en tocoferoles y tocotrienoles durante los procesos de obtención, refinación e hidrogenación de aceites comestibles. Grasas y Aceites. 38(3):145-148, 1987.
117. RAMAMURTHI, S.; McCURDY, A.R. Enzymatic pretreatment of deodorizer distillate for concentration of sterols and tocopherols. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 70(3): 287-295, 1993.
118. RAHMANI, M.; CSALLANY, A.S. Chlorophyll and β -carotene pigments in moroccan virgin olive oils measured by high-performance liquid chromatography. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 68(9):672-674, 1991.
119. ROBERTS, T.R. Radiochromatography. Oxford, Elsevier, 1978. Cap.4, p.45-83.
120. RODERBOURG, H. The hydrocarbons of anhydrous butterfat: influence of technological treatments. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 56: 485-488, 1979.
121. ROZENDAAL, A. In: World Conference on Oilseed Technology and Utilization, Proceedings, Champaign, 1992. p.180-185.

122. SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J.; CUESTA, C.; GARRIDO-POLONIO, C.
Sunflower oil used for frying: combination of column, gas and high-performance size-exclusion chromatography for its evaluation. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 70(3): 235-240, 1993.
123. SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J.; CUESTA, C.; LÓPEZ-VARELA, S.; GARRIDO-POLONIO, C.; ARROYO, R. Evaluation of thermal oxidation rate of sunflower oil using various frying treatments. In: The world conference on oilseed technology and utilization. Proceedings, 1992. p. 448-452.
124. SCHUCH, R. & MUKHERJEE, K.D. Z. Naturforsch. 42c:1285, 1987.
125. SCHUCH, R. & MUKHERJEE, K.D. Rapid radio thin-layer chromatography for assay of lipase-catalyzed esterification and interesterification reactions. J. of Chromatogr., Amsterdam, 450(3):448-451, 1988.
126. SCHUCH, R. & MUKHERJEE, K.D. Interesterification of lipids by sn-1, 3-specific triacylglycerol lipase. In: The World Conference on Biotechnology for the Fats and Oils Industry. Proceedings. Champaign, 1988, p.328-329.
127. SCHUCH, R. & MUKHERJEE, K.D. Appl. Microbiol. Biotechnol. Berlin, 30:332, 1989.
128. SCHULTE, E. In CRC Handbook of Chromatography: Analysis of Lipids, edited by K.D. MUKHERJEE & N. WEBER, CRC Press Inc., Boca Raton, 1993, pp. 139-148.
129. SCHULTE, E. Gelchromatographische bestimmung polymerisierter triglyceride. Fette Seifen Anstrichmittel., Leinfeldn-Echterdingen, 84(5): 178-180, 1982.

130. SCHULTE, E. Determination of edible fat refining by HPLC of $\Delta^3,5$ -steradienes. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 96(4):124-128, 1994.
131. SERANI, A.; PIACENTI, D. Identificazione di idrocarburi di neoformazione negli oli vegetali raffinati per mezzo della GC-MS. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 71(9): 477-480, 1994.
132. SERANI, A.; PIACENTI, D. I fenomeni chimico-fisici che regolano la perdita degli steroli liberi durante la reffinazione degli oli vegetali. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 69(6):311-315, 1992.
133. SINGLETON, J.A. Enrichment of phospholipids from neutral lipids in peanut oil by high-performance liquid chromatography. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 70(6):637-638, 1993.
134. SLEETER, R. T. Effects of processing on quality of soybean oil. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 58(3):239-247, 1981.
135. SLOVER, H.T.; THOMPSON JR, R.H.; MEROLA, G.V. Determination of tocopherols and sterols by capillary gas chromatography. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 60(8): 1524-1528, 1983.
136. SMITH, B.L. Global overview of legislation aimed at control of contaminants and pesticide residues in fats and oils. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 59:901A-902A, 1982.
137. SOONTAG, N.O.V. Fat splitting, esterification, and interesterification. In: SWERN, D., ed. Bailey's industrial oil and fat products. 4.Ed. New York, John Willey & Sons, 1982. V.2. p.127-73.
138. SOYATECH. 95-96 Soya bluebook plus: the anual diretory of the world oilseed industry. Bar Habor, 1996. p.
139. SREENIVASAN, B. Interesterification of fats. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 55:796-805, 1978.

140. SUZUKI, K.; NISHIOKA, A. Behavior of chlorophyll derivatives in canola oil processing. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 70(9):837-841, 1993.
141. SWERN, D. Bailey's industrial oil and fat products. Vol 1 4^{ed}. Wiley-Interscience publication John Wiley & sons, New York
142. TEASDALE, B.F. & HELMEL, G.A. Process for the production of edible fats. US Patent 3,174,868, 1965.
143. THOMAS, A.E., SHAROUN, J.E.; RALSTON, H. Quantitative estimation of isomeric monoglycerides by thin-layer chromatography. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 42:789-792, 1965.
144. TOTANI, N. & MANGOLD, H.K. Microdetermination of ether lipids by the isotopic derivative technique. Mikrochim. Acta, Wien, 1:73-78, 1981.
145. TSUJISAKA, Y.; OKUMURA, S.; IWAI, M. Glyceride synthesis by four kinds of microbial lipase. Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, 489:415-422, 1977.
146. ULBERTH, F.; REICH, H.; KNEIFEL, W. Zur analytik von tocopherolen. Ein methodenvergleich zwischen HPLC und GC. Fat Sci. Technol., Leinfeldn-Echterdingen, 94(2): 51-54, 1992.
147. VENNE, L. Environmental aspects of individual unit processes. In: The World Conference on Oilseed Technology and Utilization. Proceedings. 1992. p. 52-56.
148. WALKING, A.E.; WESSELS, H. Chromatographic separation of polar and nonpolar components of frying fats. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 64(6): 1329-1330, 1981.
149. WIENTZEK, M.; ARTHUR, G.; MAN, R.Y.K.; CHOY, P.C. A sensitive method for the quantitation of lysophosphatidylcholine in canine heart. J. Lipid Res., New York, 26:1166-1169, 1985.

150. WISDOM, R.A.; DUNNILL, P.; LILLY, M.D. Enzymic interesterification of fats: factor influencing the choice of support for immobilized lipase. Enzyme Microb. Technol., Haywards Heath, 6:443-446, 1984.
151. WOLFF, J.P.; MORDRET, F.X.; DIEFFENBACHER, A. Determination of polymerized triglycerides in oils and fats by high performance liquid chromatography. Pure Appl. Chem., Oxford, 63(8):1163-1171, 1991.
152. WOLFF, J.P. Recents progres dans l'analyse des st rols. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 57(4): 173-178, 1980.
153. WOLFF, R.L. Trans-polyunsaturated fatty acids in french edible rapeseed and soybean oils. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 69(2):106-110, 1992.
154. WOLFF, R.L. Cis-trans isomerization of octadecatrienoic acids during heating. Study of pinolenic (cis-5, cis-9, cis-12 18:3) acid geometrical isomers in heated pine seed oil. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 71(10): 1129-1134, 1994.
155. WOOD, R. Biological effects of geometrical and positional isomers of monounsaturated fatty acids in Humans in fatty acids in foods and their health implications edited by Ching Kuang Chow p. 663-688, 1992.
156. WORTHINGTON, R.E.; HITCHCOCK, H.L. A method for the separation of seed oil steryl esters and free sterols: application to peanut and corn oils. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 61(6):1085-1088, 1984.
157. YAMAOKO, M.; TANAKA, A.; KATO, A. Antioxidative activity of tocotrienols. Yukagaku 34:120-122, 1985.
158. YASUDA, K.; PETERSON, R.J.; CHANG, S.S. Identification of volatile flavor compounds developed during storage of deodorized hydrogenated soybean oil. J. Am. Oil. Chem. Soc., Champaign, 52(8):307-311, 1975

159. YOKOZEKI, K.; YAMANAKA, S.; TAKIMANI, K.; HIROSE, Y.; TANAKA, A.; SONOMOTO, K.; FUKUI, S. Application of immobilized lipase to regio-specific interesterification of triglyceride in organic solvent. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., Berlin, 14:1-5, 1982.
160. YOUNG, V. Processing of oils and fats In: Hamilton, R.J. & Bhati, A. Fats and oils: Chemistry and technology. 1980. p.135-165.
161. ZUNIN, P.; BOCCA, A.; TISCORINA, E. Studio dell'influenza del processo di rettificazione sulla composizione della frazione sterolica dell'olio di arachis hipogaea e di soya hispida mediante GC capillare. La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse, Milano, 66(3): 133-137, 1989.