



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

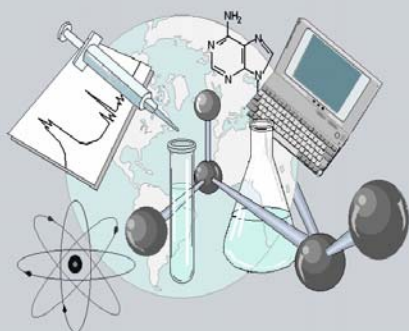
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Análise comparativa entre oito métodos de esterificação na
determinação quantitativa de ácidos graxos em óleo vegetal**

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

CEE



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, NOVEMBRO/2007

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

M644a Milinsk, Maria Cristina
Análise comparativa entre oito métodos de esterificação na determinação quantitativa de ácidos graxos em óleo vegetal / Maria Cristina Milinsk. -
- Maringá : [s.n.], 2007.
xii, 92 f. : il. figs., tabs.

Orientador : Prof. Dr. Nilson Evelázio de Souza.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Química, 2007.

1. Esterificação. 2. Ácidos graxos - Química. 3. Ésteres metílicos de ácidos graxos. 4. Cromatografia gasosa. 5. Ácidos graxos - Quantificação. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Química. II. Título.

CDD 21.ed. 547.24

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

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

**ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OITO MÉTODOS DE
ESTERIFICAÇÃO NA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE
ÁCIDOS GRAXOS EM ÓLEO VEGETAL**

Tese apresentada por
Maria Cristina Milinsk ao Programa
de Pós-Graduação em Química do
Departamento de Química do Centro
de Ciências Exatas da Universidade
Estadual de Maringá como parte dos
requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Nilson Evelázio de Souza

MARINGÁ, NOVEMBRO/2007



*Dedico este trabalho a alguém ainda tão
pequenino, mas que já é a razão de toda a
minha vida e o maior incentivo para
finalizar mais esta jornada, ao Marcos
Vincius.*

Os sujeitos de qualidades extraordinárias dependem do tempo em que vivemos. Nem todos tiveram a época que mereciam e muitos que tiveram não souberam aproveitá-la.

Alguns merecem tempos melhores, pois nem tudo o que é bom triunfa sempre. Todas as coisas têm suas estações e até os valores estão sujeitos à moda. Mas o sábio tem uma vantagem: é eterno. Se este não é seu século, muitos outros serão.

Não existe ninguém que não possa ser mestre de alguém em alguma coisa, e não há quem exceda quem excede. O sábio estima a todos, pois reconhece o que há de bom em cada um e sabe como custa fazer algo bem feito.

Baltasar Gracián

AGRADECIMENTOS

À Deus, razão de todas as coisas e a luz que nos faz vencer diante dos obstáculos.
Aos pais, Cândido (*in memoriam*) e Ariana, meus exemplos de vida e razão por hoje estar aqui.

Aos meus irmãos e sobrinhos, pelo apoio, incentivo e por todos os momentos de convívio e descontração.

Ao Departamento de Química, em especial ao Programa de Pós-graduação, pela oportunidade.

A CAPES e a Fundação Araucária pela concessão de bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. Nilson Evelázio de Souza, pelo privilégio de sua orientação, meu exemplo de determinação e perseverança para alcançar objetivos na vida.

Ao Prof. Dr. Jesuí Virgílio Visentainer, pelos conhecimentos compartilhados.

A Prof^a. Dra. Helena Shizuko Nakatani pela amizade e auxílio durante todo o trabalho.

Ao Prof. Dr. Willian Ferreira da Costa pela amizade e sugestões no trabalho.

Ao Prof. Dr. Makoto Matsushita e a Prof^a. Dra. Sandra pela amizade e pelo empréstimo de livros.

Ao técnico Dirceu Batista pela amizade, convivência e auxílio na operação do cromatógrafo.

Ao técnico Ariovaldo pela amizade e incentivo diante das dificuldades.

Aos técnicos André e Airton pela paciência e prestatividade diante de tantos empréstimos de materiais e reagentes.

Aos amigos que já concluíram esta etapa: Roseli, Flávia, Walber, Clayton e Adriana pela amizade, oportunidade do convívio e pelo conhecimento compartilhado neste período.

As amigas que se iniciaram no convívio do laboratório que sem dúvida sentirei saudades: Ailey, Juliana, Elton, Ricardo, Paula, Rúbia, Vanessa, Ivane e Julliana.

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

RESUMO

Na análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa é necessário a aplicação de procedimentos de esterificação, onde os ácidos graxos são convertidos em compostos mais voláteis, como os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG). Os métodos de esterificação normalmente são subdivididos em duas categorias: catálise ácida e catálise básica, sendo os reagentes mais usados na catálise ácida o ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico (H₂SO₄) e trifluoreto de boro (BF₃) em metanol, e na catálise básica, hidróxido de sódio (NaOH) ou potássio (KOH) em metanol e metóxido de sódio (NaOCH₃) em metanol. Devido à possibilidade de obter diferentes resultados para concentração de ácidos graxos para a mesma amostra, em função do método de esterificação utilizado, o objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de 8 diferentes métodos de esterificação envolvendo catálise ácida e básica na determinação quantitativa de EMAG em cinco óleos vegetais (soja, canola, linhaça, azeite de oliva e de dendê). Os métodos analisados foram de catálise ácida descritos por: Metcalfe *et al.*, 1966 (MET); Bannon *et al.*, 1982a (BAN); Joseph e Ackman, 1992 (JAC); Hartman e Lago, 1973 (HLA); Jham *et al.*, 1982 (JHA) e de catálise básica, ISO 5509, 1978 (ISO); Bannon *et al.*, 1982b (BBA) e Schuchardt e Lopes, 1988 (SLO). Os resultados mostraram a eficiência dos métodos de esterificação para os principais ácidos graxos saturados (C16:0 e C18:0) presentes nos óleos vegetais analisados. Os métodos MET e BAN apresentaram resultados semelhantes e inferiores quando comparado com os outros métodos para os ésteres metílicos insaturados possivelmente devido ao tempo de aquecimento empregado na esterificação. O método SLO também apresentou valores de concentração menor para os ésteres metílicos insaturados, isto pode ter ocorrido por impedimento estérico devido ao tamanho da molécula do catalisador e as distorções na cadeia dos ácidos graxos insaturados e pelo tempo de aquecimento empregado no método. Entre os principais ácidos graxos insaturados presentes nos óleos analisados, os métodos JHA e HLA apresentaram valores de concentração inferiores para o oleato de metila (C18:1n-9) e linoleato de metila (C18:2n-6), respectivamente. No entanto, deve ser considerado que estes métodos utilizam reagentes de baixo custo, menor toxicidade e de maior disponibilidade quando comparado aos métodos que empregam BF₃. Os métodos mais eficientes para a esterificação dos ácidos graxos insaturados nos óleos analisados foram: JAC, ISO e BBA. Entretanto, o reagente BF₃ em metanol usado

no método JAC é extremamente tóxico, apresenta custo elevado e tempo de vida útil limitado. Assim, quando o óleo a ser analisado apresentar baixo índice de acidez os métodos de catálise básica ISO que utiliza NaOH em metanol e BBA (NaOCH_3 em metanol) podem ser usados ao invés do método JAC por usarem reagentes de menor custo e toxicidade. Os resultados obtidos mostraram que o método a ser escolhido para análise de ácidos graxos depende também da composição do óleo a ser estudado.

Palavras-chave: Esterificação, Ésteres metílicos de ácidos graxos, cromatografia gasosa.

ABSTRACT

To perform the analysis of fatty acids through gas chromatography, it is necessary to apply esterification procedures in which fatty acids are converted into more volatile compounds, such as the fatty acids methyl esters (FAME). Esterification methods are usually subdivided into two categories: acid catalysis and base catalysis. In acid catalysis, the reagents mostly used are the hydrochloric acid (HCl), the sulfuric acid (H₂SO₄) and boron trifluoride (BF₃) in methanol; whereas the ones used in base catalysis are the sodium hydroxide (NaOH) or potassium (KOH) in methanol, and sodium methoxide (NaOCH₃) in methanol. Due to the possibility of obtaining different results regarding the concentration of fatty acids for the same sample, in function of the esterification method used, the efficiency of 8 different esterification methods that involve acid and base catalysis, in the quantitative determination of FAME, was verified in five vegetable oils (soybean, canola, flaxseed, olive and palm oil). The methods of acid catalysis analyzed were described by Metcalfe *et al.*, 1966 (MET); Bannon *et al.*, 1982a (BAN); Joseph and Ackman, 1992 (JAC); Hartman and Lago, 1973 (HLA); whereas the base catalysis methods analyzed were Jham *et al.*, 1982 (JHA); ISO 5509, 1978 (ISO); Bannon *et al.*, 1982b (BBA) and Schuchardt and Lopes, 1988 (SLO). Results showed the efficiency of the esterification methods for the main saturated fatty acids (C16:0 and C18:0) that were present in the vegetable oils analyzed. MET and BAN methods presented close results, though inferior, when compared to other methods for the unsaturated fatty acids, possibly due to the heating up period used in esterification. The SLO method has also presented inferior concentration values for the unsaturated fatty acids. That may have occurred due to the molecule size of the catalytic unit and by distortions in the chain of unsaturated fatty acids, as well as by the heating time used in the method. Among the main unsaturated fatty acids, which were present in the oils analyzed, JHA and HLA methods presented inferior concentration values for methyl oleate and methyl linoleate, respectively. However, it should be taken into consideration that those methods use reagents with low cost, lower toxicity but larger availability, if compared to methods that use BF₃. The most efficient methods for esterification of unsaturated fatty acids in the oils analyzed were JAC, ISO and BBA.

Nevertheless, the BF_3 reagent in methanol, used in JAC method, is extremely toxic, besides presenting high cost and limited useful life. Thus, when the oil to be analyzed presents low acidity, the method of base catalysis ISO, which uses NaOH in methanol and BBA (NaOCH_3 in methanol) can be used to substitute JAC method, once they use reagents presenting lower toxicity and lower cost. Results obtained showed that the method to be chosen for performing the analysis of fatty acids depend also on the composition of the oil to be studied.

Key-words: Esterification; Fatty Acids Methyl Esters; Gas Chromatography

LISTA DE ABREVIATURAS

EMAG - ésteres metílicos de ácidos graxos
CG – cromatografia gasosa
CCD – cromatografia de camada delgada
CLAE – cromatografia líquida de alta eficiência
TG – triacilgliceróis
AG – ácidos graxos
AGS – ácidos graxos saturados
AGI - ácidos graxos insaturados
AGMI - ácidos graxos monoinsaturados
AGPI - ácidos graxos polinsaturados
AGL - ácidos graxos livres
HCl - ácido clorídrico
H₂SO₄ - ácido sulfúrico
BF₃ - trifluoreto de boro
NaOH - hidróxido de sódio
KOH - hidróxido de potássio
NaOCH₃ - metóxido de sódio
MeOH ou CH₃OH - metanol
MET – método descrito por Metcalfe *et al.*, 1966
BAN - método descrito por Bannon *et al.*, 1982a
JAC - método descrito por Joseph e Ackman, 1992
HLA - método descrito por Hartman e Lago, 1973
JHA - método descrito por Jham *et al.*, 1982
ISO - método descrito pela ISO 5509, 1978
BBA - método descrito por Bannon *et al.*, 1982b
SLO - método descrito por Schuchardt e Lopes, 1988

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Molécula de um triacilglicerol.....	3
Figura 2. Estrutura de alguns ácidos graxos.....	4
Figura 3. Mecanismo de reação de transesterificação de um triacilglicerol com metanol na presença de hidróxido de sódio.....	16
Figura 4. Reação de hidrólise: saponificação.....	17
Figura 5. Utilização de metóxido de sódio como catalisador.....	17
Figura 6. Mecanismo de reação de transesterificação de um triacilglicerol com metanol na presença de catalisador ácido.....	18
Figura 7. Mecanismo de reação de esterificação de um ácido graxo com metanol na presença de catalisador ácido.....	19
Figura 8. Mecanismo de reação de hidrólise por ácido.....	19
Figura 9. Cromatograma representativo dos EMAG presentes no azeite de dendê obtido pelo método JAC.....	39
Figura 10. Cromatograma representativo dos EMAG presentes no azeite de oliva obtido pelo método ISO.....	42
Figura 11. Cromatograma representativo dos EMAG presentes no óleo de soja obtido pelo método ISO.....	45
Figura 12. Cromatograma representativo dos EMAG presentes no óleo de canola obtido pelo método ISO.....	48
Figura 13. Cromatograma representativo dos EMAG presentes no óleo de linhaça obtido pelo método ISO.....	51
Figura 14. Concentração de palmitato de metila (C16:0) obtida por diferentes métodos de esterificação para os diversos óleos vegetais analisados.....	52
Figura 15. Concentração de estearato de metila (C18:0) obtida por diferentes métodos de esterificação para os diversos óleos vegetais analisados.....	53
Figura 16. Concentração de oleato de metila (C18:1n-9) obtida por diferentes métodos de esterificação para os diversos óleos vegetais analisados.....	54

Figura 17. Concentração de linoleato de metila (C18:2n-6) obtida por diferentes métodos de esterificação para os diversos óleos vegetais analisados.....	55
Figura 18. Concentração de α - linolenato de metila (C18:3n-3) obtida por diferentes métodos de esterificação para os diversos óleos vegetais analisados.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos principais ácidos graxos em alguns óleos e gorduras.....	5
Tabela 2. Distribuição posicional de ácidos graxos na molécula de glicerol em alguns óleos vegetais.....	5
Tabela 3. Métodos de esterificação selecionados.....	25
Tabela 4. Índice de acidez determinado nos óleos vegetais analisados.....	35
Tabela 5. Valores de fator resposta em relação ao tricosanoato de metila...	36
Tabela 6. Concentração dos ésteres metílicos de ácidos graxos (mg/g de óleo) obtidos do azeite de dendê empregando diferentes métodos de esterificação.....	38
Tabela 7. Concentração dos ésteres metílicos de ácidos graxos (mg/g de óleo) obtidos do azeite de oliva empregando diferentes métodos de esterificação.....	41
Tabela 8. Concentração dos ésteres metílicos de ácidos graxos (mg/g de óleo) obtidos do óleo de soja empregando diferentes métodos de esterificação.....	44
Tabela 9. Concentração dos ésteres metílicos de ácidos graxos (mg/g de óleo) obtidos do óleo de canola empregando diferentes métodos de esterificação.....	47
Tabela 10. Concentração dos ésteres metílicos de ácidos graxos (mg/g de óleo) obtidos do óleo de linhaça empregando diferentes métodos de esterificação.....	50
Tabela 11. Recuperação relativa do padrão tripalmitina (TG 16:0) adicionado no óleo de canola e submetido à aplicação dos diferentes métodos de esterificação.....	57
Tabela 12. Recuperação relativa do padrão triestearina (TG 18:0) adicionado no óleo de canola e submetido à aplicação dos diferentes métodos de esterificação.....	58
Tabela 13. Recuperação relativa do padrão trioleína (TG 18:1n-9)	

adicionado no óleo de linhaça e submetido à aplicação dos diferentes métodos de esterificação.....	58
Tabela 14. Recuperação relativa do padrão trilinoleína (TG 18:2n-6) adicionado no azeite de oliva e submetido à aplicação dos diferentes métodos de esterificação.....	59
Tabela 15. Recuperação relativa do padrão trilinolenina (TG 18:3n-3) adicionado no azeite de oliva e submetido à aplicação dos diferentes métodos de esterificação.....	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Características Gerais dos Óleos e Gorduras.....	3
2.1.a. Óleos Vegetais com Diferentes Composições em Ácidos Graxos.....	6
2.2. Preparação de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos para Análise em Cromatografia Gasosa.....	7
2.2.1. Catálise Básica.....	8
2.2.1.a. Reagentes de Catálise Básica.....	9
2.2.2. Catálise Ácida.....	11
2.2.2.a. Reagentes de Catálise Ácida.....	11
2.2.3. Mecanismos de Reação de Transesterificação e Esterificação.....	15
2.2.3.a. Mecanismo de Reação Envolvido na Transesterificação por Catálise Básica.....	15
2.2.3.b. Mecanismo de Reação Envolvido na Transesterificação e Esterificação por Catálise Ácida.....	17
2.2.4. Influência dos Reagentes de Esterificação.....	20
2.2.5. Análise por Cromatografia Gasosa dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos.....	20
3. OBJETIVOS	23
4. MATERIAIS e MÉTODOS	24
4.1. Amostragem.....	24
4.2. Reagentes.....	24
4.3. Determinação do Índice de Acidez.....	24
4.4. Métodos Seleccionados para Preparação dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (EMAG).....	25
4.4.1. Método de Esterificação de Catálise Ácida empregando Trifluoreto de Boro em Metanol.....	26
4.4.1.a. Método descrito por Metcalfe <i>et al.</i> , 1966 (MET).....	26
4.4.1.b. Método descrito por Bannon <i>et al.</i> , 1982 (BAN).....	26
4.4.1.c. Método descrito por Joseph e Ackman, 1992 (JAC).....	26
4.4.2. Método de Esterificação de Catálise Ácida empregando Ácido	

Sulfúrico em Metanol.....	27
4.4.2.a. Método descrito por Hartman e Lago, 1973 (HLA).....	27
4.4.3. Método de Esterificação de Catálise Ácida empregando Ácido Clorídrico em Metanol.....	28
4.4.3.a. Método descrito por Jham <i>et al.</i> , 1982. (JHA).....	28
4.4.4. Método de Esterificação de Catálise Básica empregando Hidróxido de Sódio em Metanol.....	28
4.4.4.a. Método 5509 descrito pela ISO, 1978 (ISO).....	28
4.4.5. Método de Esterificação de Catálise Básica empregando Metóxido de Sódio em Metanol.....	28
4.4.5.a. Método descrito por Bannon <i>et al.</i> , 1982 (BBA).....	28
4.4.6. Método de Esterificação de Catálise Básica empregando Tetrametilguanidina em Metanol.....	29
4.4.6.a. Método descrito por Schuchardt e Lopes, 1988 (SLO).....	29
4.5. Análise Cromatográfica dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos.....	29
4.6. Identificação dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos.....	30
4.7. Avaliação da Resposta do Detector de Ionização de Chama.....	31
4.8. Análise Quantitativa dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos.....	31
4.9. Limites de Quantificação e Detecção.....	32
4.10. Teste de Adição e Recuperação.....	33
4.11. Análise Estatística.....	34
5. RESULTADOS e DISCUSSÃO.....	35
5.1. Determinação do Índice de Acidez dos Óleos Vegetais.....	35
5.2. Identificação e Quantificação dos EMAG presentes nos Óleos Vegetais.....	35
5.3. Análise Comparativa da Concentração dos EMAG (mg/g de óleo) obtidos por Diferentes Métodos de Esterificação aplicados ao Azeite de Dendê.....	37
5.4. Análise Comparativa da Concentração dos EMAG (mg/g de óleo) obtidos por Diferentes Métodos de Esterificação aplicados ao Azeite de Oliva.....	39

5.5. Análise Comparativa da Concentração dos EMAG (mg/g de óleo) obtidos por Diferentes Métodos de Esterificação aplicados ao Óleo de Soja.....	42
5.6. Análise Comparativa da Concentração dos EMAG (mg/g de óleo) obtidos por Diferentes Métodos de Esterificação aplicados ao Óleo de Canola.....	45
5.7. Análise Comparativa da Concentração dos EMAG (mg/g de óleo) obtidos por Diferentes Métodos de Esterificação aplicados ao Óleo Linhaça.....	49
5.8. Análise da Influência dos Diferentes Métodos de Esterificação sobre os principais EMAG Saturados (C16:0 e C18:0) presentes nos diversos Óleos Vegetais Analisados.....	51
5.9. Análise da Influência dos Diferentes Métodos de Esterificação sobre os principais EMAG Insaturados (C18:1n-9, C18:2n-6 e C18:3n-3) presentes nos diversos Óleos Vegetais Analisados.....	53
5.10. Análise da Influência dos Diferentes Métodos de Esterificação sobre os principais EMAG analisados através do Teste de Adição e Recuperação.....	57
6. CONCLUSÕES	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS	62
Anexos	72

1. INTRODUÇÃO

O avanço da cromatografia gasosa (CG) fez prosperar o estudo dos lipídios, possibilitando conhecer a composição completa em ácidos graxos dos lipídios em um curto espaço de tempo. Para realizar a análise de ácidos graxos é comumente aplicado procedimentos de esterificação, onde os ácidos graxos são convertidos em compostos mais voláteis, como os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG).

Diversas pesquisas foram dedicadas a estudar procedimentos de esterificação, com o objetivo de encontrar um método eficiente para a obtenção de ésteres metílicos de ácidos graxos. Contudo, o avanço da cromatografia gasosa com o uso de colunas capilares e de softwares teve grande impacto no estudo dos ácidos graxos, devido à facilidade em efetuar a separação, identificação e a quantificação dos EMAG com uma maior eficiência (Joseph e Ackman, 1992; Tvrzická *et al.*, 2002).

Esses avanços possibilitaram uma investigação mais aprimorada dos procedimentos de esterificação, por exemplo, efetuar a quantificação dos ácidos graxos com o uso de padrão interno. Sob esse aspecto, existem poucos trabalhos que fazem comparação entre os métodos de esterificação.

Os métodos de esterificação descritos na literatura são em grande parte para obtenção de ésteres metílicos de ácidos graxos e por esse motivo são os derivados mais utilizados. Os métodos de esterificação normalmente são subdivididos em duas categorias: os de catálise ácida e os de catálise básica.

Os reagentes mais usados para esterificação por catálise ácida são ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico (H₂SO₄) e trifluoreto de boro (BF₃) em metanol. Todos são usados para esterificação de acilgliceróis e de ácidos graxos livres. No entanto, nenhum desses procedimentos ocorre à temperatura ambiente. Dentre esses métodos o BF₃ em metanol tem sido amplamente usado para esterificação, porém é extremamente tóxico.

Entre os reagentes mais comuns usados para esterificação de ácidos graxos empregando catálise básica estão hidróxido de sódio (NaOH) ou potássio (KOH) em metanol e metóxido de sódio (NaOCH₃) em metanol. Os métodos de esterificação empregando estes reagentes são rápidos e pode ser realizado a temperatura ambiente. Uma desvantagem, porém, é que estes

reagentes não convertem ácidos graxos livres em ésteres metílicos de ácidos graxos (Bannon, *et al.*, 1982b; Gutnikov, 1995).

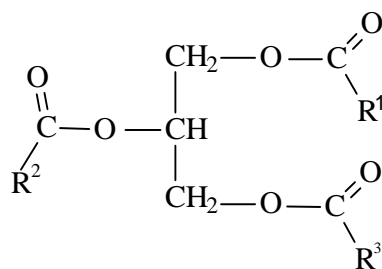
No entanto, esses procedimentos podem afetar diretamente os resultados quantitativos devido a vários fatores como: conversão incompleta dos lipídios a EMAG, mudança na composição dos ácidos graxos durante a esterificação, formação de artefatos que podem ser erroneamente identificados como ácidos graxos, contaminação da coluna cromatográfica com traços do reagente de esterificação, extração incompleta de EMAG ou ainda, perda de ésteres metílicos de cadeia curta e muito volátil (Shanta e Napolitano, 1992; Brondz, 2002).

Este trabalho aborda uma breve revisão bibliográfica sobre os métodos de esterificação comumente usados e citados na literatura, os mecanismos de reações de esterificação; descreve o uso da cromatografia gasosa e a quantificação por uso de padrão interno. A parte experimental refere-se à aplicação de diferentes métodos de esterificação em cinco óleos vegetais (soja, canola, linhaça, azeite de oliva e de dendê), diferindo em sua composição a concentração de ácidos graxos. Aborda ainda a quantificação dos EMAG com o uso de padrão interno a fim de avaliar de modo comparativo a eficiência dos métodos de esterificação investigados e a confirmação da exatidão desses procedimentos através do teste de adição e recuperação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características Gerais dos Óleos e Gorduras

Quimicamente, óleos e gorduras (animal e vegetal) consistem de moléculas de triacilgliceróis (TG), as quais são constituídas de três moléculas de ácidos graxos (AG) de cadeia longa ligados na forma de ésteres a uma molécula de glicerol (Figura 1) (Geris *et al.*, 2007).



onde: R¹, R² e R³ são unidades de ácidos graxos

Figura 1. Molécula de um triacilglicerol.

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeia curta (dois a quatro átomos de carbono), média (seis a dez átomos de carbono) ou longa (acima de doze átomos de carbono), podem conter insaturações na cadeia sendo classificados como: saturados (AGS) (não possuem insaturações) e insaturados (AGI) quando apresentam uma insaturação (monoinsaturado, AGMI) ou mais (polinsaturados, AGPI) como mostrado na Figura 2, a estrutura do ácido esteárico (a), e dos ácidos graxos insaturados: oléico (b), linoléico (c) e α - linolênico (d). Os ácidos graxos também podem apresentar ramificações na forma iso ou anteiso (Christie, 1989; Fennema, 1996).

Ácidos graxos saturados se encontram em uma conformação linear, flexível em estado de menor energia quando comparado com os ácidos graxos insaturados, que apresentam dobramentos na cadeia carbônica e uma angulação de 30 graus para cada dupla ligação presente. Este fato permite uma maior interação entre as moléculas de AGS (consequentemente, apresentam maior ponto de fusão), do que entre as moléculas de AGI, que

devido à presença de duplas ligações, apresenta interações intermoleculares menos eficientes (Curi *et al.*, 2002).

As insaturações na cadeia carbônica dos ácidos graxos podem levar a ocorrência de isomeria na configuração *cis* ou *trans* (De Souza e Visentainer, 2006). A ocorrência de insaturação na configuração *trans* promove um aumento na linearidade da cadeia carbônica favorecendo a ocorrência de interações intermoleculares, tornando as propriedades físicas destes compostos semelhantes a dos AGS (Christie, 1989). Mesmo sendo do ponto de vista energético desfavorável, no reino animal e vegetal é predominante a ocorrência de insaturações na configuração *cis* (Sommerfeld, 1983). Este fato pode ser compreendido quando se considera que os ácidos graxos são constituintes das membranas das células.

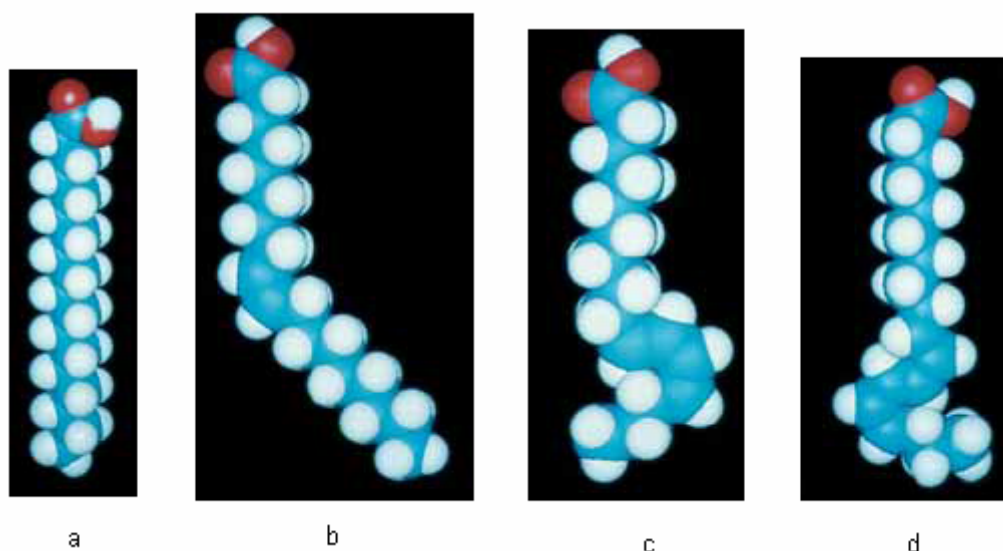


Figura 2. Estrutura de alguns ácidos graxos. (a) ácido esteárico (C18:0); (b) ácido oléico (C18:1n-9); (c) ácido linoléico (C18:2n-6); (d) ácido α - linolênico (C18:3n-3). (Fonte: Christie, 1989)

A distribuição dos ácidos graxos nos óleos vegetais varia de forma considerável como mostrado na Tabela 1. Os ácidos graxos mais comuns são os que apresentam 12, 14, 16 ou 18 átomos de carbono na cadeia (López *et al.*, 2005).

Tabela 1. Distribuição dos principais ácidos graxos em alguns óleos e gorduras.

Óleo ou Gordura	Composição em ácidos graxos (%)					
	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1n-9	C18:2n-6	C18:3n-3
Algodão	1,5	22	5	19	50	-
Girassol	-	3,6 – 6,5	1,3 - 3	14 - 43	44 - 68	-
Linhaça	-	6	4	13 - 37	2 - 23	26 - 58
Palma *	-	42	4	42	10	-
Oliva	1,3	7 - 16	1,4 - 3,3	64 - 84	4 - 15	-
Soja	-	2,3 - 11	2,4 - 6	23,5 - 31	49 – 51,5	2 – 10,5

Fonte: *Goodrum, 2002; Rinaldi *et al.*, 2007.

A distribuição dos ácidos graxos pode variar dentro do mesmo tipo de óleo vegetal devido ao tipo de matéria-prima, características de cada safra e ainda entre as posições na molécula do triacilglicerol.

Os ácidos graxos podem ocupar diferentes posições (*sn-1*, *sn-2* e *sn-3*) no triacilglicerol o que implica em uma grande variedade de triacilgliceróis nos óleos vegetais, uma vez que os ácidos graxos ligados ao glicerol podem ser todos iguais (como o tripalmitato do óleo de palma) ou diferentes como mostrado na Tabela 2 (Solomons e Fryhle, 2002; Coultate, 2004, Christie, 2005).

Tabela 2. Distribuição posicional de ácidos graxos na molécula de glicerol em alguns óleos vegetais.

Óleo	Posição	Ácidos Graxos (% mol)					
		C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C ₂₀ – C ₂₄
*Canola	1	4	2	23	11	6	53
	2	1	-	37	36	20	6
	3	4	3	17	4	3	70
Soja	1	14	6	23	48	9	-
	2	1	-	22	70	7	-
	3	13	6	28	45	9	-
Linhaça	1	10	6	15	16	53	-
	2	2	1	16	21	60	-
	3	6	4	17	13	59	-
Oliva	1	13	3	72	10	1	-
	2	1	-	83	14	1	-
	3	17	4	74	5	-	-

*Óleo de canola com alto teor de ácido erúico. (Fonte: Christie, 2005)

Os dados da Tabela 2 foram obtidos envolvendo hidrólise com lipase pancreática na posição *sn-2*. Estes mostram que os ácidos graxos insaturados nos óleos vegetais ocupam preferencialmente a posição *sn-2*, enquanto os AGS estão concentrados nas posições primárias (*sn-1* e *sn-3*) (Christie, 2005).

Esta preferência dos AGI pela posição *sn*-2 também foi descrito por Coleman (1961), Vanderwal (1964) e estudado por Brockerhoff (1965), que desenvolveu um método para análise da composição em ácidos graxos das três posições de um triacilglicerol utilizando também lipase pancreática.

O ponto de fusão dos triacilgliceróis depende da quantidade de insaturações de seus ácidos graxos. Assim, são denominados óleos quando se encontra na forma líquida a temperatura ambiente devido à presença de AGI e são sólidos quando predomina os AGS (Akok e Min, 1998).

Os óleos vegetais em seu estado natural, além dos triacilgliceróis, podem conter ainda em sua composição, pequenas quantidades de ácidos graxos livres (AGL), fosfolipídios, esteróis e tocoferóis (López *et al.*, 2005; Rinaldi *et al.*, 2007). Essas substâncias são capazes de alterar sua cor, sabor e aroma. Para remover estas substâncias, os óleos brutos são submetidos ao processo de refino, que geralmente inclui etapas de degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização (Nawar, 1996).

No emprego dessas etapas há o uso de aquecimento com temperaturas elevadas, o que pode levar ao aumento dos níveis de ácidos graxos *trans* (AGT) presentes nos óleos vegetais refinados como relatado por Martin (2006), Martin *et al.*, (2007a e 2007b) e observado através da análise por cromatografia gasosa.

2.1.a. Óleos Vegetais com Diferentes Composições em Ácidos Graxos

No Brasil, há um elevado consumo de óleo de soja devido a sua produtividade, e vem aumentando gradativamente o consumo de óleos de diferentes oleoginosas como: canola, girassol, oliva e linhaça, fato atribuído às características desses óleos como alimentos funcionais.

Além do desenvolvimento econômico promovido pelo plantio da soja, várias pesquisas têm demonstrado seus benefícios para a saúde humana e no controle dos níveis de colesterol no sangue (Turatti *et al.*, 2002).

O termo azeite é utilizado para óleos extraídos de frutos, assim como o azeite de dendê e de oliva (Moretto *et al.*, 2002).

O azeite extraído do fruto da oliveira apresenta em média 22% de óleo (Boskou, 1996) e é considerado uma boa fonte de ácidos graxos monoinsaturados por ser rico em ácido oléico (C18:1n-9), o qual é um agente importante para redução dos níveis de colesterol. Além disso, o consumo de azeite de oliva tem sido muito divulgado por nutricionistas devido ao alto nível de antioxidantes naturais (Turatti *et al.*, 2002).

O azeite de oliva pode ser comercializado em diferentes graus de acidez, variando desde 0,7% (proveniente da primeira extração) até ao azeite composto por azeite refinado enriquecido por azeite virgem (Turatti *et al.*, 2002).

O azeite de dendê é considerado fonte de vitamina A, sendo elevado o teor de carotenóides (responsáveis pela coloração característica do óleo). Este apresenta em sua composição cerca de 50% de ácidos graxos saturados, 40% de monoinsaturados e o restante de polinsaturados (Moretti, 1999).

No processo tradicional de refino do azeite de dendê, empregam-se temperaturas elevadas, que destroem os carotenóides presentes no óleo. Para evitar que isto ocorra, o processo de obtenção do azeite de dendê sofreu várias mudanças como o uso temperaturas menores e vácuo no processo de refino a fim de preservar os carotenóides presentes na sua composição (Moretti, 1999).

O óleo de linhaça bruto pode apresentar em sua composição cerca de 85% de AGI, correspondendo a 62% de ácido α - linolênico e 17% de linoléico (Lino, 2000). A linhaça tem sido muito utilizada em misturas de cereais matinais, pães, bolos entre outros devido à presença de ácidos graxos ômega-3. O óleo de linhaça pode ainda ser encontrado na forma de cápsulas para uso medicinal, obtido por prensagem a frio (Turatti *et al.*, 2002).

2.2. Preparação de Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos para Análise em Cromatografia Gasosa

A técnica mais utilizada para análise do perfil em ácidos graxos dos lipídios é a cromatografia gasosa (CG) (Lima e Abdalla, 2002). Os ácidos graxos são encontrados nos alimentos como triacilgliceróis e em menor quantidade como ácidos graxos livres, sendo necessário convertê-los em

substâncias com maior volatilidade a fim de reduzir a adsorção de solutos no suporte e superfície da coluna e melhorar a separação dos compostos (Drozd, 1975; Gutnikov, 1995).

Os métodos de derivatização mais comuns usados para análise em CG envolvem a transesterificação dos acilgliceróis e a esterificação dos ácidos graxos livres a ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG). Este processo de conversão também pode ser chamado de metilação (Shanta e Napolitano, 1992; Brondz, 2002; Meier *et al.*, 2006).

O termo transesterificação é utilizado na literatura quando o método envolve uma catálise ácida ou básica, pois há uma dupla troca de acilgliceróis em ésteres de ácidos graxos (éster-éster). O termo esterificação é empregado na literatura quando o método envolve uma catálise ácida, por promover a reação entre os AGL com álcoois gerando ésteres de ácidos graxos (Filip *et al.*, 1992; Morrison e Boyd, 1996). Neste trabalho, o termo esterificação será adotado para a conversão tanto de acilgliceróis como de ácidos graxos livres em ésteres de ácidos graxos.

Existe na literatura uma grande variedade de métodos de esterificação que se dividem em duas categorias: reagentes de catálise ácida e de catálise básica, que serão abordados a seguir.

O desenvolvimento de diferentes métodos utilizando catalisadores ácidos ou básicos para a reação de esterificação de ácidos graxos, possibilita escolher aquele que melhor se enquadra ao tipo de amostra em que se deseja trabalhar, como também aos recursos disponíveis de cada laboratório. Para isso tornam-se necessário conhecer a respeito dos tipos de catalisadores, as reações, o tempo envolvido e as possíveis perdas para propiciar uma avaliação coerente dos resultados obtidos.

2.2.1. Catálise Básica

Os reagentes mais comuns usados para transesterificação de acilgliceróis empregando catálise básica são hidróxido de sódio (NaOH) ou potássio (KOH) em metanol e metóxido de sódio (NaOCH₃) em metanol (Cetinkaya e Karaosmanoglu, 2004). Os métodos de transesterificação

empregando estes reagentes são rápidos e podem ser realizados a temperatura ambiente, em um intervalo curto de tempo. Uma desvantagem, porém, é que estes reagentes não convertem ácidos graxos livres em ésteres metílicos de ácidos graxos devido à reação de saponificação (Bannon, *et al.*, 1982b; Gutnikov, 1995). Logo, sua aplicação se torna limitada quando o óleo a ser transesterificado apresentar alta acidez.

Na literatura existe uma variedade de métodos envolvendo estes reagentes para transesterificação e se tornaram mais usados com o avanço das pesquisas de biodiesel por serem reagentes de baixo custo e por apresentarem bons rendimentos (Dorado *et al.*, 2004a; Lotero *et al.*, 2005; Meher *et al.*, 2006b; Rinaldi *et al.*, 2007).

2.2.1.a. Reagentes de Catálise Básica

Entre os métodos de transesterificação que utilizam metóxido de sódio, a concentração deste reagente pode variar de 0,25 a 2 mol/L em metanol (Christie, 1993; Jeyashoke *et al.*, 1998).

Este reagente pode ser preparado pela dissolução do sódio metálico em metanol anidro, o que requer extremo cuidado, uma vez que esta reação é extremamente exotérmica. Este apresenta boa estabilidade durante meses, mas pode se deteriorar com a precipitação de sal de bicarbonato pela reação com dióxido de carbono da atmosfera, que pode ser um interferente na análise por cromatografia gasosa (Christie, 1993).

Os métodos que empregam hidróxido de potássio (ou sódio) em concentração similar, também têm sido muito utilizados devido à facilidade no preparo e ao custo relativamente menor quando comparado com o metóxido (Vicente *et al.*, 2004; Xie *et al.*, 2006).

A reação de transesterificação de óleos vegetais utilizando catálise básica corresponde a uma reação de equilíbrio onde a cinética é regida pelo princípio de Le Chatelier. Logo, o rendimento da reação dependerá do deslocamento do equilíbrio químico a favor dos ésteres formados, através do emprego de um excesso estequiométrico do agente de transesterificação (álcool) e também da otimização de outros fatores como: temperatura de

reação, concentração do catalisador, agitação do meio reacional, remoção da água presente nos reagentes, solubilização dos triacilgliceróis em solvente como heptano e utilização de metóxido no lugar de hidróxido de sódio (Toyama *et al.*, 1933; Glass, 1971; Ramos *et al.*, 2003).

Dados da literatura mostram que os estudos utilizando catálise básica foram realizados antes do que a aplicação da catálise ácida. Pardee and Reid (1920), demonstraram em um estudo as ocorrências das reações de transesterificação e saponificação, bem como a perda no rendimento da reação de transesterificação por hidróxido de potássio em etanol na presença de 5 % de água.

Bannon *et al.* (1982b), estudaram o uso de metóxido de sódio e de hidróxido de potássio e verificaram que o uso de metóxido leva a um maior rendimento, pois não resulta em saponificação. Com base neste estudo Bannon *et al.*, propuseram um método utilizando metóxido de sódio, entretanto, não recomendam o uso para determinação de ácidos graxos de cadeia curta.

Outro método proposto utilizando metóxido de sódio foi desenvolvido por Christie (1982) sem o uso de aquecimento e realizado em apenas cinco minutos. Cita ainda, o uso de dietil éter para solubilização dos lipídios polares a fim de melhorar o rendimento da reação.

Na presença de ácidos graxos livres (AGL), o uso de hidróxidos se torna limitado devido à formação de sabão, comprometendo a análise e o rendimento da reação (Bannon *et al.*, 1982b). Bondioli (2004) relatou que o aumento da temperatura também pode interferir no rendimento da reação assim como a presença de água.

Segundo Meher *et al.* (2006a), a presença de 0,6% de AGL pode diminuir o rendimento da reação utilizando hidróxidos. Dorado *et al.* (2004b) descreveram um estudo onde foram avaliados vários óleos vegetais com níveis de até 2,8% de AGL, utilizando catálise básica para transesterificação, e os resultados obtidos foram satisfatórios. No entanto, recomenda-se o uso de catálise ácida para transesterificação de óleos vegetais quando o teor de ácidos graxos livres exceder 1% (Freedman *et al.*, 1984; Lotero *et al.*, 2005; Zheng *et al.*, 2006).

O reagente guanidina e seus derivados alquilados em metanol também são usados para converter óleos e gorduras em ésteres metílicos. Estes

reagentes convertem tanto acilgliceróis como ácidos graxos livres em ésteres metílicos de ácidos graxos. Os ácidos graxos livres formam sais carboxilatos de guanidina, que na presença de excesso de metanol forma os ésteres metílicos. No entanto, o excesso de reagente deve ser extraído antes da injeção da amostra no cromatógrafo gasoso (Schuchardt e Lopes, 1988; Shanta e Napolitano, 1992; Schuchardt *et al.*, 1996; Rosenfeld, 2002).

Nos últimos anos tem se dado maior atenção para o uso de catalisadores básicos devido ao avanço nas pesquisas de biodiesel (Dorado *et al.*, 2004a; Dorado *et al.*, 2004b; Cetinkaya e Karaosmanoglu, 2004; Meher *et al.*, 2006b). O emprego destes catalisadores se deve às características destes reagentes quando comparado com os catalisadores ácidos como, serem menos corrosivos e apresentarem menor custo (Schuchardt *et al.*, 1998; Lotero *et al.*, 2005).

2.2.2. Catálise Ácida

Dentro dos métodos envolvendo catálise ácida, os reagentes mais empregados são trifluoreto de boro em metanol (BF_3/MeOH), ácido clorídrico em metanol (HCl/MeOH) e ácido sulfúrico em metanol ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$). Estes reagentes são utilizados, tanto para transesterificação de acilgliceróis como para esterificação de ácidos graxos livres (Metcalf e Wang, 1981).

Na literatura existe uma variedade de metodologias envolvendo estes reagentes, em procedimentos utilizando uma única etapa, como também procedimentos em duas etapas (descritos como etapa de saponificação seguido de esterificação) e o uso de aquecimento.

2.2.2.a. Reagentes de Catálise Ácida

Entre os métodos que utilizam ácido clorídrico em metanol para a reação de esterificação, podemos encontrar métodos empregando HCl em metanol anidro, onde a preparação mais comum desse reagente, ocorre pelo bombeamento do gás HCl anidro em metanol anidro. No entanto, além dos

cuidados necessários para a preparação deste reagente, este apresenta instabilidade durante o armazenamento à temperatura ambiente (Kishimoto e Radin, 1965).

Stoffel *et al.* (1959) propuseram um método de esterificação com HCl em metanol anidro empregando sublimação, onde os EMAGs foram isolados do meio reacional para evitar a contaminação para posterior análise cromatográfica como metodologia capaz de substituir os métodos que empregavam diazometano (reagente tóxico e explosivo).

Os pré-requisitos exigidos para execução deste método consistem na ausência de água e acidez média, pois a capacidade de doação de elétrons do oxigênio da água é maior que o oxigênio do metanol impedindo a formação dos ésteres metílicos. Além disso, o uso de benzeno como solvente para solubilizar os triacilgliceróis se torna um ponto crítico para o método uma vez que este solvente é tóxico e carcinogênico (Vorbeck *et al.*, 1961).

A aplicação de resina de troca iônica para esterificação de ácidos graxos também foi proposta, no entanto, este método apresenta vários inconvenientes como a preparação da resina, manipulação excessiva da amostra, condição isenta de água (Hornstein *et al.*, 1960), além de ter apresentado perdas de ésteres metílicos de baixo peso molecular quando comparado com outros métodos (Vorbeck *et al.*, 1961).

O uso de procedimentos empregando HCl em metanol anidro tem sido pouco utilizado devido à necessidade de condições rigorosas. O uso de HCl em metanol aquoso foi adotado por vários pesquisadores e os resultados obtidos foram muito satisfatórios.

Em 1982, Jham *et al.*, propuseram um método usando HCl em metanol aquoso como reagente esterificante. O método consiste de uma etapa de hidrólise com KOH (0,5 mol/L) em metanol seguido por esterificação (ambos sob aquecimento a 100 °C). Quando comparado os resultados com os obtidos por métodos que empregam BF₃ em metanol nenhuma diferença significativa foi observada.

Algumas classes lipídicas não se solubilizam na presença apenas de HCl em metanol como, por exemplo, os triacilgliceróis, logo deve ser adicionado juntamente um solvente para solubilizá-los antes de proceder a reação. Em princípio, o benzeno foi muito aplicado, no entanto, devido a sua

toxicidade este foi sendo gradativamente substituído por outros solventes como clorofórmio (Christie, 1993).

A metodologia proposta por Rogozinski em 1964(a) utiliza para a esterificação dos ácidos graxos, o reagente ácido sulfúrico em metanol (10%) e aquecimento. Este método utiliza H_2SO_4/CH_3OH em excesso (10% v/v) para garantir que a reação seja completada. Contudo, este método não pode ser recomendado para metilação de ácidos graxos polinsaturados devido ao poder oxidante do ácido sulfúrico.

Posteriormente, no mesmo ano Rogozinski (1964b) modificou seu método (usando 25% de H_2SO_4 em Metanol v/v) descrevendo como vantagens a rapidez do método e o uso de um reagente que não requer preparação ou estocagem.

Hartman e Lago (1973) propuseram um método empregando duas etapas (saponificação – esterificação). Na etapa de esterificação utiliza-se o reagente preparado pela mistura de cloreto de amônio-ácido sulfúrico-metanol. O uso de cloreto de amônio segundo os autores aumenta a eficiência do reagente e reduz efeitos drásticos, pois há um equilíbrio entre o ácido sulfúrico (ou metil hidrogênio sulfato) e o ácido clorídrico formado.

O uso de baixas temperaturas (-65 °C) também foi usado para metilação de ácidos graxos empregando H_2SO_4 em metanol diretamente em materiais biológicos sem prévia extração dos lipídios (Dugan Jr. *et al.*, 1966).

O reagente BF_3/CH_3OH (em concentrações de 12-14% m/v) tem sido o mais aplicado a todas as classes lipídicas para esterificação de ácidos graxos (Ackman, 1998).

Este é um reagente muito tóxico, caro e sensível à umidade. O BF_3 é o mais eletropolar dos haletos de boro e é extremamente reativo, e na presença de metanol pode ser excelente para promover metilação de lipídios de modo similar ao HCl/CH_3OH e ácido sulfúrico em metanol com adição das vantagens conferidas pela eletropolaridade extrema do BF_3 (Morrison e Smith, 1964).

Morrison e Smith (1964) realizaram um estudo para determinar as condições necessárias para conversão de várias classes lipídicas em ésteres metílicos com BF_3/CH_3OH . O uso de BF_3 em metanol foi estudado com detalhes principalmente com relação ao aspecto reacional e à decomposição a ácido bórico e do fluoreto de hidrogênio.

Em 1961, Metcalfe e Schmitz propuseram o primeiro método para preparação de EMAG a partir de AGL em um curto período de tempo (2 minutos) empregando $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (12%). Segundo os estudos realizados por Morrison e Smith (1964) este método seria adequado apenas para amostras com alta concentração de ácidos graxos livres.

O método proposto por Metcalfe *et al.* (1966), para esterificação de óleos e gorduras utilizaram uma etapa de saponificação seguida de esterificação sob aquecimento com $\text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ por apenas dois minutos a fim de garantir a esterificação tanto de AGL como de acilgliceróis.

Em pesquisas com trihaletos em metanol para metilação de uma variedade de classes lipídicas, há uma preocupação sobre a possível perda de ácidos insaturados com ou sem a formação de artefatos; foram investigados os efeitos do tempo do reagente de metilação, temperatura e tempo de reação, tempo reacional na recuperação de ácidos graxos insaturados e formação de artefatos (Klopfenstein, 1971). Vários pesquisadores mencionaram o aparecimento de artefatos usando BF_3 em metanol.

Fulk e Shorb (1970) descreveram a formação de artefatos quando o ácido oléico estava presente e foi tratado com BF_3 em metanol. Os autores sugeriram que a formação de artefato seria em função do tempo de reação a $100\text{ }^\circ\text{C}$ e/ou o lote ou a idade do reagente ou ambos.

Lough *et al.* (1964) mostraram que BF_3 em metanol pode causar sérias perdas de ésteres instaurados e que o ácido oléico produz isômeros em alto rendimento. Este relato foi contrário à experiência geral e pode ter ocorrido devido ao uso de altas concentrações de BF_3 (50% m/v).

Segundo Klopfenstein, (1971) em condições extremas ($120\text{ }^\circ\text{C}$ por 90 minutos) não foi observado a formação de artefatos como descrito por Fulk e Shorb (1970). No entanto, de acordo com o cromatograma apresentado os ésteres metilados em tubos com tampa de teflon continham um grande número de produtos estranhos. Isso pode ter ocorrido devido ao mau vedamento dos tubos deixando ocorrer perdas de metanol que com o tempo faz aumentar a concentração de BF_3 .

Por isso, deve ser enfatizado que se um tubo de metilação vazar durante o aquecimento haverá um aumento na concentração de BF_3 devido à perda do metanol e a destruição dos ácidos graxos polinsaturados pode ser significativa.

Sendo incorreto afirmar que somente o tempo de armazenamento do reagente é responsável pela formação de artefatos como descrito.

2.2.3. Mecanismos de Reação de Transesterificação e Esterificação

O termo transesterificação refere-se à reação onde um éster (triacilglicerol) é convertido em outro éster pela troca do resíduo alcoxila. Esta reação é reversível e ocorre pela mistura dos reagentes, no entanto, a presença de um catalisador (ácido ou básico) acelera e contribui para aumentar o rendimento da reação (Geris *et al.*, 2007). Nesta reação têm-se como intermediários de reação os diacilgliceróis e os monoacilgliceróis.

Para que a reação de transesterificação seja completa é necessário uma proporção molar de 3:1 de álcool por triacilglicerol, entretanto, devido ao caráter reversível da reação, adiciona-se em excesso o álcool (agente transesterificante) para um bom rendimento da reação (Meher *et al.*, 2006a).

A reação de esterificação ocorre quando se tem ácidos graxos livres na presença de álcool para formar ésteres através da reação de condensação (Solomons e Fryhle, 2002). Estas reações são catalisadas por ácidos e devido ao caráter reversível da reação, também pode ser adicionado em excesso o álcool para garantir um melhor rendimento da reação.

Entre os álcoois, o metanol tem sido o mais utilizado para as reações de transesterificação e esterificação nos procedimentos descritos na literatura devido às suas vantagens físico-químicas como dissolver com maior facilidade o catalisador básico e reagir mais rapidamente com os triacilgliceróis (Bannon *et al.* 1982b, Darnoko e Cherian, 2000; Barnwal e Sharma, 2005).

2.2.3.a. Mecanismo de Reação Envolvido na Transesterificação por Catálise Básica

As etapas envolvidas na reação de transesterificação de triacilgliceróis catalisada por base (hidróxido de sódio) são apresentadas na Figura 3.

A primeira etapa ocorre pela reação entre a base (NaOH) e o metanol produzindo alcóxido e água (Etapa 1). O ataque nucleofílico do íon alcóxido se dá no carbono carbonílico deficiente em elétrons da molécula do triacilglicerol, resultando na formação de um intermediário tetraédrico. O rompimento da ligação entre carbono e oxigênio deste intermediário leva ao produto, éster metílico (Etapa 2) e ao diacilglicerol formado após a remoção do átomo de hidrogênio do metanol (Etapa 3), para formar o íon metóxido e permitir a continuidade do processo.

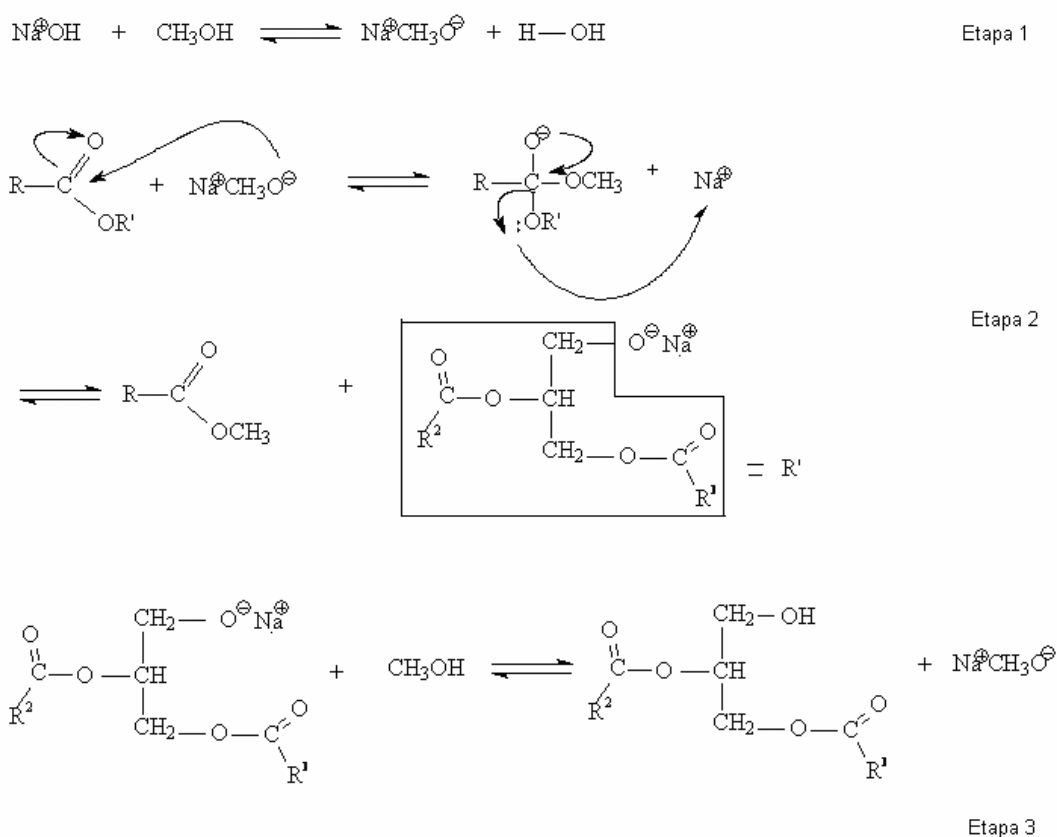


Figura 3. Mecanismo de reação de transesterificação de um triacilglicerol com metanol na presença de hidróxido de sódio.

A etapa 1 da reação esquematizada na Figura 3 mostra a formação de água no meio reacional quando se utiliza hidróxidos. A presença de água pode promover a hidrólise de ésteres formados levando a produção de sabão, pelo ataque do íon hidróxido, (Figura 4), diminuindo o rendimento da reação de transesterificação, pois esta reação é irreversível (Solomons e Fryhle, 2002).

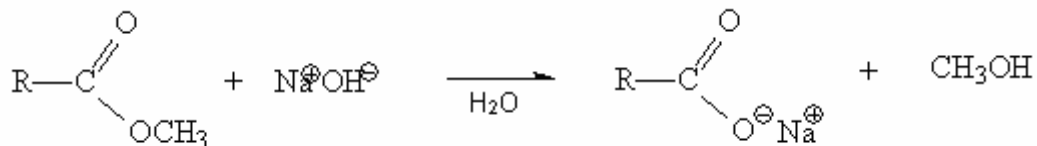


Figura 4. Reação de hidrólise: saponificação.

Na presença de íons metóxido e hidróxido, as reações de transesterificação e saponificação ocorrem simultaneamente, mas a reação de transesterificação se processa muito mais rápido que a saponificação e o máximo da reação pode ser obtido rapidamente (Glass, 1971; Gutnikov, 1995).

Contudo, existem alguns requisitos que podem inibir que a saponificação ocorra com conseqüente diminuição do rendimento da reação de esterificação. Como alternativa, pode-se usar metóxido de sódio ou potássio ou aumentar a concentração de metanol no meio reacional favorecendo a de formação do íon metóxido (Figura 5) (Boocock *et al.*, 1996).

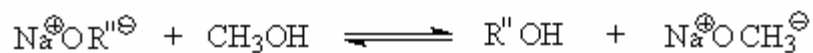


Figura 5. Utilização de metóxido de sódio como catalisador.

Deve-se evitar a presença de ácidos graxos livres no meio reacional, pois também levam à formação de sabão na presença de base (Meher *et al.*, 2006a).

2.2.3.b. Mecanismo de Reação Envolvido na Transesterificação e Esterificação por Catálise Ácida

As etapas do mecanismo de transesterificação de triacilgliceróis por catálise ácida são mostradas na Figura 6.

Na primeira etapa ocorre a protonação do grupo carbonílico do éster (Etapa 1), formando um carbocátion que, após o ataque nucleofílico do álcool

resulta na formação de um intermediário tetraédrico (Etapa 2). Este intermediário elimina o diacilglicerol para formar o éster metílico e regenerar o catalisador ácido (Etapa 3). Esta reação se estende para os di e monoacilgliceróis.

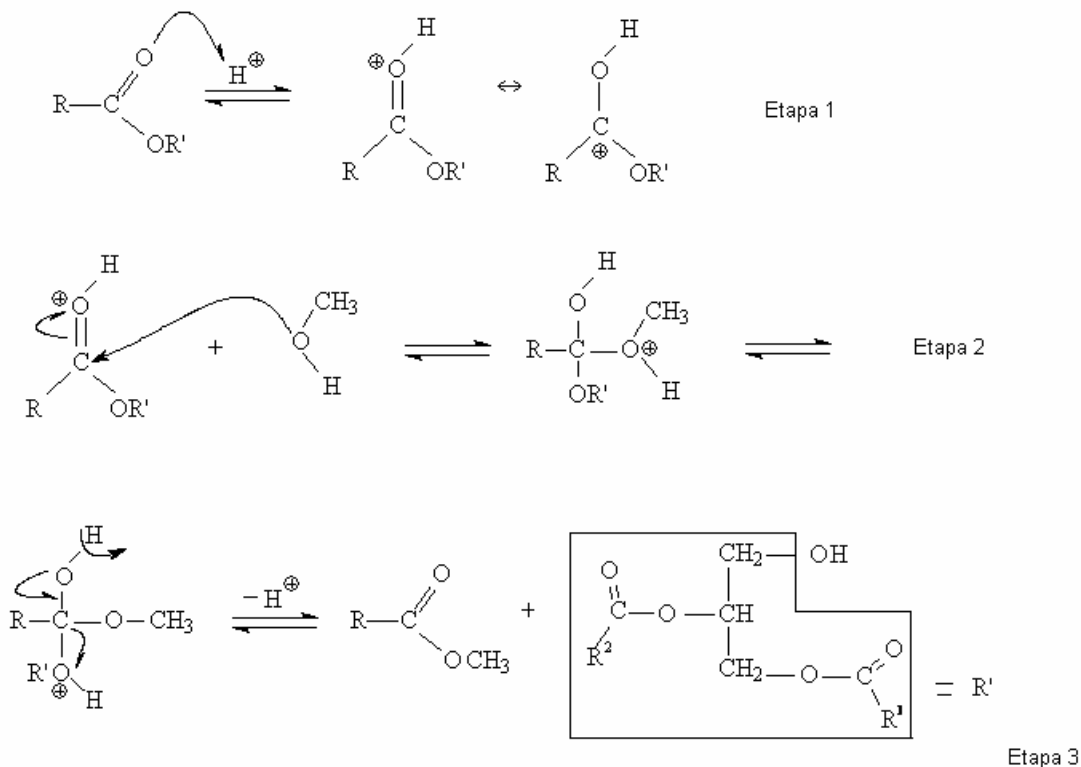


Figura 6. Mecanismo de reação de transesterificação de um triacilglicerol com metanol na presença de catalisador ácido.

A reação de esterificação por catálise ácida (Figura 7) ocorre de modo similar à transesterificação descrita na Figura 6. O ácido graxo recebe um próton do catalisador (ácido forte) que ocorre na etapa 1. Após o ataque do álcool no grupo carbonila protonado forma um intermediário tetraédrico (Etapa 2) que, com a perda de uma molécula de água e transferência de um próton leva a formação do éster (Etapa 3).

Cada etapa do processo é reversível e na presença de excesso de álcool leva à formação do éster. Entretanto, na presença de água, que é um forte doador de elétrons, a formação do intermediário na etapa 2 não é favorecida e a reação de esterificação não se processa completamente. Logo, para se obter um rendimento satisfatório na reação de esterificação deve-se

evitar a presença de água no meio reacional, assim como na catálise básica (Stoffel *et al.*, 1959).

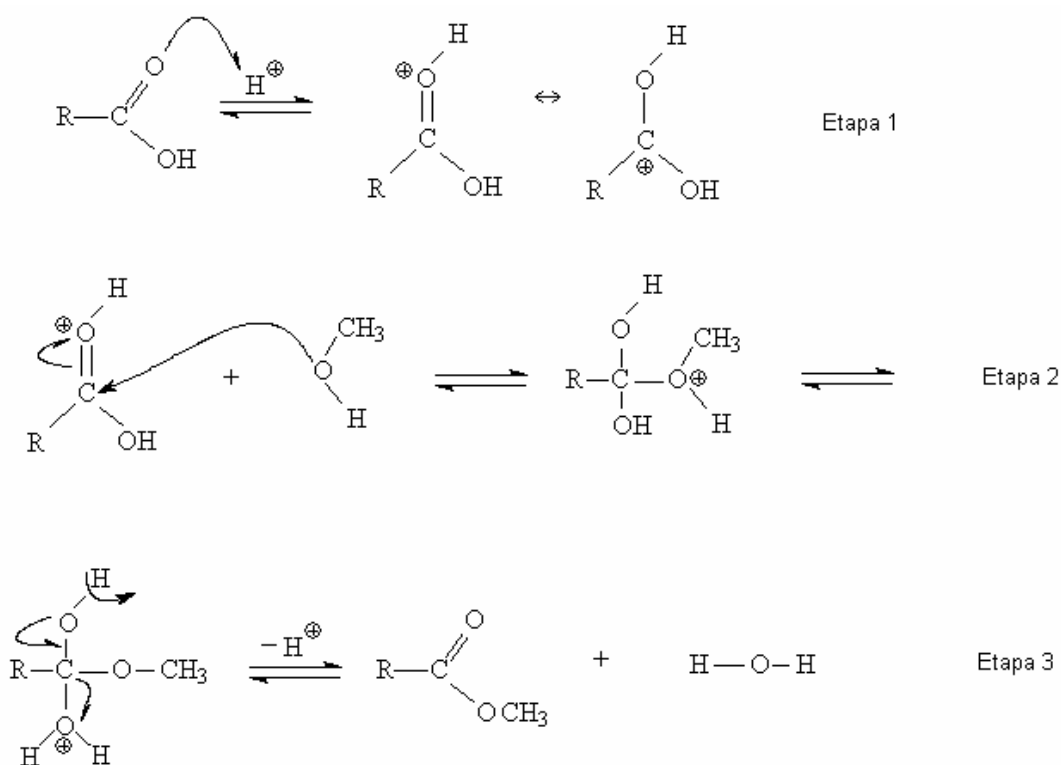


Figura 7. Mecanismo de reação de esterificação de um ácido graxo com metanol na presença de catalisador ácido.

Contudo, pode ocorrer a reação de hidrólise do éster formado por ácido (Figura 8). Logo, quando se deseja a reação de esterificação é necessário o uso de excesso de metanol e eliminar resíduo de água para se obter um alto rendimento na (trans e) esterificação (Stoffel *et al.*, 1959; Solomons e Fryhle, 2002).

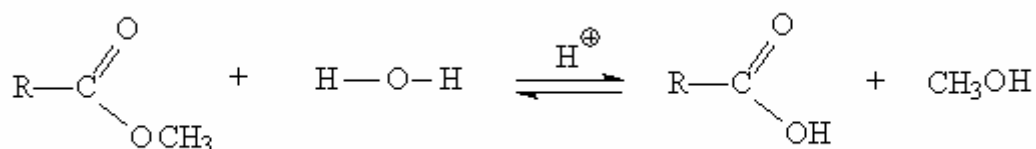


Figura 8. Mecanismo da reação de hidrólise por ácido.

2.2.4. Influência dos Reagentes de Esterificação

Como descrito, os métodos que utilizam catálise ácida e básica podem afetar o rendimento de reação, por diversas razões como a presença de água, AGL (na catálise básica), uso de quantidades inadequadas de álcool e por aquecimento.

Estes fatores podem afetar diretamente os resultados quantitativos devido à conversão incompleta dos lipídios a ésteres metílicos de ácidos graxos, mudança na composição dos ácidos graxos durante a esterificação, formação de artefatos que podem ser erroneamente identificados como ácidos graxos. Ainda, resíduos do catalisador usado podem levar a contaminação da coluna cromatográfica, extração incompleta de ésteres metílicos de ácidos graxos e perda de ésteres metílicos de cadeia curta e muito voláteis (Shanta e Napolitano, 1992; Brondz, 2002).

2.2.5. Análise por Cromatografia Gasosa dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

A análise de ácidos graxos pode ser realizada por técnicas cromatográficas como: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por cromatografia gasosa (CG).

A técnica de CCD tem sido muito utilizada para análise de ácidos graxos após o fracionamento das classes lipídicas. Também foram adaptadas para aplicação de procedimentos de esterificação utilizando catálise ácida e básica, bem como para avaliar a eficiência deste procedimento na formação de EMAG (Christie, 1993).

A análise de ácidos graxos por CLAE também tem sido descrita, no entanto, pode apresentar co-eluição de picos para misturas muito complexas (Aveldano e Horrocks, 1983; Sanches-Silva *et al.*, 2004).

Em cromatografia gasosa, as primeiras análises de EMAGs foram realizadas usando colunas empacotadas com 1 a 3 metros e diâmetro de 2-4 mm, sendo característico haver perdas de componentes com o aumento do

número de carbono e insaturação (Tvrzická *et al.*, 2002). Essas colunas foram sendo substituídas por colunas capilares por serem mais eficientes e promover resultados mais precisos devido a melhor resolução (Freedman *et al.*, 1986).

Contudo, hoje são utilizadas colunas capilares de 50 a 100 m de comprimento para que o número de pratos teóricos seja suficiente para promover resolução cromatográfica adequada para separar misturas complexas de ésteres metílicos de ácidos graxos, permitindo a aplicação da técnica analítica em análises de rotina em laboratórios de cromatografia (Ackman, 1972, Seppanen-Laakso *et al.*, 2002).

A separação dos ésteres metílicos de ácidos graxos pode ser realizada em três diferentes tipos de coluna, com fase estacionária apolar, polar e muito polar (Christie, 1989), sendo mais utilizada as colunas de alta polaridade (quimicamente ligadas) devido a maior resistência mecânica da fase estacionária e maior estabilidade térmica, resultando no aumento do tempo de vida útil da coluna (Peene *et al.*, 2003).

O detector de ionização de chama é o mais conveniente e usado para detecção de compostos orgânicos, em especial para análise de alimentos devido à quantidade mínima detectável (10^{-12} g), resposta quase universal, faixa de linearidade e resposta rápida (Craske e Bannon, 1987). Apesar de responder a propriedades do soluto, este é sensível ao fluxo de massa que passa por ele.

No entanto, a resposta do detector de ionização de chama é diferencial, ou seja, a magnitude do sinal é proporcional ao número de carbono ativo, logo ésteres metílicos com diferentes cadeias carbônicas apresentarão diferentes respostas no detector de ionização de chama (Ulberth e Schrammel, 1995; Brondz, 2002; Schreiner e Hulan, 2004; Collins *et al.*, 2006; Visentainer e Franco, 2006).

Na análise de alimentos, a cromatografia gasosa permite a identificação dos componentes da amostra através da comparação dos tempos de retenção dos compostos com aqueles obtidos através da injeção de padrões contendo as substâncias a serem analisadas. No entanto, este procedimento não é conclusivo, pois componentes diferentes podem ter o mesmo tempo de retenção.

Alternativas usadas na identificação são: adição de padrão (*spiking*), utilização de padrão secundário, métodos gráficos, uso de colunas com diferentes polaridades e índices sistemáticos de retenção. O índice de retenção de Kovats é um método que se baseia no comprimento equivalente da cadeia (ECL, *Equivalent Chain Length*) e é muito aplicado por ser um método simples, de fácil aplicação e de baixo custo (Visentainer e Franco, 2006).

Na análise por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama, o método da normalização é muito utilizado, porém, apresenta limitações como: a necessidade de eluição e detecção de todos os componentes injetados, o que nem sempre ocorre devido à discriminação ou retenção irreversível de algum componente e a consideração de que a resposta do detector é a mesma para todos os componentes; o que não acontece, pois o detector de ionização de chama apresenta resposta diferencial (Albertyn *et al.*, 1982).

O uso de adição de um padrão interno tem sido empregado na análise de ácidos graxos, pois possibilita expressar os resultados em massa. Este método é menos sensível a erros, uma vez que o padrão interno e a amostra são injetados juntos e, através da utilização de fatores de correção é possível expressar os resultados em massa de ácidos graxos e não de ésteres metílicos de ácidos graxos (Ackman e Sipos, 1964; Schreiner, 2005; Visentainer e Franco, 2006).

O padrão interno a ser empregado na quantificação dos ácidos graxos deve apresentar alguns requisitos básicos como: não estar presente na amostra, ter alto grau de pureza, estabilidade, ser acessível, de baixo custo, eluir separadamente e próximo dos componentes da amostra entre outros (Eder, 1995; Brondz, 2002).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Tendo em vista a possibilidade de obter diferentes resultados na concentração de ésteres metílicos ácidos graxos para a mesma amostra, em função dos métodos de esterificação utilizada, o objetivo do presente trabalho foi verificar a eficiência e aplicabilidade de 8 diferentes métodos de esterificação, envolvendo catálise ácida e básica na determinação quantitativa de EMAG em óleos vegetais.

3.2. Objetivos Específicos

Avaliar a eficiência dos oito métodos de esterificação quando aplicados em cinco óleos vegetais: canola, dendê, linhaça, oliva e soja, com diferentes composições em ácidos graxos.

Efetuar a quantificação dos ácidos graxos expressos em mg EMAG/g de óleo pelo método da adição de padrão interno nos cinco óleos vegetais.

Estimar a exatidão da quantificação através da realização do teste de adição e recuperação dos principais triacilgliceróis presentes nos óleos vegetais.

Avaliar qual (is) dos métodos de esterificação pode ser considerado o mais adequado levando-se em consideração a repetibilidade, frequência analítica, consumo e toxicidade dos reagentes utilizados, relação custo benefício e teor de ácidos graxos.

4. MATERIAIS e MÉTODOS

4.1. Amostragem

Foram analisados cinco óleos vegetais, sendo divididos em refinados: soja e canola, e brutos linhaça, azeite de oliva e de dendê. Os óleos foram adquiridos no comércio local de Maringá - PR, exceto o azeite de dendê, o qual foi obtido de forma artesanal por produtores do estado da Bahia. Cada óleo foi armazenado em dezesseis frascos âmbar com capacidade de 100 mL (duas alíquotas para cada método) sob fluxo de N₂ em refrigeração durante o período de análise correspondente a um ano. Os óleos foram usados dentro do prazo de validade estabelecido na embalagem.

Esses óleos foram selecionados devido à diferença na concentração dos principais ácidos graxos presentes: palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oléico (C18:1n-9), linoléico (C18:2n-6) e α - linolênico (C18:3n-3).

4.2. Reagentes

Os reagentes usados foram todos de grau analítico. Quando necessário os reagentes foram secos utilizando sulfato de sódio anidro para remoção de traços de água. Os padrões de EMAG e de triacilgliceróis usados foram da marca Sigma (USA).

4.3. Determinação do Índice de Acidez

O índice de acidez foi determinado de acordo com o método utilizado no Instituto Adolfo Lutz (1985) e calculado de acordo com a Eq. 1. Foram pesados em um erlenmeyer aproximadamente 2,0 g de óleo, adicionados 25,0 mL de uma solução de éter-álcool etílico (2:1) e agitado. Em seguida foram adicionadas 2 gotas do indicador fenolftaleína. Titulou-se com uma solução de hidróxido de potássio 0,10 mol/L até coloração rosa.

$$\text{Índice de Acidez (mg de KOH/g)} = \frac{V \cdot f_c \cdot C \cdot 5,61}{m} \quad (\text{Eq. 1})$$

onde: V = volume de KOH (mL)

fc = fator de correção

C = concentração de KOH (mol/L)

m = massa da amostra (g)

4.4. Métodos Seleccionados para Preparação dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos (EMAG)

Os métodos foram seleccionados considerando consumo e toxicidade dos reagentes utilizados, tempo de aquecimento, frequência analítica, relação custo benefício e teor de EMAG determinados nos óleos analisados. Os métodos seleccionados estão presentes na Tabela 3 e no anexo (I) estão dispostos na forma de fluxograma.

Tabela 3. Métodos de esterificação seleccionados.

Métodos	Siglas	Catalisador
1. Metcalfe <i>et al.</i> , 1966	MET	BF ₃ /CH ₃ OH
2. Bannon <i>et al.</i> , 1982a	BAN	BF ₃ /CH ₃ OH
3. Joseph e Ackman, 1992	JAC	BF ₃ /CH ₃ OH
4. Hartman e Lago, 1973	HLA	H ₂ SO ₄ /NH ₄ Cl/CH ₃ OH
5. Jham <i>et al.</i> , 1982	JHA	HCl/CH ₃ OH
6. ISO 5509, 1978	ISO	NaOH/CH ₃ OH
7. Bannon <i>et al.</i> , 1982b	BBA	NaOCH ₃ /CH ₃ OH
8. Schuchardt e Lopes, 1988	SLO	Tetrametilguanidina/CH ₃ OH

4.4.1. Método de Esterificação de Catálise Ácida empregando Trifluoreto de Boro em Metanol

4.4.1.a. Método descrito por Metcalfe *et al.*, 1966 (MET)

Foram pesados aproximadamente 150 mg de óleo e adicionados 4,0 mL de solução de NaOH 0,50 mol/L em metanol. A mistura foi aquecida em banho a 100°C até dissolução dos glóbulos de gordura (aproximadamente 5 minutos). Foram adicionados 5,0 mL de BF₃ (12%) em metanol, sendo esta aquecida por mais 2 minutos. Após resfriamento, foi adicionado 5,0 mL de solução de cloreto de sódio saturada. A mistura foi transferida para um funil de separação juntamente com 20,0 mL de éter de petróleo. Agitou-se o funil vigorosamente por 1 minuto e em seguida foi deixado em repouso para separação das fases. Após esta etapa, foi descartada a fase aquosa. Filtrou-se a fase etérea em papel filtro para um balão e o solvente foi evaporado em banho a 60°C. O solvente residual foi removido com fluxo de nitrogênio a temperatura ambiente. Os ésteres metílicos foram solubilizados em n-heptano para posterior injeção no cromatógrafo a gás.

4.4.1.b. Método descrito por Bannon *et al.*, 1982a (BAN)

Foram pesados aproximadamente 150 mg de óleo, adicionados 5,0 mL de solução de KOH 0,50 mol/L em metanol. A mistura foi aquecida sob refluxo por 3 minutos. Após a adição de 5,0 mL de BF₃ (14%) em metanol, a mistura foi novamente aquecida sob refluxo por 3 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 3,0 mL de iso-octano e 15,0 mL de solução de cloreto de sódio saturada. Agitou-se vigorosamente por 15 segundos. Após separação das fases, foram coletados aproximadamente 2,5 µL da fase superior para posterior injeção no cromatógrafo a gás.

4.4.1.c. Método descrito por Joseph e Ackman, 1992 (JAC)

Foram pesados aproximadamente 25 mg (\pm 0,1 mg) de óleo, adicionados 1,5 mL de solução de NaOH 0,50 mol/L em metanol. A mistura foi

aquecida em banho a 100°C por cerca de 5 minutos e em seguida resfriada a temperatura ambiente. Foram adicionados 2,0 mL de uma solução de BF₃ (12%) em metanol, aquecido novamente em banho a 100°C por 30 minutos. Após, resfriou-se o tubo em fluxo de água corrente à temperatura ambiente e foram adicionados 1 mL de iso-octano. Agitou-se vigorosamente por 30 segundos, em seguida foram adicionados 5,0 mL de solução de cloreto de sódio saturada. A amostra esterificada foi levada à geladeira e deixada em repouso para melhor separação das fases. Após a coleta do sobrenadante, foi adicionado mais 1,0 mL de iso-octano ao tubo, este foi agitado, coletado e adicionado à fração anterior. A amostra foi concentrada para um volume final de 1,0 mL para posterior injeção no cromatógrafo a gás.

4.4.2. Método de Esterificação de Catálise Ácida empregando Ácido Sulfúrico em Metanol

4.4.2.a. Método descrito por Hartman e Lago, 1973 (HLA)

Foram pesados de 200-500 mg de óleo, adicionou-se 5,0 mL de solução de NaOH 0,50 mol/L em metanol e a mistura foi levada para aquecimento em refluxo por 5 minutos. Após foram adicionados 15,0 mL do reagente de esterificação (preparado a partir da mistura de 2,0 g de cloreto de amônio, 60,0 mL de metanol e 3,0 mL de ácido sulfúrico concentrado, aquecida por aproximadamente 15 minutos), a mistura foi aquecida em refluxo por mais 3 minutos e, em seguida, foi transferida para um funil de separação juntamente com 25,0 mL de éter de petróleo e 50,0 mL de água deionizada. Após agitação e separação das fases, descartou-se a fase aquosa. Adicionou-se 25,0 mL de água deionizada à fase orgânica, agitou-se e após a separação das fases, a aquosa foi descartada e o procedimento repetido. A fase orgânica foi coletada, o solvente evaporado em evaporador rotativo e o resíduo foi removido sob fluxo de nitrogênio. Os ésteres metílicos foram solubilizados em n-heptano para posterior injeção no cromatógrafo a gás.

4.4.3. Método de Esterificação de Catálise Ácida empregando Ácido Clorídrico em Metanol

4.4.3.a. Método descrito por Jham *et al.*, 1982. (JHA)

Foram transferidos 50 µL de óleo para um tubo, adicionados 1,0 mL de uma solução de KOH 0,50 mol/L em metanol e aquecidos em banho a 100 °C por 5 minutos. Após foram adicionados 400 µL de HCl em metanol aquoso (4:1 v/v). A mistura foi aquecida em um banho a 100°C por 15 minutos. Resfriou-se o tubo e em seguida foram adicionados 2,0 mL de água deionizada, 3,0 mL de éter de petróleo e agitou-se. Após a coleta do sobrenadante, foram adicionados mais 3,0 mL de éter de petróleo ao tubo, este foi agitado, coletado e adicionado à fração anterior. A fase orgânica foi seca utilizando sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado e os ésteres foram redissolvidos em 500 µL de clorofórmio para posterior injeção no cromatógrafo a gás.

4.4.4. Método de Esterificação de Catálise Básica empregando Hidróxido de Sódio em Metanol

4.4.4.a. Método 5509 descrito pela ISO, 1978 (ISO)

Foram pesados aproximadamente 1,0 g de óleo em um tubo, adicionados 10,0 mL de n-heptano e agitado. Em seguida foram adicionados 0,50 mL de solução de NaOH 2,0 mol/L em metanol e agitado por 20 segundos. Após separação das fases, o sobrenadante foi coletado para posterior análise no cromatógrafo a gás.

4.4.5. Método de Esterificação de Catálise Básica empregando Metóxido de Sódio em Metanol

4.4.5.a. Método descrito por Bannon *et al.*, 1982b (BBA)

Foram pesados aproximadamente 150 mg de óleo, adicionados 5,0 mL de solução de NaOMe (0,25 mol/L) em metanol - dietil éter (1:1) e a agitada por 2 minutos. Após foram adicionados 3,0 mL de iso-octano e 15,0 mL de solução de cloreto de sódio saturado. A mistura foi agitada vigorosamente por 15 segundos e após a separação das fases, foram coletados 2,5 µL da fase superior contendo os ésteres metílicos de ácidos graxos para análise no cromatógrafo a gás.

4.4.6. Método de Esterificação de Catálise Básica empregando Tetrametilguanidina em Metanol

4.4.6.a. Método descrito por Schuchardt e Lopes, 1988 (SLO)

Foram pesados aproximadamente 250 mg de óleo, adicionados 2,0 mL de solução de tetrametilguanidina em metanol (1:4 v/v). Este foi aquecido em banho a 100°C por 2 minutos. Em seguida, resfriou-se o tubo a temperatura ambiente, e adicionados 20,0 mL de uma solução de cloreto de sódio saturada e 8,0 mL de éter de petróleo. Após a separação das fases, a fase orgânica foi coletada e o solvente evaporado sob fluxo de nitrogênio. Os ésteres metílicos foram solubilizados em iso-octano para posterior injeção no cromatógrafo a gás.

4.5. Análise Cromatográfica dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

A análise cromatográfica foi conduzida utilizando um cromatógrafo a gás Varian, modelo CP 3380, equipado com detector de ionização de chama, injetor do tipo split/splitless e coluna capilar de sílica fundida CP-Select CB-FAME (100 % cianopropil ligado, dimensões: 100 m, 0,25 mm i.d. e 0,39 µm de fase estacionária). Os parâmetros de operação estabelecidos após verificação da melhor condição de resolução foram: temperatura da coluna de 197°C por 23 minutos e 235°C (20°C/min.) por 20 minutos a uma pressão de 40 psi. A temperatura do injetor e do detector foi mantida a 220°C e 245°C, respectivamente. A vazão dos gases foi de 1,4 mL/min para o gás de arraste

(H₂), 30 mL/min para o make-up (N₂), 30 mL/min e 300 mL/min para o hidrogênio e para o ar sintético da chama, respectivamente. O divisor de amostra foi de 1/80.

As injeções foram realizadas em duplicata e o volume de injeção foi de 1 µL. As áreas dos picos dos ésteres metílicos de ácidos graxos foram determinadas através do software Workstation versão 5.0 (Varian).

4.6. Identificação dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada de acordo com os seguintes procedimentos:

- por comparação do tempo de retenção dos constituintes da amostra com uma mistura constituída de 37 padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (anexo II) da Sigma e por comparação com alguns padrões individuais,
- através da adição de padrão e verificação de aumento nas áreas dos picos e,
- por valores do comprimento equivalente de cadeia (ECL) conforme método descrito por Visentainer e Franco (2006), empregando como compostos de referência os ésteres metílicos dos ácidos graxos: C16:0, C18:0 e C20:0. Os valores de ECL foram calculados para os EMAG quantificados nos óleos vegetais, para os padrões (Sigma) (anexo III) e comparados com dados da literatura.

As análises para a determinação dos valores de ECL foram efetuadas em seis repetições, através de um cromatógrafo a gás 14A (Shimadzu, Japão), equipado com detector de ionização de chama coluna capilar Carbowax 20M (dimensões: 50 m, 0,25 mm i.d. e 0,20 µm). Os parâmetros de operação usados foram: temperatura da coluna de 200°C por 60 minutos a uma pressão de 40 psi. A temperatura do injetor e do detector foi mantida a 220°C e 245°C, respectivamente. A vazão dos gases foi de 1,4 mL/min para o gás de arraste (H₂), 30 mL/min para o make-up (N₂), 30 mL/min e 300 mL/min para o hidrogênio e para o ar sintético da chama, respectivamente. O divisor de amostra foi de 1/100. As áreas dos picos foram determinadas através de um integrador processador CG-300.

4.7. Avaliação da Resposta do Detector de Ionização de Chama

Para avaliar a resposta do detector de ionização de chama foi utilizada uma solução de mistura de padrões (Sigma) de EMAG em concentração conhecida. O fator resposta experimental foi calculado para os padrões: miristato (14:0), palmitato (C16:0), estearato (C18:0), oleato (C18:1n-9), linoleato (C18:2n-6), α e δ - linolenato (C18:3n-3 e C18:3n-6, respectivamente), eicosanoato (20:0), docosanoato (22:0), tetracosanoato (24:0), em relação ao tricosanoato de metila (C23:0) através da Eq.2, conforme método proposto por Ackman (1972). Estes fatores foram obtidos a partir da média de seis repetições.

$$F_R = \frac{A_{23:0} \cdot C_x}{A_x \cdot C_{23:0}} \quad (\text{Eq. 2})$$

onde: F_R = fator resposta em relação ao tricosanoato de metila

$A_{23:0}$ = área do tricosanoato de metila

A_x = área do EMAG

$C_{23:0}$ = concentração do tricosanoato de metila

C_x = concentração do EMAG

4.8. Análise Quantitativa dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

A quantificação dos EMAG obtidos com a aplicação dos métodos de esterificação dos óleos vegetais foi realizada após verificação da concordância entre os fatores de resposta experimental e teórico dentro da faixa de concentração a ser trabalhada.

Para essa avaliação foram utilizadas soluções de padrões (Sigma) dos EMAG: C18:1n-9 (99,3 mg/mL); C18:2n-6 (99,8 mg/mL), C18:3n-3 (92,8 mg/mL), C20:0 (15,5 e 101 mg/mL) e C23:0 (1,0 mg/mL) todas preparadas em iso-octano. A partir dessas foram obtidas soluções em diferentes concentrações, mantendo fixa a concentração do tricosanoato de metila (23:0).

As soluções foram analisadas em triplicata, sendo injetado um volume de 1,0 μ L. Partindo das áreas obtidas plotou-se a razão entre a área de cada

padrão de EMAG e do tricosanoato de metila em função da concentração, sendo possível determinar os fatores de resposta para diferentes faixas de concentração a partir do coeficiente angular da curva usando a Eq. 2 (anexo IV).

A quantificação dos EMAG nos óleos vegetais foi efetuada em relação ao padrão interno, tricosanoato de metila (23:0). A solução do padrão interno foi preparada na concentração de 1,0 mg/mL em iso-octano. A adição do padrão interno (tricosanoato de metila) foi realizada antes da pesagem do óleo no recipiente de esterificação. A quantidade adicionada foi estabelecida mantendo uma proporção de aproximadamente 200:1 entre a massa de óleo e massa do padrão interno. Após a adição da solução do padrão interno, o solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio.

A concentração dos EMAG obtidos após a aplicação dos métodos de esterificação foi calculada de acordo com a Eq. 3 e de maneira similar a Cantellops *et al.* (1999). Os resultados foram expressos em mg de EMAG por grama de óleo.

$$C \text{ (mg de EMAG/g)} = \frac{A_x \cdot M_{23:0} \cdot F_R}{A_{23:0} \cdot M_A} \quad (\text{Eq. 3})$$

onde: A_x = área dos EMAG

$A_{23:0}$ = área do tricosanoato de metila

M_A = massa da amostra em gramas

$M_{23:0}$ = massa do tricosanoato de metila

F_R = fator de resposta teórico dos EMAG

4.9. Limites de Quantificação e Detecção

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

4.10. Teste de Adição e Recuperação

A exatidão foi estimada através da realização de testes de adição e recuperação. Os padrões de triacilgliceróis (Sigma) usados foram: tripalmitina (TG 16:0), triestearina (TG 18:0), trioleína (TG 18:1n-9), trilinoleína (TG 18:2n-6), trilinolenina (TG 18:3n-3). Esses triacilgliceróis foram escolhidos por serem os principais triacilgliceróis presentes nos óleos vegetais usados (anexo V).

Inicialmente fez-se a determinação da concentração destes cinco triacilgliceróis: tripalmitina, triestearina, trioleína, trilinoleína e trilinolenina em mg de TG/g de óleo através da Eq. 4 nos óleos vegetais.

$$C \text{ (mg de TG/g)} = C_{EMAG} \cdot F_{TG} \quad (\text{Eq. 4})$$

onde: C_{EMAG} = concentração de EMAG (mg/g)

F_{TG} = fator de conversão teórico de EMAG para triacilgliceróis

O fator F_{TG} foi calculado considerando três unidades de ácidos graxos por molécula de glicerol, esses valores de conversão estão em anexo (VI).

As soluções dos triacilgliceróis foram preparadas como descrito:

- Solução 1: Tripalmitina (99%) 2,13 mg/mL em iso-octano (212 mg em 99,9 mL);
- Solução 2: Triestearina (99%) 2,00 mg/mL em iso-octano (101 mg em 50,2 mL);
- Solução 3: Trioleína (99%) 20,1 mg/mL em clorofórmio (500 mg em 24,9 mL);
- Solução 4: Trilinoleína (99%) 4,03 mg/mL em clorofórmio (100 mg em 24,8 mL);
- Solução 5: Trilinolenina (98%) 10,090 mg/mL em clorofórmio (100 mg em 9,91 mL).

Antes da aplicação dos métodos de esterificação fez-se a adição do padrão interno, em seguida adições dos triacilgliceróis em quantidade conhecida e o solvente evaporado sob fluxo de nitrogênio. As adições das soluções foram realizadas da seguinte forma: soluções 1 e 2 no óleo de canola; solução 3 no óleo de linhaça e soluções 4 e 5 utilizando o azeite de oliva. As adições foram efetuadas em três repetições e injetadas em duplicata.

Após a quantificação em relação ao padrão interno, de acordo com as Eq. 3 e 4, as porcentagens de recuperação foram determinadas através da Eq. 5.

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

(Eq. 5)

onde: C_A = concentração do triacilglicerol determinado na amostra do óleo fortificado;

C_{AO} = concentração do triacilglicerol determinado na amostra do óleo;

C_{AD} = concentração do triacilglicerol adicionado na amostra do óleo;

4.11. Análise Estatística

As análises foram realizadas em dez repetições e os resultados expressos como média \pm desvio padrão. Os diferentes métodos foram comparados através da análise de variância (ANOVA) com nível de 5% de significância utilizando o programa Statistica 7.0 (StatSoft, USA, 2005). Os valores médios foram comparados pelo Teste de Tukey.

5. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Neste estudo comparativo avaliou-se qual dos métodos de esterificação aplicados a diferentes óleos vegetais pode ser considerado o mais adequado levando em consideração a frequência analítica, consumo e toxicidade dos reagentes utilizados, relação custo benefício e o teor de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) determinados nos óleos analisados.

5.1. Determinação do Índice de Acidez dos Óleos Vegetais

Os valores do índice de acidez obtidos para os óleos vegetais analisados estão na Tabela 4.

Tabela 4. Índice de acidez determinado nos óleos vegetais analisados.

Óleos Vegetais	Índice de Acidez* (mg KOH/g)
canola	0,061 ± 0,001
soja	0,052 ± 0,003
linhaça	0,067 ± 0,000
oliva	0,078 ± 0,002
dendê	0,104 ± 0,004

* Os valores são médias de seis repetições acompanhados de seu desvio padrão.

Estes dados mostram que os óleos usados apresentaram baixa acidez, tanto os óleos refinados (canola e soja), quanto os óleos bruto: linhaça, oliva e dendê. Devido à baixa acidez dos óleos vegetais analisados, estima-se que os ácidos graxos presentes estão ligados a moléculas de glicerol, sendo os triacilgliceróis a forma predominante, como desrito na literatura.

5.2. Identificação e Quantificação dos EMAG presentes nos Óleos Vegetais

A identificação dos EMAG foi realizada por adição de padrão (*spiking*), comparação de padrões e por ECL, o que possibilitou a confirmação dos ácidos graxos constituintes dos óleos vegetais. O uso do ECL aliado às demais

ferramentas citadas permitiu a confirmação dos ácidos graxos de forma simples, com baixo custo e de maneira muito eficaz. Esse procedimento foi indispensável para se realizar a quantificação dos EMAG.

A Tabela 5 apresenta os valores dos fatores resposta experimental obtido a partir de uma mistura de padrões de EMAG e teórico em relação ao tricosanoato de metila. Os fatores experimentais para os EMAG saturados apresentaram maior proximidade com os fatores teóricos, quando comparado com os valores obtidos para os EMAG: linoleato de metila, α e δ - linolenato de metila.

Essa diferença pode ter ocorrido devido à instabilidade oxidativa dos EMAG insaturados, desta forma utiliza-se EMAG saturados para verificar a otimização do equipamento e uma vez otimizado, recomenda-se a utilização dos fatores teóricos nas determinações quantitativas de ácidos graxos polinsaturados (Bannon *et al.*, 1986). Deste modo, para a quantificação dos EMAG foram utilizados os fatores de resposta teóricos.

Tabela 5. Valores de fator resposta em relação ao tricosanoato de metila.

EMAG	Fator Resposta	
	Experimental*	Teórico
C14:0	1,10 ± 0,125	1,080
C16:0	1,08 ± 0,094	1,055
C18:0	1,09 ± 0,064	1,035
C18:1n-9	1,04 ± 0,067	1,028
C18:2n-6	1,13 ± 0,074	1,021
C18:3n-6	1,25 ± 0,104	1,014
C20:0	1,06 ± 0,029	1,019
C18:3n-3	1,26 ± 0,078	1,014
C22:0	0,979 ± 0,0150	1,006
C24:0	0,957 ± 0,0161	0,9951

* Os valores são médias de seis repetições acompanhados de seu desvio padrão

Os limites de detecção e quantificação foram estimados a partir de sucessivas diluições de uma solução padrão de araquidato de metila e apresentaram os valores de 0,148 e 0,476 mg/g de óleo, respectivamente.

Após ter verificado a concordância entre os fatores de resposta experimental e teórico na faixa de concentração utilizada para a quantificação dos EMAG a partir de sucessivas diluições de soluções de padrões dos EMAG C18:1n-9, C18:2n-6, C18:3n-3, C20:0 em relação ao tricosanoato de metila

(anexo IV), procedeu-se a aplicação dos procedimentos de esterificação após a adição do padrão interno.

Essa verificação possibilitou estabelecer uma razão de aproximadamente 200:1 entre massa de amostra e de padrão interno, sem comprometer os resultados da quantificação dos EMAG e evitando o consumo excessivo de padrão interno, que é um reagente caro e pode aumentar o custo final da análise cromatográfica.

5.3. Análise Comparativa da Concentração dos EMAG (mg/g de óleo) obtidos por Diferentes Métodos de Esterificação aplicados ao Azeite de Dendê

Os resultados obtidos de EMAG (mg/g de óleo) para o azeite de dendê após aplicação de diferentes métodos de esterificação estão relacionados na Tabela 6. Foram quantificados nove EMAG (Figura 9) no azeite de dendê sendo os principais: o oleato de metila (C18:1n-9), palmitato de metila (C16:0) e linoleato de metila (C18:2n-6).

A concentração de palmitato de metila (em mg/g) obtida após a reação de esterificação foi inferior quando se utilizou o método JAC (376), sendo considerados mais eficientes para a obtenção deste éster metílico os métodos: HLA (403), ISO (402) e SLO (398). Esses valores de concentração foram diferentes ($p < 0,05$) dos demais métodos analisados (MET, BAN, JHA e BBA).

Para o estearato de metila (C18:0) não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os métodos de esterificação estudados, sendo a concentração média de 49,6 mg/g.

Os resultados das concentrações dos ésteres metílicos monoinsaturados, C18:1n-9 e C18:1n-7 foram calculados após o somatório de suas áreas devido à difícil separação desses picos; deste modo, a concentração do oleato de metila (C18:1) refere-se a este somatório.

A menor concentração obtida para o oleato de metila foi através dos métodos JHA (421 mg/g) e SLO (419 mg/g), os quais diferiram ($p < 0,05$) dos métodos HLA (431), ISO (436), BBA (442) e JAC (443 mg/g), sendo HLA também diferente ($p < 0,05$) dos métodos de esterificação JAC e BBA.

Para o linoleato de metila as concentrações (em mg/g) obtidas através dos métodos JAC (86,1), ISO (86,3) e BBA (86,2) foram iguais ($p > 0,05$) entre si, diferindo apenas da concentração obtida pelo método HLA (83,6 mg/g).

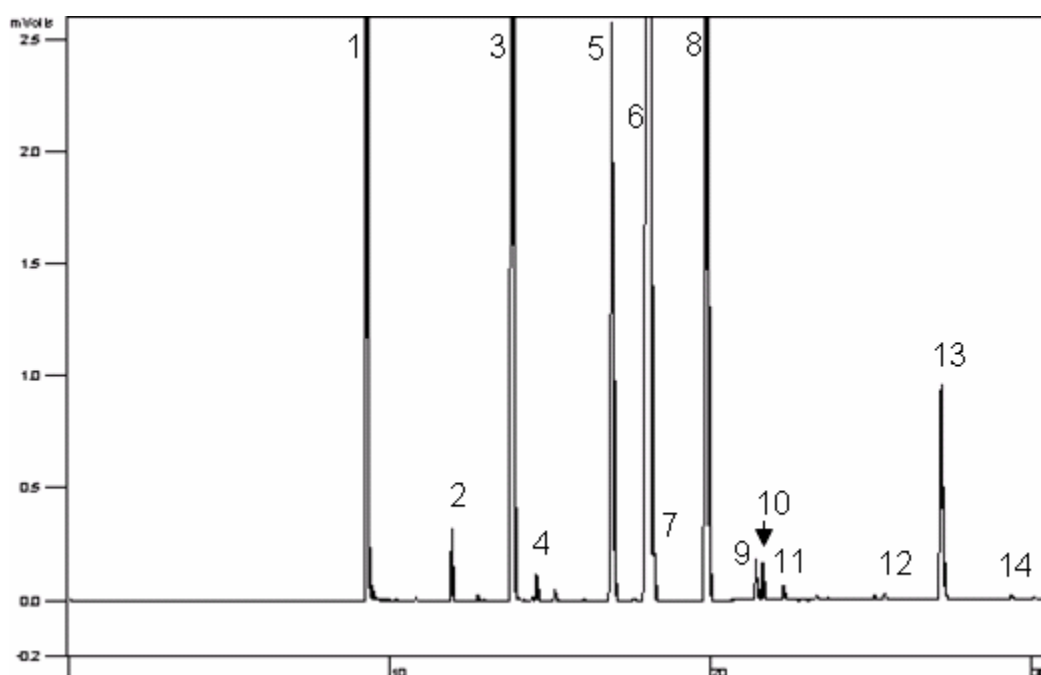


Figura 9. Cromatograma representativo dos EMAG presentes no azeite de dendê obtido pelo método JAC. 1 - Solvente; 2 - C14:0; 3 - C16:0; 4 - C16:1n-9; 5 - C18:0; 6 - C18:1n-9; 7 - C18:1n-7; 8 - C18:2n-6; 9 - C20:0; 10 - C18:3n-3; 11 - C20:1n-9; 12 - C22:0; 13 - C23:0; 14 - C24:0.

Os demais EMAG presentes no azeite de dendê apresentaram concentrações inferiores a 4,00 mg/g, sendo estes: miristato de metila (C14:0), eicosanoato de metila (C20:0), docosanoato de metila (C22:0), tetracosanoato de metila (C24:0) e α - linolenato de metila (C18:3n-3).

5.4. Análise Comparativa da Concentração dos EMAG (mg/g de óleo) obtidos por Diferentes Métodos de Esterificação aplicados ao Azeite de Oliva

Os resultados de EMAG obtidos para o azeite de oliva quando se utilizou diferentes métodos de esterificação estão apresentados na Tabela 7. No azeite de oliva foram quantificados nove EMAG, sendo os componentes principais do azeite de oliva (Figura 10) os ésteres: oleato de metila (C18:1n-9), palmitato de metila (C16:0) e linoleato de metila (C18:2n-6).

A concentração obtida de palmitato de metila com a aplicação dos métodos de esterificação no azeite de oliva diferiu ($p < 0,05$) entre os métodos BAN (100 mg/g) e JHA (105 mg/g), e os resultados para os demais métodos investigados apresentaram concentração intermediária a estes valores.

Dentre os métodos analisados, a concentração determinada de estearato de metila não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$), sendo o valor médio de 29,3 mg/g.

Os métodos de esterificação JHA e SLO foram os que apresentaram o menor rendimento de esterificação para o oleato de metila (741 e 745 mg/g, respectivamente), seguido dos métodos MET, BAN e HLA. Por outro lado, os métodos que se destacaram na reação de esterificação foram: JAC, ISO e BBA com valor médio de 776 mg/g e diferente ($p < 0,05$) dos demais métodos. Estes métodos também se destacaram quando foram aplicados ao azeite de dendê onde o oleato de metila foi determinado em grande quantidade.

A concentração obtida de linoleato de metila para os métodos JAC, ISO e BBA foram superiores (80,4, 80,5 e 80,8 mg/g, respectivamente) e diferente ($p < 0,05$) dos outros métodos. Os métodos MET, BAN e JHA apresentaram concentrações próximas não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$). O método que apresentou o menor rendimento para este EMAG foi HLA com valor de 71,1 mg/g.

Para o α - linolenato de metila, os métodos MET, BAN, HLA e SLO apresentaram valor médio de 5,79 mg/g sendo iguais ($p>0,05$) entre si. Estes valores foram inferiores quando comparado com os demais métodos de esterificação.

Os EMAG: eicosanoato (C20:0), docosanoato (C22:0) e tetracosanoato de metila (C24:0) também foram encontrados no azeite de oliva em quantidade média de 3,78, 1,07 e 0,507 mg/g, respectivamente.

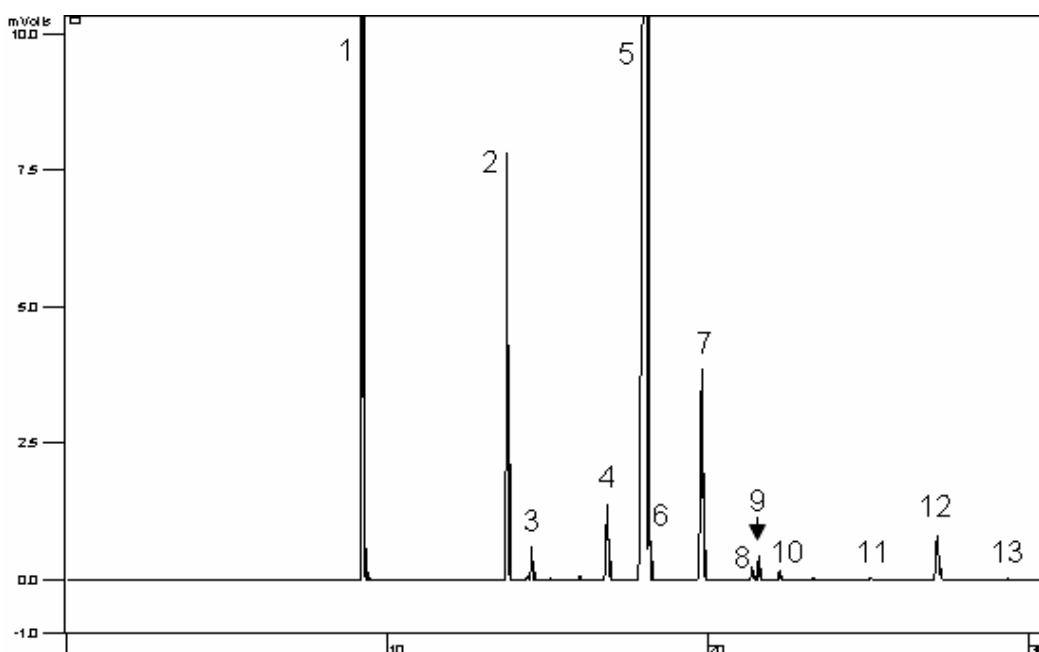


Figura 10. Cromatograma representativo dos EMAG presentes no azeite de oliva obtido pelo método ISO. 1 - Solvente; 2 - C16:0; 3 - C16:1n-9; 4 - C18:0; 5 - C18:1n-9; 6 - C18:1n-7; 7 - C18:2n-6; 8 - C20:0; 9 - C18:3n-3; 10 - C20:1n-9; 11 - C22:0; 12 - C23:0; 13 - C24:0.

5.5. Análise Comparativa da Concentração dos EMAG (mg/g de óleo) obtidos por Diferentes Métodos de Esterificação aplicados ao Óleo de Soja

As concentrações dos EMAG obtidas para o óleo de soja estão presentes na Tabela 8, sendo quantificados quatorze EMAG (Figura 11) tendo como componentes principais os ésteres: linoleato (C18:2n-6), oleato (C18:1n-9) e palmitato de metila (C16:0).

A aplicação dos diferentes métodos de esterificação no óleo de soja não influenciou na concentração determinada do palmitato e do estearato de metila, os quais não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$).

Para o oleato de metila, o método JHA foi o que apresentou a menor concentração de esterificação (200 mg/g) diferindo de todos os outros métodos ($p<0,05$), enquanto com os métodos MET, BAN, HLA e SLO obtiveram-se concentração média de 210 mg/g e foram iguais ($p>0,05$) entre si. No entanto, os métodos que se mostraram mais eficientes para a esterificação foram JAC, ISO e BBA, onde a concentração determinada foi de 218, 219 e 217 mg/g, respectivamente.

No óleo de soja os métodos que se mostraram mais eficientes para a esterificação do linoleato de metila foram os JAC (491), ISO (501) e BBA (490 mg/g), seguido dos demais métodos que não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) entre si tendo uma concentração média de 474 mg/g.

Os métodos que se apresentaram como mais eficientes para esterificação do α - linolenato de metila foram JAC, ISO e BBA apresentaram valor médio de 37,3 mg/g sendo iguais ($p>0,05$) entre si. Estes valores foram superiores e diferentes ($p<0,05$) quando comparado com os demais métodos de esterificação.

Para o δ - linolenato de metila (C18:3n-6), o método que apresentou concentração superior foi MET (8,16), o qual diferiu ($p<0,05$) dos demais métodos, exceto do valor obtido para o método ISO (8,05 mg/g) .

Foi quantificado ainda o eicosanoato de metila (C20:0) em concentração variando desde 10,5 (BAN) a 11,5 (ISO), diferindo entre si ($p<0,05$), como também os ésteres: miristato (C14:0), docosanoato (C22:0) e tetracosanoato (C24:0) em concentrações inferiores a 5,00 mg/g.

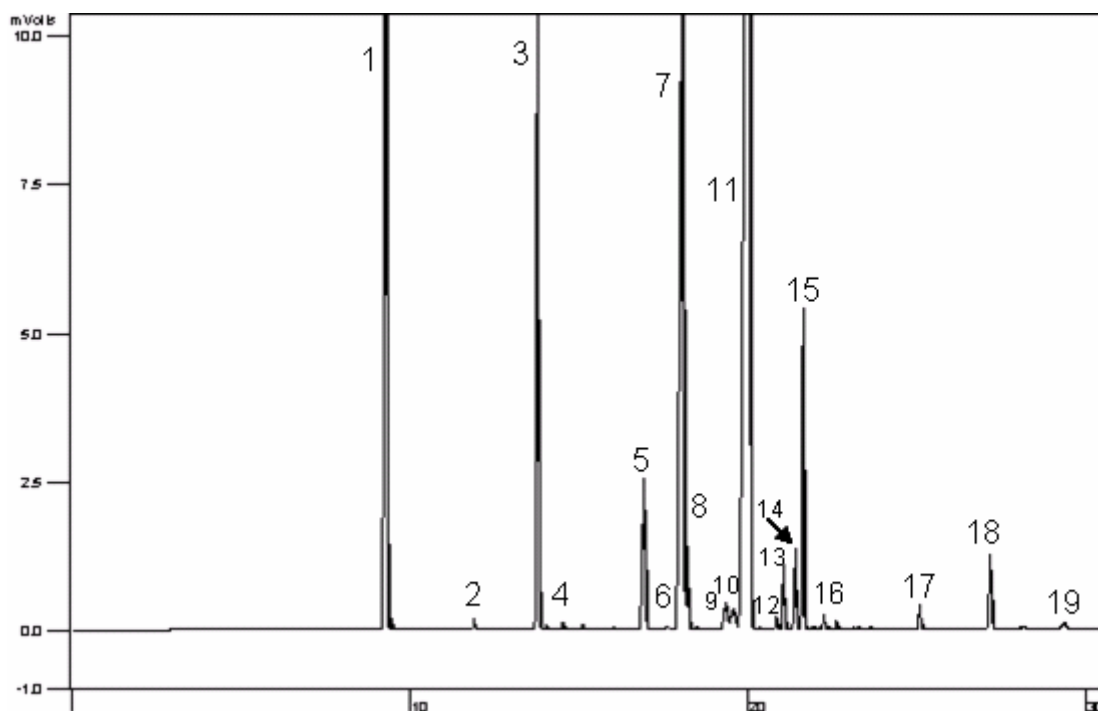


Figura 11. Cromatograma representativo dos EMAG presentes no óleo de soja obtido pelo método ISO. 1 - Solvente; 2 - C14:0; 3 - C16:0; 4 - C16:1n-9; 5 - C18:0; 6 - C18:1t9; 7- C18:1n-9; 8 - C18:1n-7; 9 - C18:2c9t12; 10 - C18:2t9c12; 11- C18:2n-6; 12 - C18:3t9c12t15; 13 - C18:3n-6; 14 - C20:0; 15 - C18:3n-3; 16 - C20:1n-9; 17 - C22:0; 18 - C23:0; 19 - C24:0.

O óleo de soja usado apresentou alguns EMAG *trans* na sua composição devido ao processo de refino submetido na indústria. A concentração do elaidato de metila (C18:1t9) foi de 0,502 para MET, em média de 0,669 para BAN, JAC, HLA, ISO e SLO e de 0,803 mg/g para o método JHA, estes valores foram diferentes ($p < 0,05$) entre si. Através do método BBA não foi possível quantificar este éster metílico. Também foram quantificados os EMAG *trans*: C18:2c9t12 e C18:2t9c12 em concentração inferior e diferente ($p < 0,05$) de 5,90 e 5,28 para o método MET e em média de 7,09 e 6,74 mg/g, respectivamente, para os demais métodos investigados.

5.6. Análise Comparativa da Concentração dos EMAG (mg/g de óleo) obtidos por Diferentes Métodos de Esterificação aplicados ao Óleo de Canola

Os resultados obtidos de EMAG para o óleo de canola estão apresentados na Tabela 9. Foram quantificados treze EMAG neste óleo (Figura 12), sendo os principais componentes ésteres com insaturações na cadeia: oleato (C18:1n-9), linoleato (C18:2n-6) e linolenato de metila (C18:3n-3).

Dentre os métodos analisados, a concentração determinada em mg/g no óleo de canola do palmitato de metila foi estatisticamente igual ($p > 0,05$) entre os métodos MET, BAN, JHA, ISO e BBA sendo o valor médio de 43,3 mg/g e diferente ($p < 0,05$) do valor encontrado para o método JAC (44,9 mg/g).

Para o estearato de metila, o método MET apresentou um valor inferior e igual ($p > 0,05$) apenas ao método SLO, enquanto os métodos JAC, ISO e BBA apresentaram concentrações superiores (21,8, 21,8 e 21,7 mg/g, respectivamente).

A concentração do oleato de metila (em mg/g) obtida após a aplicação dos métodos JHA (562) e SLO (566) foram estatisticamente iguais ($p > 0,05$) entre si e inferiores a todos os outros métodos. Os métodos que apresentaram concentração superior e se destacaram como mais eficientes foram JAC (606), ISO (601) e BBA (599 mg/g), os demais métodos apresentaram valores intermediários e em concentração média de 577 mg/g.

Entre as concentrações determinadas de linoleato de metila pode se observar uma grande variação entre os métodos. Os métodos que apresentaram concentrações inferiores foram HLA (204) e SLO (210 mg/g) e com concentrações superiores se destacaram os métodos JAC (237), ISO (232) e BBA (231 mg/g).

Variações acentuadas também foram observadas nas concentrações obtidas de α - linolenato de metila, onde os valores encontrados foram de: 60,7 (HLA), 62,3 (MET), 66,8 (ISO), 70,2 (BBA) a 73,1 mg/g para o método JAC, sendo estes valores diferentes ($p < 0,05$) entre si. A concentração obtida para os métodos BAN, JHA e SLO foi em média de 61,9 mg/g, não diferindo ($p > 0,05$) dos métodos HLA e MET.

Foram quantificados ainda os ésteres: miristato (C14:0), δ - linolenato (C18:3n6), eicosanoato (C20:0), docosanoato (C22:0) e tetracosanoato de metila (C24:0) em concentrações menores quando comparado com os demais EMAG.

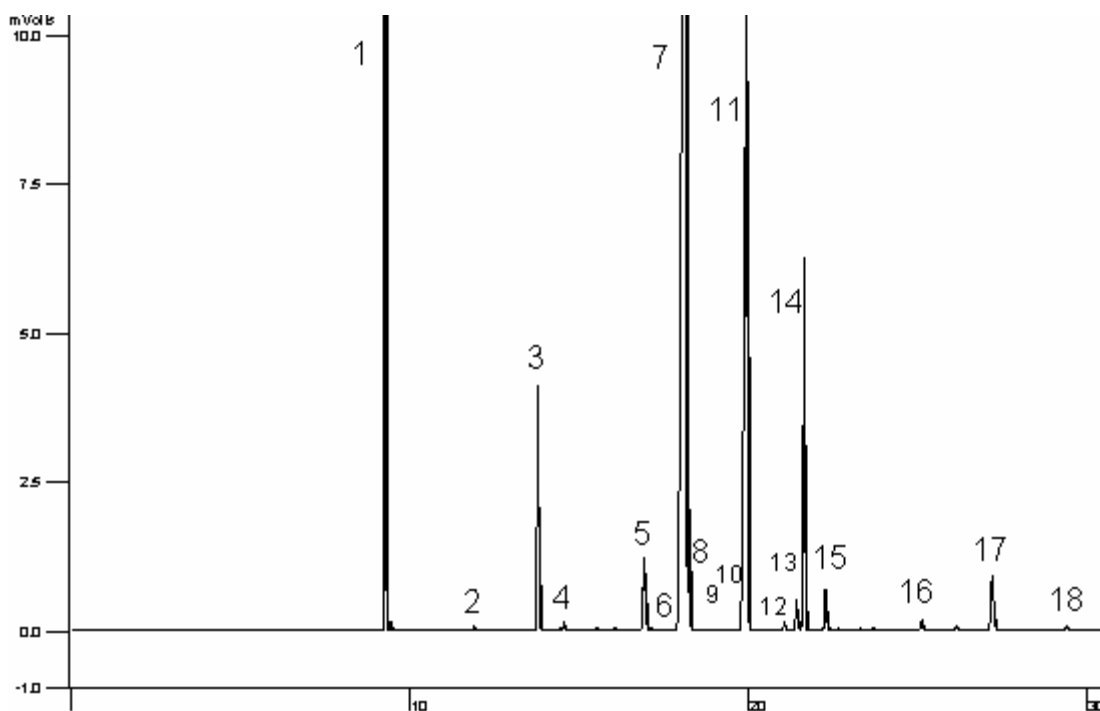


Figura 12. Cromatograma representativo dos EMAG presentes no óleo de canola obtido pelo método ISO. 1 - Solvente; 2 - C14:0; 3 - C16:0; 4 - C16:1n-9; 5 - C18:0; 6 - C18:1 ω ; 7 - C18:1n-9; 8 - C18:1n-7; 9 - C18:2 ω 9t12; 10 - C18:2 ω 9c12; 11 - C18:2n-6; 12 - C18:3n-6; 13 - C20:0; 14 - C18:3n-3; 15 - C20:1n-9; 16 - C22:0; 17 - C23:0; 18 - C24:0.

O óleo de canola também apresentou em sua composição alguns EMAG *trans* devido ao processo de refino submetido na indústria. As concentrações do elaidato de metila foram em média de 0,505 para JAC, HLA, ISO e SLO e de 0,661 mg/g para o método JHA, sendo estes valores diferentes ($p < 0,05$) entre si. Também foram quantificados os EMAG *trans*: C18:2 ω 9t12 e C18:2 ω 9c12 em concentração variando desde 0,540 a 0,801 e de 0,481 mg/g, respectivamente para os métodos investigados.

5.7. Análise Comparativa da Concentração dos EMAG (mg/g de óleo) obtidos por Diferentes Métodos de Esterificação aplicados ao Óleo Linhaça

As concentrações obtidas de EMAG (mg/g de óleo) utilizando óleo de linhaça após aplicação de diferentes métodos de esterificação estão relacionadas na Tabela 10. Foi possível quantificar no óleo de linhaça dez EMAG (Figura 13), sendo os principais ésteres o α - linolenato (C18:3n-3), oleato (C18:1n-9) e linoleato de metila (C18:2n-6).

Os métodos JAC, HLA e JHA apresentaram concentrações para o palmitato de metila superiores (61,1, 61,4 e 61,0 mg/g, respectivamente) e diferente ($p < 0,05$) quando comparado aos demais métodos que tiveram uma concentração média de 59,5 mg/g. Dentre os métodos analisados, a concentração determinada para o estearato de metila variou de 41,2 (MET) a 43,0 mg/g (JAC e ISO) diferindo entre si ($p < 0,05$).

Os métodos que mostraram o melhor rendimento de esterificação para o oleato de metila foram: JAC (185), ISO e BBA (186 mg/g) e as menores concentrações foram obtidas através dos métodos JHA (171) e SLO (178 mg/g), sendo os métodos JAC, ISO e BBA iguais estatisticamente entre si e diferente ($p < 0,05$) dos demais métodos exceto do valor obtido para o método BAN.

As concentrações obtidas para o linoleato de metila foram superiores para os métodos JAC (132), ISO (133) e BBA (129), não havendo diferença ($p > 0,05$) entre JAC e ISO. Os métodos que apresentaram concentrações inferiores e diferentes ($p < 0,05$) foram: HLA (121) e SLO (124 mg/g) e os demais métodos (MET, BAN e JHA) apresentaram concentrações intermediárias com valor médio de 123 mg/g.

Analisando as concentrações obtidas para o α - linolenato de metila, os métodos que se destacaram como sendo os mais eficientes foram JAC (577) e ISO (576 mg/g), seguido dos métodos JHA e BBA (554 e 559 mg/g, respectivamente). O método que se mostrou menos eficiente para a esterificação do α - linolenato de metila foi MET com valor de 432 mg/g.

Alguns ésteres como: miristato (C14:0), δ - linolenato (C18:3n-6), eicosanoato (C20:0), docosanoato (C22:0) e tetracosanoato de metila (C24:0) também foram quantificados no óleo de linhaça em concentrações menores quando comparado com os demais EMAG.

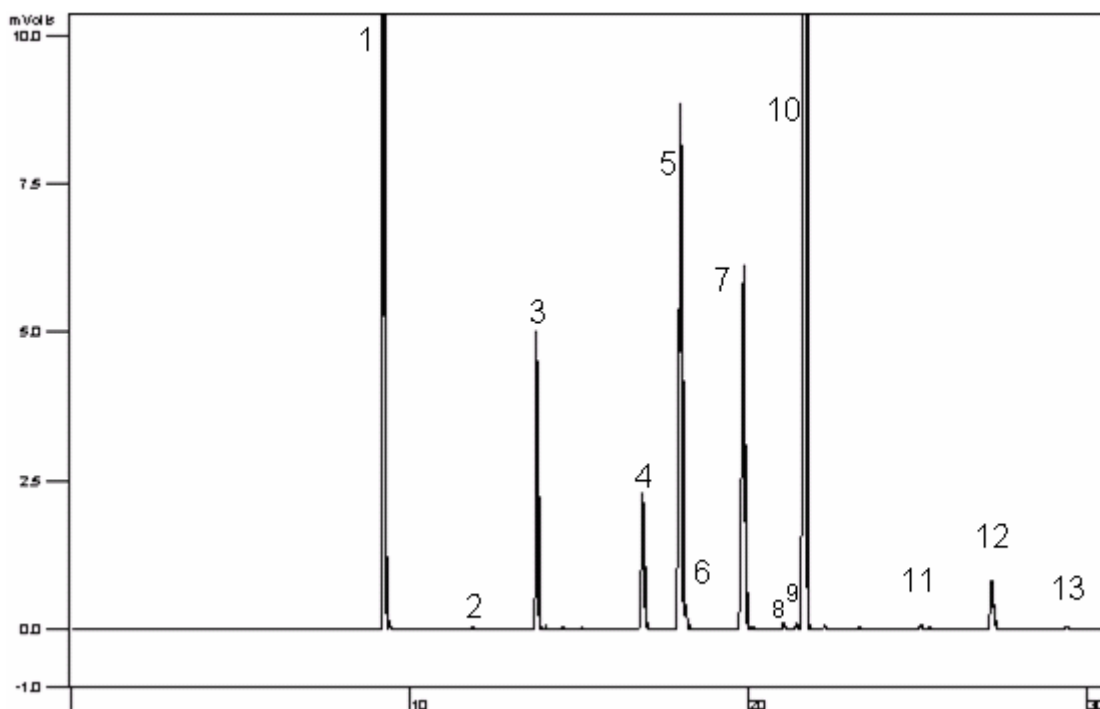


Figura 13. Cromatograma representativo dos EMAG presentes no óleo de linhaça obtido pelo método ISO. 1 - Solvente; 2 - C14:0; 3 - C16:0; 4 - C18:0; 5- C18:1n-9; 6 - C18:1n-7; 7- C18:2n-6; 8 - C18:3n-6; 9 - C20:0; 10 - C18:3n-3; 11 - C22:0; 12 - C23:0; 13 - C24:0.

5.8. Análise da Influência dos Diferentes Métodos de Esterificação sobre os principais EMAG Saturados (C16:0 e C18:0) presentes nos diversos Óleos Vegetais Analisados

A Figura 14 refere-se à concentração obtida de palmitato de metila através dos diferentes métodos de esterificação. Pode-se observar que para concentrações presentes nos óleos de canola, linhaça, soja e oliva, houve pouca influência dos métodos na quantificação deste metil éster. No entanto, quando analisado no azeite de dendê, onde a concentração foi superior a 350 mg/g, houve uma maior variação na concentração obtida através dos diferentes métodos.

Analisando os métodos MET, BAN e JAC que utilizam em seus procedimentos o mesmo reagente (BF_3 em metanol) e diferem principalmente no tempo de aquecimento na etapa de esterificação (2, 3 e 30 minutos, respectivamente), verifica-se que essa diferença no tempo de aquecimento pode estar relacionada com o fato dos métodos MET e BAN terem apresentado concentração de palmitato de metila superior quando comparado ao método JAC. Considerando que o tempo de aquecimento de 30 minutos, pode levar a volatilização do palmitato de metila.

Os métodos HLA, ISO e SLO se mostraram mais eficientes para a esterificação do palmitato de metila quando comparado com os demais métodos estudados. O fato dos métodos ISO e SLO (catalise básica) terem apresentado valores de concentração próximos ao obtido por método de catalise ácida (HLA) está diretamente relacionado com a baixa acidez dos óleos estudados neste trabalho.

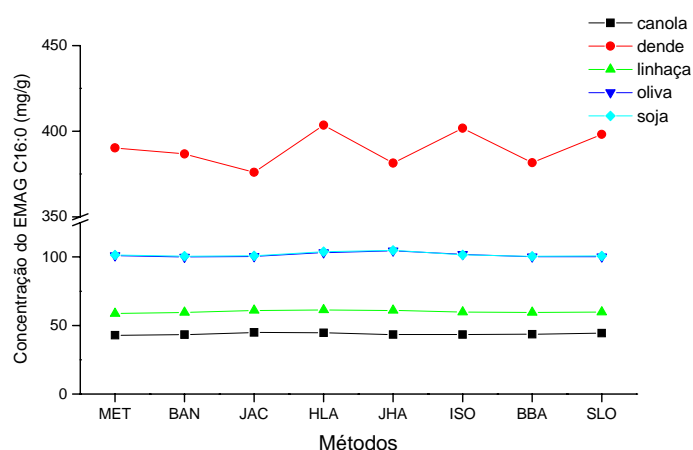


Figura 14. Concentração de palmitato de metila (C16:0) obtida por diferentes métodos de esterificação para os diversos óleos vegetais analisados.

Contudo, o método HLA apresenta como desvantagem quando comparado com os métodos ISO e SLO o tempo e o número de etapas envolvidas na reação de esterificação, uma vez que esta reação ocorre em duas etapas (saponificação – esterificação), o que aumenta o tempo de análise dos EMAG.

Dentre os três métodos considerados mais eficientes, o método ISO envolve menor número de etapas e não envolve etapa de aquecimento. No entanto, em termos de quantificação com uso de padrão interno, o método da

ISO depende de uma quantidade elevada de padrão interno, uma vez que se torna necessário manter uma razão entre massa de amostra e massa de padrão interno e, como o método utiliza 1,0 g de amostra, este fato aumenta o custo da análise.

Para o estearato de metila (Figura 15) presente nos óleos vegetais em menor concentração quando comparado com o palmitato de metila, pode-se observar que os métodos de esterificação não influenciaram na determinação quantitativa. Provavelmente a posição em que os ácidos saturados se encontram no triacilglicerol (*sn-1* e *sn-3*) pode ter contribuído para este resultado, pois o ataque do nucleófilo no carbono carbonílico pode acontecer mais facilmente.

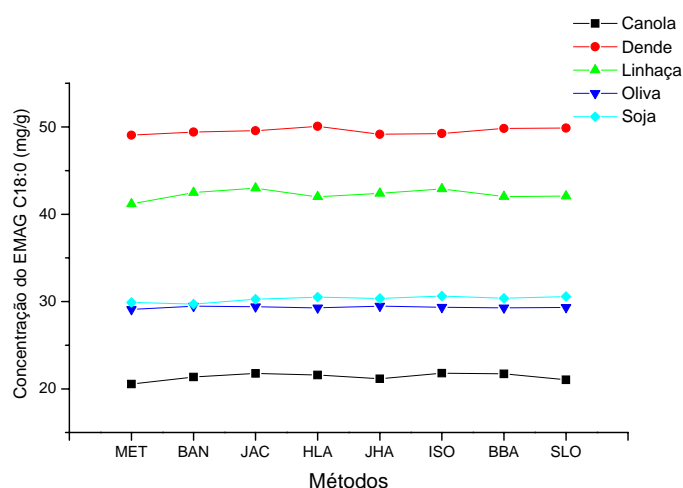


Figura 15. Concentração de estearato de metila (C18:0) obtida por diferentes métodos de esterificação para os diversos óleos vegetais analisados.

5.9. Análise da influência dos diferentes métodos de esterificação sobre os principais EMAG insaturados (C18:1n-9, C18:2n-6 e C18:3n-3) presentes nos diversos óleos vegetais analisados

O principal EMAG monoinsaturado presente nos óleos vegetais analisados foi o oleato de metila mostrado na Figura 16.

O fato de o método JHA ter apresentado concentração inferior pode estar relacionado com a presença de água, pois o método propõe o uso de HCl aquoso, que pode ter provocado hidrólise. No entanto, deve ser considerado

que o método JHA utiliza como catalisador HCl em metanol, apresentando como vantagem em relação aos métodos que empregam BF_3 o baixo custo e a disponibilidade deste reagente.

O método SLO também apresentou concentração menor para o oleato de metila e isto pode ter correlação com o reagente de esterificação usado (tetrametilguanidina em metanol) e com o tempo de aquecimento de apenas dois minutos. Estes dois fatores podem ter contribuído para a baixa concentração deste EMAG, provavelmente por impedimento estérico devido ao tamanho da molécula da tetrametilguanidina e as distorções na cadeia dos ácidos graxos insaturados e também pelo tempo de aquecimento empregado, que pode não ter sido suficiente para a esterificação completa do oleato de metila.

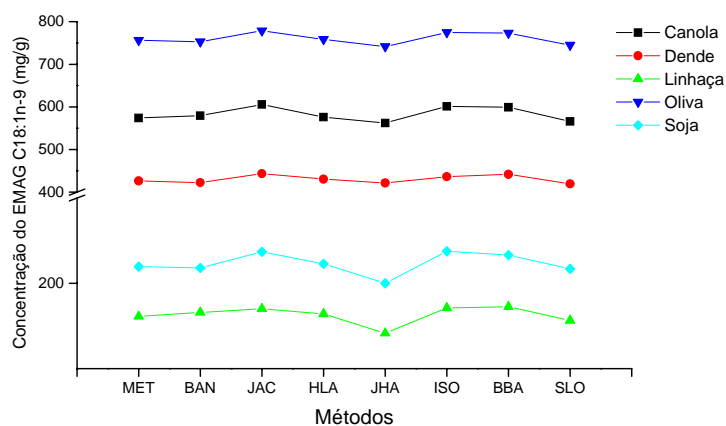


Figura 16. Concentração de oleato de metila (C18:1n-9) obtida por diferentes métodos de esterificação para os diversos óleos vegetais analisados.

Os métodos MET, BAN e HLA apresentaram concentrações próximas de oleato de metila nos óleos vegetais analisados, porém foram inferiores quando comparado com os valores obtidos com os métodos JAC, ISO e BBA.

Como descrito anteriormente, os métodos MET e BAN utilizam os mesmos reagentes, porém um tempo de aquecimento pequeno com relação ao método JAC, o que pode ter contribuído para esse resultado inferior, uma vez que este tempo pode não ter sido suficiente para a esterificação total do oleato de metila. Deve ser considerado também que o método BAN foi proposto e estudado para esterificação de ácidos graxos de cadeia menor.

A Figura 17 mostra a concentração do linoleato de metila obtida por diferentes métodos de esterificação para todos os óleos analisados.

Verificou-se que nos diferentes óleos estudados a concentração do linoleato de metila foi inferior quando se utilizou o método HLA, isto provavelmente pode ter ocorrido devido ao tempo de aquecimento na etapa de esterificação (3 minutos) e a posição em que se encontram os ácidos graxos no triacilglicerol (posição *sn-2*).

No entanto, mesmo o método HLA tendo apresentado concentração inferior de linoleato de metila, deve ser considerado que o método HLA utiliza como catalisador $H_2SO_4 - NH_4Cl$ em metanol, apresentando como vantagem em relação aos métodos que empregam BF_3 o baixo custo e a disponibilidade deste reagente.

O método SLO também apresentou concentração inferior para o linoleato de metila e isto pode ter ocorrido por impedimento estérico devido ao tamanho da molécula do reagente e as distorções na cadeia dos ácidos graxos insaturados e também pelo tempo de aquecimento empregado, como relatado para o oleato de metila.

Os métodos que se mostraram mais eficientes para o oleato de metila também se destacaram para o linoleato de metila sendo estes JAC, ISO e BBA.

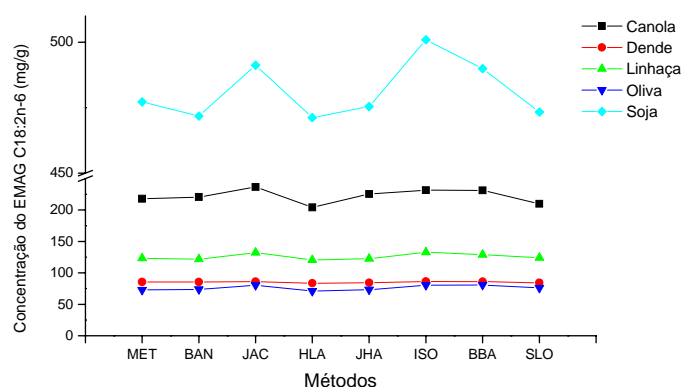


Figura 17. Concentração de linoleato de metila (C18:2n-6) obtida por diferentes métodos de esterificação para os diversos óleos vegetais analisados.

As concentrações obtidas de α - linolenato de metila para os diferentes óleos analisados estão na Figura 18.

Como observado para o α - linolenato de metila quando presente em maior concentração (óleo de linhaça), os métodos que apresentaram menor eficiência foram MET, BAN e HLA, provavelmente devido ao tempo insuficiente de aquecimento na etapa de esterificação, como já foi descrito.

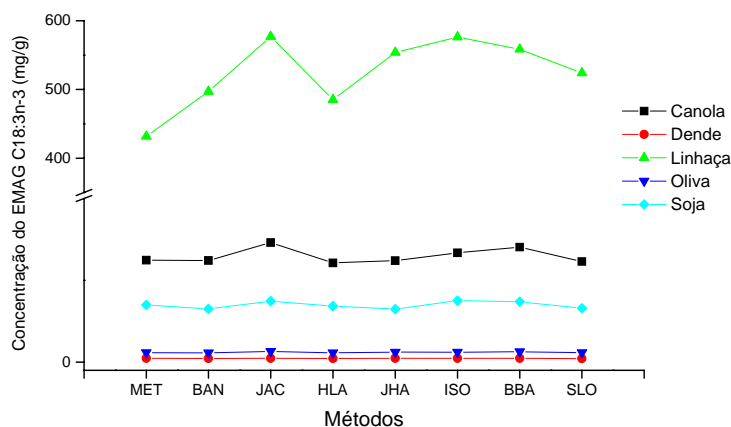


Figura 18. Concentração de α - linolenato de metila (C18:3n-3) obtida por diferentes métodos de esterificação para os diversos óleos vegetais analisados.

Os métodos que se mostraram mais eficientes para o oleato de metila e para o linoleato de metila, também se destacaram para o α - linolenato de metila. Analisando estes métodos JAC, ISO e BBA que se mostraram eficientes para a esterificação dos principais ácidos graxos insaturados presentes nos óleos vegetais, podemos relacionar este fato com a baixa acidez dos óleos e as etapas do procedimento destes métodos.

No método ISO, utiliza-se primeiro o solvente (n-heptano) para solubilizar o óleo e em seguida adiciona-se a base em metanol. Este fato pode ter contribuído para os resultados obtidos, pois o fato do óleo estar disperso no solvente pode ter facilitado a reação de esterificação, uma vez que este método não utiliza aquecimento, apenas agitação após a adição do catalisador. Este fato também foi relatado por Glass (1971). Esta mesma observação pode ser aplicada ao método BBA, pois o catalisador usado (metóxido de sódio) está em solução de dietil éter.

Quando comparado o método JAC (que utiliza BF_3 em metanol e um longo tempo de aquecimento) com os métodos ISO e BBA, observa-se que o método JAC tem um menor consumo de reagente, no entanto, o reagente usado (BF_3) é extremamente tóxico, apresenta custo elevado e tempo de vida

útil limitado. Assim, os métodos ISO e BBA que utilizam reagentes de menor toxicidade e custo podem ser usados ao invés do método JAC.

Os resultados discutidos acima mostram que o método a ser escolhido para análise de ácidos graxos pode depender além de outros fatores já citados anteriormente, também da composição do óleo a ser estudado.

5.10. Análise da Influência dos Diferentes Métodos de Esterificação sobre os principais EMAG analisados através do Teste de Adição e Recuperação

Os resultados obtidos de recuperação relativa para os padrões de tripalmitina (TG 16:0) e triestearina (TG 18:0) adicionados ao óleo de canola e submetidos à aplicação de diferentes métodos de esterificação estão relacionados nas Tabelas 11 e 12, respectivamente.

A avaliação da recuperação dos triacilgliceróis foi realizada pela adição de padrão interno (tricosanoato de metila). Este procedimento é recomendado devido à análise simultânea do analito e do padrão interno (Cantellops *et al.*, 1999). Estes resultados mostram a eficiência dos métodos de esterificação para a tripalmitina e triestearina, podendo deste modo aplicar um método que seja de menor custo, toxicidade e envolva um menor tempo de análise.

Tabela 11. Recuperação relativa do padrão tripalmitina (TG 16:0) adicionado no óleo de canola e submetido à aplicação dos diferentes métodos de esterificação*.

Método**	Quantidade na Amostra	Quantidade Adicionada	Quantidade no Spike	Quantidade Recuperada	% Recuperação
MET	6,12	3,48	9,04	2,92	95,2
BAN	6,10	3,48	8,82	2,72	93,1
JAC	1,23	1,19	2,29	1,07	96,0
HLA	9,00	5,04	13,5	4,44	96,7
JHA	1,41	0,625	1,94	0,529	96,2
ISO	23,2	12,7	33,3	10,1	93,8
BBA	6,32	6,95	12,4	6,08	94,5
SLO	-	-	-	-	-

*Resultados expressos como média de triacilgliceróis realizadas em três repetições por adição de padrão interno.
 **Métodos descritos por Metcalfe *et al.*, 1966 (MET); Bannon *et al.*, 1982 (BAN), Joseph e Ackman, 1992 (JAC); Hartman e Lago, 1973 (HLA); Jham *et al.*, 1982 (JHA); ISO 5509, 1978 (ISO); Bannon *et al.*, 1982 (BBA); Schuchardt e Lopes, 1988 (SLO). Resultados expressos como média de três repetições injetadas em duplicata.

Tabela 12. Recuperação relativa do padrão triestearina (TG 18:0) adicionado no óleo de canola e submetido à aplicação dos diferentes métodos de esterificação*.

Método**	Quantidade na Amostra	Quantidade Adicionada	Quantidade no Spike	Quantidade Recuperada	% Recuperação
MET	2,92	1,49	4,11	1,19	94,1
BAN	2,93	1,49	4,29	1,36	98,1
JAC	0,579	0,259	0,786	0,207	94,7
HLA	4,36	1,98	5,92	1,55	94,2
JHA	0,658	0,294	0,921	0,263	97,7
ISO	10,8	4,94	14,6	3,78	93,6
BBA	2,99	3,01	5,65	2,66	95,2
SLO	-	-	-	-	-

*Resultados expressos como média de triacilgliceróis realizadas em três repetições por adição de padrão interno.

**Métodos descritos por Metcalfe *et al.*, 1966 (MET); Bannon *et al.*, 1982 (BAN), Joseph e Ackman, 1992 (JAC); Hartman e Lago, 1973 (HLA); Jham *et al.*, 1982 (JHA); ISO 5509, 1978 (ISO); Bannon *et al.*, 1982 (BBA); Schuchardt e Lopes, 1988 (SLO). Resultados expressos como média de três repetições injetadas em duplicata.

Na Tabela 13 estão os resultados obtidos de recuperação relativa ao tricostanoato de metila do padrão de trioleína adicionado ao óleo de linhaça e submetido à aplicação dos diferentes métodos.

Os dados mostram a eficiência dos métodos para a esterificação da trioleína, exceto o método JHA que apresentou um percentual de recuperação de apenas 89,5. Esta menor eficiência também foi observada na quantificação do oleato de metila nos óleos vegetais.

O teste de adição e recuperação não foi realizado pelo método SLO para os padrões de tripalmitina, triestearina e trioleína devido à perda por vazamento durante a aplicação do método de esterificação e a falta de padrão para repetir este procedimento.

Tabela 13. Recuperação relativa do padrão trioleína (TG 18:1n-9) adicionado no óleo de linhaça e submetido à aplicação dos diferentes métodos de esterificação*.

Método**	Quantidade na Amostra	Quantidade Adicionada	Quantidade no Spike	Quantidade Recuperada	% Recuperação
MET	26,8	12,6	37,8	11,0	97,0
BAN	29,3	12,6	40,3	11,0	97,2
JAC	6,02	1,98	7,89	1,87	99,7
HLA	37,1	17,0	50,8	13,7	94,9
JHA	6,76	2,54	8,24	1,48	89,5
ISO	92,1	29,3	115	23,1	95,9
BBA	29,1	12,6	41,7	12,6	101,0
SLO	-	-	-	-	-

*Resultados expressos como média de triacilgliceróis realizadas em três repetições por adição de padrão interno.

**Métodos descritos por Metcalfe *et al.*, 1966 (MET); Bannon *et al.*, 1982 (BAN), Joseph e Ackman, 1992 (JAC); Hartman e Lago, 1973 (HLA); Jham *et al.*, 1982 (JHA); ISO 5509, 1978 (ISO); Bannon *et al.*, 1982 (BBA); Schuchardt e Lopes, 1988 (SLO). Resultados expressos como média de três repetições injetadas em duplicata.

Os dados obtidos de recuperação relativa ao tricosanoato de metila para o padrão de trilinoleína e trilinolenina adicionados ao óleo de oliva e submetidos à aplicação de diferentes métodos estão nas Tabelas 14 e 15, respectivamente.

O valor de recuperação para o método HLA foi inferior a todos os métodos (85,9 %), como também na concentração determinada nos óleos analisados. Os demais métodos apresentaram valores próximos, sendo superiores para os métodos JAC e BBA (100,7 %).

O teste de adição não foi realizado para o método ISO devido à quantidade de linoleato de metila presente no óleo de oliva que dependeria de uma grande quantidade de padrão a ser adicionada.

Tabela 14. Recuperação relativa do padrão trilinoleína (TG 18:2n-6) adicionado no azeite de oliva e submetido à aplicação dos diferentes métodos de esterificação*.

Método**	Quantidade na Amostra	Quantidade Adicionada	Quantidade no Spike	Quantidade Recuperada	% Recuperação
MET	10,6	5,02	14,7	4,13	95,3
BAN	11,1	5,02	15,6	4,41	97,2
JAC	2,26	1,02	3,27	1,01	100,7
HLA	16,9	7,01	20,3	3,45	85,9
JHA	2,89	1,21	3,71	0,815	91,4
ISO	-	-	-	-	-
BBA	12,2	5,02	17,2	4,97	100,7
SLO	18,9	8,00	25,2	6,30	94,6

*Resultados expressos como média de triacilgliceróis realizadas em três repetições por adição de padrão interno.

**Métodos descritos por Metcalfe *et al.*, 1966 (MET); Bannon *et al.*, 1982 (BAN), Joseph e Ackman, 1992 (JAC); Hartman e Lago, 1973 (HLA); Jham *et al.*, 1982 (JHA); ISO 5509, 1978 (ISO); Bannon *et al.*, 1982 (BBA); Schuchardt e Lopes, 1988 (SLO). Resultados expressos como média de três repetições injetadas em duplicata.

Os métodos que apresentaram os menores percentuais de recuperação para a trilinolenina foram MET (87,0), BAN (85,8), HLA (84,4) e SLO (88,6). Esses métodos também apresentaram menor rendimento para o linolenato de metila obtido para os óleos vegetais analisados (Figura 10).

Os resultados mostraram a eficiência dos métodos JAC, ISO e BBA para a esterificação da trilinolenina, como foi observado também para os padrões de trilinoleína e trioleína.

Tabela 15. Recuperação relativa do padrão trilinolenina (TG 18:3n-3) adicionado no azeite de oliva e submetido à aplicação dos diferentes métodos de esterificação*.

Método**	Quantidade na Amostra	Quantidade Adicionada	Quantidade no Spike	Quantidade Recuperada	% Recuperação
MET	0,848	0,429	1,09	0,241	87,0
BAN	0,858	0,429	1,08	0,224	85,8
JAC	0,185	0,090	0,249	0,064	92,3
HLA	1,38	0,588	1,62	0,249	84,4
JHA	0,243	0,090	0,308	0,065	94,3
ISO	3,14	1,48	4,39	1,25	97,0
BBA	0,961	0,429	1,31	0,353	96,4
SLO	1,45	0,753	1,91	0,464	88,6

*Resultados expressos como média de triacilgliceróis realizadas em três repetições por adição de padrão interno.

**Métodos descritos por Metcalfe *et al.*, 1966 (MET); Bannon *et al.*, 1982 (BAN), Joseph e Ackman, 1992 (JAC); Hartman e Lago, 1973 (HLA); Jham *et al.*, 1982 (JHA); ISO 5509, 1978 (ISO); Bannon *et al.*, 1982 (BBA); Schuchardt e Lopes, 1988 (SLO). Resultados expressos como média de três repetições injetadas em duplicata.

Através dos resultados do teste de adição e recuperação relativa ao tricosenoato de metila foi possível confirmar a exatidão dos métodos de esterificação analisados e confirmar os dados de quantificação realizados nos óleos estudados.

6. CONCLUSÕES

A determinação do índice de acidez dos óleos vegetais permitiu entender melhor os resultados obtidos a partir da aplicação dos métodos de catálise ácida e básica.

A avaliação do fator resposta experimental apresentou boa concordância com o valor do fator resposta teórico mostrando que o equipamento utilizado estava otimizado.

Os resultados mostram a eficiência dos métodos de esterificação para os principais ácidos graxos saturados: C16:0 e C18:0 presentes nos óleos vegetais, podendo deste modo aplicar um método de menor custo, toxicidade e tempo de análise.

Os métodos MET e BAN apresentaram resultados semelhantes e inferiores quando comparado com outros métodos para os ésteres metílicos insaturados, fato que pode estar relacionado com o tempo de aquecimento empregado nestes métodos.

O método SLO também apresentou concentração inferior para os ésteres metílicos insaturados. Isto pode ter ocorrido por impedimento estérico devido ao tamanho da molécula do reagente e as distorções na cadeia dos ácidos graxos insaturados e também pelo tempo de aquecimento empregado.

O método JHA apresentou valor baixo para o oleato de metila. No entanto, deve ser considerado que o método JHA utiliza como catalisador HCl em metanol, apresentando como vantagem em relação aos métodos que empregam BF_3 o baixo custo e a disponibilidade deste reagente.

Verificou-se também que nos diferentes óleos estudados a concentração do linoleato de metila foi inferior quando se utilizou o método HLA. Contudo, o método HLA utiliza como catalisador $\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{NH}_4\text{Cl}$ em metanol, apresentando como vantagem em relação aos métodos que empregam BF_3 o baixo custo, menor toxicidade.

Os três métodos que se mostraram mais eficientes para a esterificação dos ácidos graxos insaturados foram: JAC, ISO e BBA. Logo, quando comparado o método JAC (que utiliza BF_3 em metanol e um longo tempo de aquecimento) com os métodos ISO e BBA, observa-se que o método JAC tem um menor consumo de reagente, no entanto, o reagente usado (BF_3) é extremamente tóxico, apresenta custo elevado e tempo de vida útil limitado. Assim, os métodos ISO e BBA que utilizam reagentes de menor toxicidade e custo podem ser usados ao invés do método JAC.

Os resultados obtidos mostram que o método a ser escolhido para a análise de ácidos graxos pode depender além de outros fatores citados anteriormente, também da composição do óleo a ser estudado.

Através dos resultados do teste de adição e recuperação foi possível confirmar a exatidão dos métodos de esterificação analisados e confirmar os dados de quantificação realizados nos óleos estudados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ackman, R. G.; Sipos, J. C. (1964). Application of specific response factors in the gas chromatography analysis of methyl esters of fatty acids with flame ionization detectors. *Journal American Oil Chemical Society*, 41, 377-378.
- Ackman, R. G. (1972). The analysis of fatty acids and related materials by gas-liquid chromatography. *Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids*, 167-269.
- Ackman, R. G. (1998). Remarks on official methods employing boron trifluoride in the preparation of methyl esters of the fatty acids of fish oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75 (4), 541-545.
- ACS-American Chemical Society (1980). Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in Environmental Chemistry. *Analytical Chemistry*, 52, 2242-2249.
- Adolfo Lutz (3ª ed.) (1985). *Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. IMESP, São Paulo. 1, 260-261.
- Akok, C. C.; Min, D. B. (1998). *Food Lipids*. New York: Marcel Dekker. 19-20.
- Albertyn, D. E.; Bannon, C. D.; Craske, J. D.; Hai, N. T.; O'Rourke, K. L.; Szonyi, C. (1982). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. I: Optimization of flame ionization detectors with respect to linearity. *Journal of Chromatography*, 247, 47-61.
- Aveldano, M. I.; Horrocks, L. A. (1983). Quantitative release of fatty acids from lipids by a simple hydrolysis procedure. *Journal of Lipid Research*, 24, 1101-1105.
- Bannon, C. D.; Craske, J. D.; Hai, N. T.; Harper, N. L.; O'Rourke, K. L. (1982a). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. II. Methylation of fats and oils with boron trifluoride methanol. *Journal of Chromatography*, 247, 63-69.

- Bannon, C. D.; Breen, G. J.; Craske, J. D.; Hai, N. T.; Harper, N. L.; O'Rourke, K. L. (1982b). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. III. Literature review of and investigations into the development of rapid procedures for the methoxide-catalysed methanol of fats and oils. *Journal of Chromatography*, 247, 71-89.
- Bannon, C. D.; Craske, J. D.; hilliker, A. E. (1986). Analysis of fatty acid methyl esters with high accuracy and reliability. V. Validation of theoretical relative response factors of insaturated estres in the flame ionization detector. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 63 (1), 105-110.
- Barnwal, B.K.; Sharma, M. P. (2005). Prospects of biodiesel production from vegetable oils in India. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 9, 363-378.
- Bondioli, P. (2004). The preparation of fatty acid esters by means of catalytic reactions. *Topics in Catalysis*, 27 (1-4), 77-82.
- Boocock, D. G. B.; Konar, S. K.; Mao, V.; Sidi, H. (1996). Fast one-phase oil-rich processes for the preparation of vegetable oil methyl esters. *Biomass and Bioenergy*, 11 (1), 43-50.
- Boskou, D. (1996). *Olive oil: chemistry and technology*. In: Turatti, J. M.; Gomes, R. A. R. e Athié, I.. *Lipídeos: Apectos funcionais e novas tendências*. Campinas: ITAL.
- Brockhoff, H. A (1965). Stereospecific analysis of triglycerides. *Journal of Lipid Research*, 6, 10-15.
- Brondz, I. (2002). Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, 465, 1-37.
- Cantellops, D.; Reid, A. P.; Eitenmiller, R. R.; Long, A. R. (1999). Determination of lipids in infant formula powder by direct extraction methylation of lipids and fatty acid methyl esters (FAME) analysis by gas chromatogaphy. *Journal of AOAC International*, 82 (5), 1128-1139.

- Cetinkaya, M.; Karaosmanoglu, F. (2004). Optimization of base-catalysed transesterification reaction of used cooking oil. *Energy & Fuels*, 18, 1888-1895.
- Christie, W. W. (1982). A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl ester. *Journal of Lipid Research*, 23, 1072-1075.
- Christie, W. W. (1989). *Gas chromatography and Lipids: A practical guide*. Dundee: The oily Press Ltd.
- Christie, W. W. (1993). *Advances in Lipid Methodology – II*. Dundee: The oily Press Ltd.
- Christie, W. W. (2005). Disponível em: www.lipidlibrary.co.uk. Acesso em: 17/02/2006.
- Coleman, M. H. (1961). Further studies on the pancreatic hydrolysis of some natural fats. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 38 (12), 685-688.
- Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. (2006). *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas-SP: Editora Unicamp.
- Coultrate, T. P. (Ed 3) (2004). *Alimentos: A química de seus componentes*. Porto Alegre: Artmed, 63-94.
- Craske, J. D.; Bannon, C. D. (1987). Gas liquid chromatography analysis of the fatty acid composition of fats and oils: A total system for high accuracy. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 64 (10), 1413-1417.
- Curi, R.; Pompéia, C.; Miyasaka, C. K.; Procopio, J. (2002). *Entendendo a gordura: Os ácidos graxos*. Barueri-SP: Editora Manole, 5-40.
- Darnoko, D.; Cheryan, M. (2000). Kinetics of palm oil transesterification in a batch reactor. *Journal of American Oil Chemical Society*, 77, 1263-1267.
- De Souza, N. E.; Visentainer, J. V. (2006). *Colesterol da mesa ao corpo*. São Paulo-SP: Editora Varela, 7-8

- Dorado, M. P.; Ballesteros, E.; Mittelbach, M.; López, F. J.; Mittelbach, M. (2004a). Optimization of Alkali-catalyzed of *Brassica carinata* oil for biodiesel production. *Energy & Fuels*, 18, 77-83.
- Dorado, M. P.; Ballesteros, E.; Mittelbach, M.; López, F. J. (2004b). Kinetic parameters affecting the alkali-catalyzed transesterification process of used olive oil. *Energy & Fuels*, 18, 1457-1462.
- Drozd, J. (1975). Chemical derivatization in gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 113, 303-356.
- Dugan Jr., L.R.; McGinnis, G. W.; Vadehra, D. V. (1966). Low temperature direct methylation of lipids in biological materials. *Lipids*, 1 (5), 305-308.
- Eder, K. (1995). Gas chromatography analysis of fatty acid methyl esters. *Journal of chromatography B*, 671, 113-131.
- Fennema, O. R., (Ed3.). (1996). *Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker. 226-312.
- Filip, V.; Zajic, J.; Smidrkal, J. (1992). Methanolysis of rapeseed oil triglycerides. *Revue Francaise des Corps Gras*, 39 (3-4), 91-94.
- Freedman, B.; Pryde, E. H.; Mounts, T. L. (1984). Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61 (10), 1638-1643.
- Freedman, B.; Kwolek, W. F.; Pryde, E. H. (1986). Quantitation in the analysis of transesterified soybean oil by capillary gas chromatography. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 63 (10), 1370-1375.
- Fulk, W. K.; Shorb, M. S. (1970). Production of an artifact during methanolysis of lipids by boron trifluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, 11 (3), 276-277.
- Geris, R.; Santos, N. A. C.; Amaral, B. A.; Maia, I. S.; Castro, V. D.; Carvalho, J. R. M. (2007). Biodiesel de soja – Reação de transesterificação para aulas práticas de química. *Química Nova*, 30 (5), 1369-1373.
- Glass, R. L. (1971). Alcoholysis, saponification and the preparation of fatty acid methyl esters. *Lipids*, 6 (12), 919-925.

- Goodrum, J. W. (2002). Volatility and boiling points of biodiesel from vegetable oils and tallow. *Biomass and Bioenergy*, 22, 205-211.
- Gutnikov, G. (1995). Fatty acid profiles of lipid samples. *Journal of Chromatography B*, 671, 71-89.
- Hartman, L.; Lago, R. C. A. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. *Lab. Pract*, 22, 474-476.
- Hornstein, I.; Alford, J. A.; Elliott, L. E.; Crowe, P. F. (1960). Determination of free fatty acids in fat. *Analytical Chemistry*, 32 (4), 540-542.
- International Organization for Standardization (ISO 5509). (1978) *Animal and vegetable fats and oils – Preparation of methyl esters of fatty acids*. International Organization for Standardization – ISO, 1-6.
- Jeyashoke, N.; Krisnangkura, K.; Chen, S. (1998). Microwave induced rapid transmethylation of fatty acids for analysis of food oil. *Journal of Chromatography A*, 818, 133-137.
- Jham, G. N.; Teles, F. F. F.; Campos, L. G. (1982). Use of Aqueous HCl/MeOH as Esterification Reagent for Analysis of Fatty Acids Derived from Soybean. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 59 (3), 132-133.
- Joseph, J. D.; Ackman, R. G. (1992). Capillary column gas-chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oil ethyl-esters - Collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75 (3), 488-506.
- Kishimoto, Y.; Radin, N. S. (1965). A reaction tube for methanolysis; instability of hydrogen chloride in methanol. *Journal of Lipid Research*, 6, 435-436.
- Klopfenstein, W. E. (1971). On methylation of unsaturated acids using boron trihalide-methanol reagents. *Journal Lipid Research*, 12, 773-776.
- Lima, E. S.; Abdalla, D. S. P. (2002). High-performance liquid chromatography of fatty acids in biological samples. *Analytica Chimica Acta*, 465, 81-91.
- Lino. (2000). Una oleaginosa con historia. *Aceites & Grasas*, 10 (38), 59-72.
- López, D. E.; Goodwin Jr, J. G.; Bruce, D. A.; Lotero, E. (2005). Transesterification of triacetin with methanol on solid acid and base catalysts. *Applied Catalysis A: General*, 295, 97-105.

- Lotero, E.; Liu, Y.; Lopez, D. E.; Suwannakarn, K.; Bruce, D. A.; Goodwin Jr, J. G. (2005) Synthesis of biodiesel via acid catalysis. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 44, 5353-5363.
- Lough, A. K.; Felinski, L.; Garton, G. A. (1964). The production of methyl esters of fatty acids as artifacts during the extraction or storage of tissue lipids in the presence of methanol. *Journal of Lipid Research*, 3 (4), 478.
- Martin, C. A. (2006). *Otimização da metodologia para a determinação de ácidos graxos trans em alimentos empregando cromatografia em fase gasosa*. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Martin, C. A.; Milinsk, M. C.; Visentainer, J. V.; Matsushita, M.; De Souza, N.E. (2007a) Trans fatty acid process forming: a review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79, 343-350.
- Martin, C. A.; Oliveira, A. N. de; Oliveira, C. C.; Matsushita, M.; Visentainer, J. V.; De Souza, N.E. (2007b). Fatty acid contents of Brazilian soybean oils with emphasis on trans fatty acids. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 18, 1-10.
- Meher, L. C.; Sagar, D. V.; Naik, S. N. (2006a). Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 10, 248-268.
- Meher, L. C.; Dharmagadda, V. S. S.; Naik, S. N. (2006b). Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Pongamia pinnata* oil for production of biodiesel. *Bioresource Technology*, 97, 1392-1397.
- Meier, S.; Mjos, S. A.; Joensen, H.; Grahl-Nielsen, O. (2006). Validation of a one-step extraction/methylation method for determination of fatty acids and cholesterol in marine tissues. *Journal of Chromatography A*, 1104, (291-298).
- Metcalf, L. D.; Schmitz, A. A. (1961). The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatography analysis. *Analytical Chemistry*, 33 (3) 363-364.

- Metcalfe, L. D.; Schmitz, A. A.; Pelka, J. R. (1966). Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, 38 (3) 514-515.
- Metcalfe, L. D.; Wang, C. N. (1981). Rapid preparation of fatty acid methyl esters using organic base-catalysed transesterification. *Journal of Chromatography Science*, 19, 530-535.
- Moretti, R. B. (1999). Alimentos funcionais: uma panacéia mundial. In: Turatti, J. M.; Gomes, R. A. R. e Athié, I. (2002). *Lipídeos: Apectos funcionais e novas tendências*. Campinas: ITAL. 17-24.
- Moretto, E.; Fett, R.; Gonzaga, L. V.; Kuskoski, E. M. (2002). *Introdução à ciência de alimentos*. Florianópolis-SC: Editora da UFSC. 107-108.
- Morrison, R.; Boyd, R. (13^a Ed) (1996). *Química Orgânica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 809-851.
- Morrison, W. R.; Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, 5 (4), 600-608.
- Nawar, W. W. (1996). Lipids. In: Fenema, O. R. (editor). *Food Chemistry*. New York: Marcel Dekker.
- Pardee, A. M.; Reid, E. E. (1920). In: Glass, R. L. (1971). Alcoholysis, saponification and the preparation of fatty acid methyl esters. *Lipids*, 6 (12), 919-925.
- Peene, J.; Zeeuw, J.; Biermans, F.; Joziassse, L. (2003). Disponível em: http://www.varianinc.com/image/vimage/docs/products/consum/gccolumns/select/shared/Pitt2003_300_8P_FAME.pdf. Acesso em: 04/07/2006.
- Ramos, L. P.; Domingos, A. K.; Kucek, K. T.; Wilhelm, H. M. (2003). Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. *Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento*, 31, 28-37.
- Rinaldi, R.; Garcia, C.; Marciniuk, L. L.; Rossi, A. V.; Schuchardt, U. (2007). Síntese de biodiesel: Uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. *Química Nova*, 30 (5), 1374-1380.

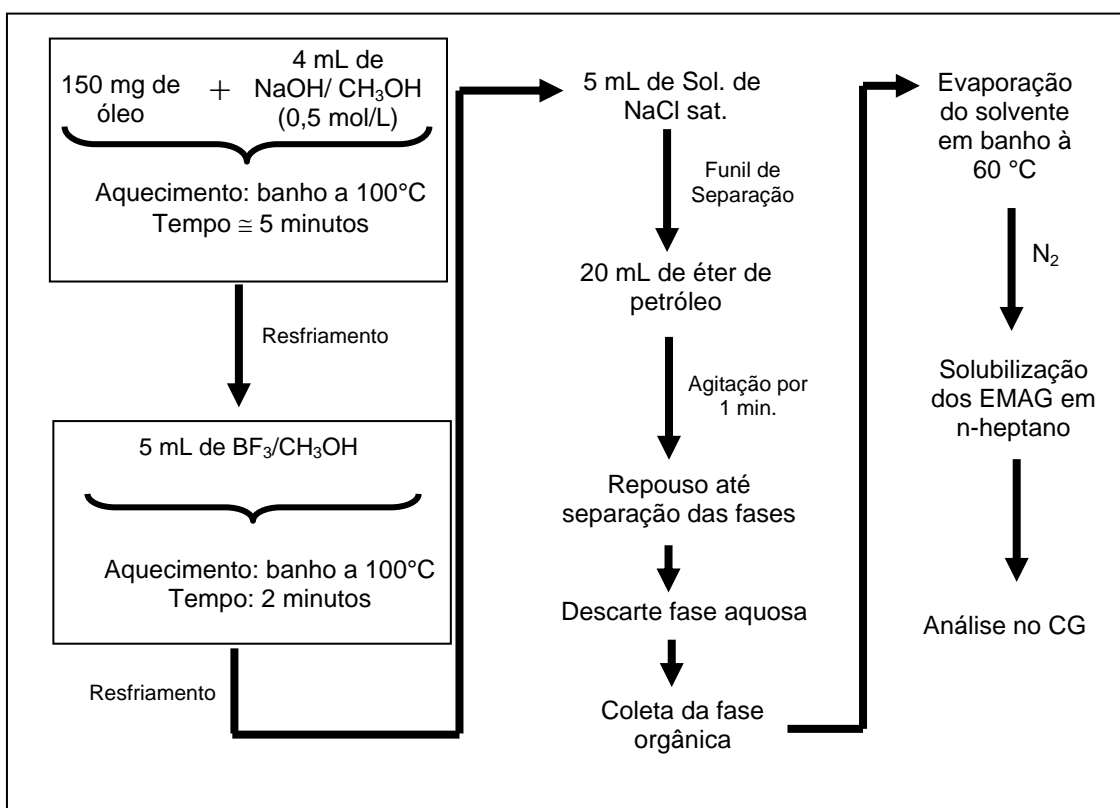
- Rogozinski, M. (1964a). A rapid quantitative esterification technique for carboxylic acids. *Journal of Gas Chromatography*, April, 136-137.
- Rogozinski, M. (1964b). The methanol – sulfuric acid esterification methods II. An improved extraction procedure. *Journal of Gas Chromatography*, October, 328-329.
- Rosenfeld, J. M. (2002). Application of analytical derivatizations to the quantitative and qualitative determination of fatty acids. *Analytica Chimica Acta*, 465, 93-100.
- Sanches-Silva, A.; Quirós, A. R. B.; López-Hernández, J.; Paseiro-Losada, P. (2004). Comparison between high-performance liquid chromatography and gas chromatography methods for fatty acid identification and quantification in potato crisps. *Journal of Chromatography A*, 1032, 7-15.
- Schreiner, M. (2005). Quantification of long polyunsaturated fatty acids by gas chromatography: Evaluation of factors affecting accuracy. *Journal of Chromatography A*. 1095, 126-130.
- Schreiner, M.; Hulan, H. W. (2004). Determination of the carbon deficiency in the flame ionization detector response of long-chain fatty acid methyl esters and dicarboxylic acid dimethyl esters. *Journal of Chromatography A*. 1045, 197-202.
- Schuchardt, U.; Lopes, O. C. (1988). Tetramethylguanidine catalysed transesterification of fats and oils: A new method for rapid determination of their composition. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 65 (12), 1940-1941.
- Schuchardt, U.; Vargas, R. M.; Gelbard, G. (1996). Transesterification of soybean oil catalyzed by alkylguanidines heterogenized on different substituted polystyrenes. *Journal of Molecular Catalysis A: General*, 109, 37-44.
- Schuchardt, U.; Sercheli, R.; Vargas, R. M. (1998). Transesterification of vegetable oils: a Review. *Journal Brazilian Chemical Society*, 9 (3), 199-210.

- Seppanen-Laakso, T.; Laakso, I.; Hiltunen, R. (2002). Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*, 465, 39-62.
- Shanta, N. C.; Napolitano, G. E. (1992). Gas chromatography of fatty acids. *Journal of Chromatography B*, 624, 37-51.
- Solomons, G.; Fryhle, C. (7^a Ed) (2002). *Química Orgânica - Vol 2*. Rio de Janeiro-RJ: Editora LCT.
- Sommerfeld, M (1983). *Trans* unsaturated fatty acids in natural products and processed foods. *Progress of Lipid Research*, 22, 221-233.
- Statistica, (2005). *Statistica 7.0 Software*. StatSoft, Tucksa.
- Stoffel, W.; Chu, F.; Ahrens, E. H. (1959). Analysis of long-chain fatty acids by gas-liquid chromatography - micromethod for preparation of methyl esters. *Analytical Chemistry*, 31 (2), 307-308.
- Stransky, K.; Jursik, T.; Vitek, A. (1997). Standard equivalent chain length values of monoenic and polyenic (methylene interrupted) fatty acids. *Journal of High Resolution Chromatography*, 20, 143-158.
- Thompson, R. H. (1996). Simplifying fatty acid analyses in multicomponent foods with a standard set of isothermal GLC conditions coupled with ECL determinations. *Journal of Chromatography Science*, 34, 495-504.
- Toyama, Y.; Tsuchiya, T.; Ishikawa, T. (1933). *In*: Glass, R. L. (1971). Alcoholysis, saponification and the preparation of fatty acid methyl esters. *Lipids*, 6 (12), 919-925.
- Turatti, J. M.; Gomes, R. A. R.; Athié, I. (2002). *Lipídeos: Apectos funcionais e novas tendências*. Campinas: ITAL. 17-24.
- Tvrzická, E.; Vecka, M.; Stanková, B.; Zák, A. (2002). Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection: Quantitative aspects. *Analysis Chimica Acta*, 465, 337-350.
- Ulberth, F.; Schrammel, F. (1995). Accurate quantitation of short, medium, and long-chain fatty acid methyl esters by split-injection capillary gas-liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 704, 455-463.

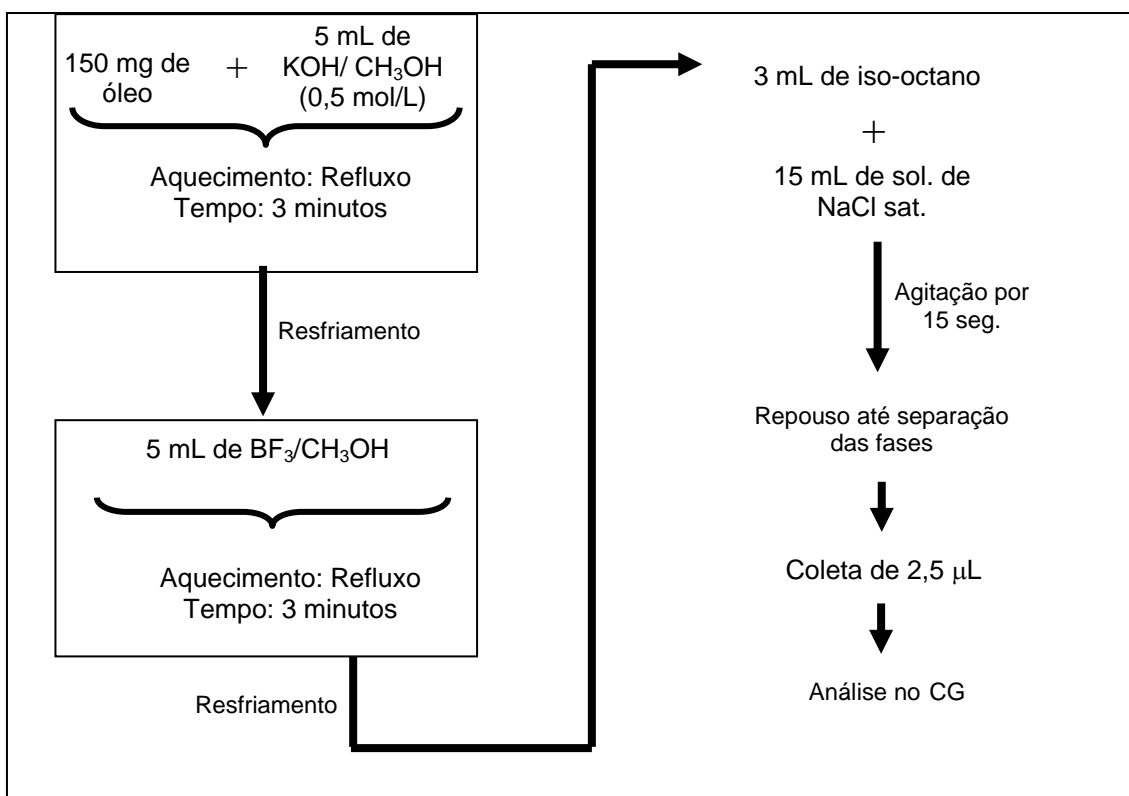
- Vanderwal, R. J. (1964). Triglyceride structure. *Advances in Lipid Research*, 2, 1-66.
- Vicente, G.; Martínez, M. e Aracil, J. (2004). Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysis systems. *Bioresource Technology*, 92, 297-305.
- Visentainer, J. V. e Franco, M. R. B. (2006). *Ácidos graxos em óleos e gorduras: Identificação e Quantificação*. São Paulo: Varela. 36-117.
- Vorbeck, M. L.; Mattick, L. R.; Lee, F. A. e Pederson, C. S. (1961). Preparation of methyl esters of fatty acids for gas-liquid chromatography: Quantitative comparison of methylation techniques. *Analytical Chemistry*, 33 (11), 1512-1514.
- Xie, W.; Peng, H. e Chen, L. (2006). Transesterification of soybean oil catalyzed by potassium loaded on alumina as a solid-base catalyst. *Applied Catalysis A: General*, 300, 67-74.
- Zheng, S.; Kates, M.; Dubé, M. A. e McLean, D. D. (2006). Acid-catalyzed production of biodiesel from waste frying oil. *Biomass and Bioenergy*, 30, 267-272.

Anexos

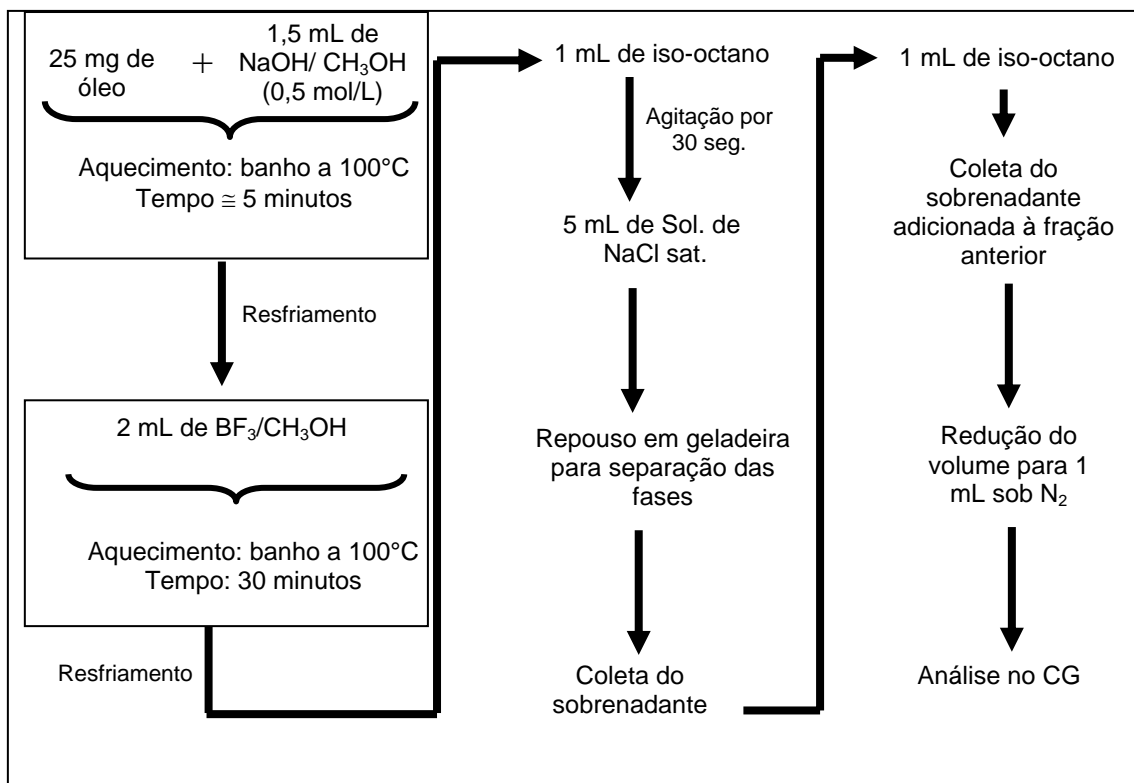
Anexo I: Fluxograma dos métodos de esterificação usados neste trabalho.



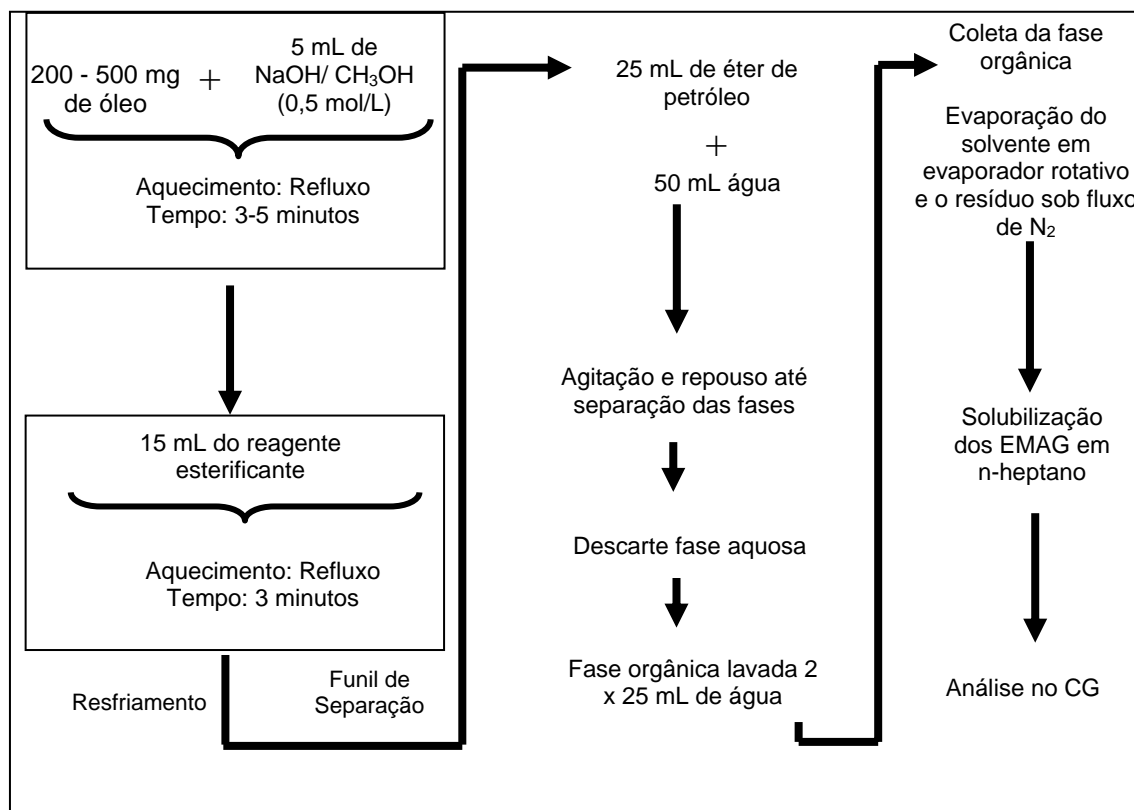
Fluxograma do método descrito por Metcalfe *et al.*, 1966 (MET)



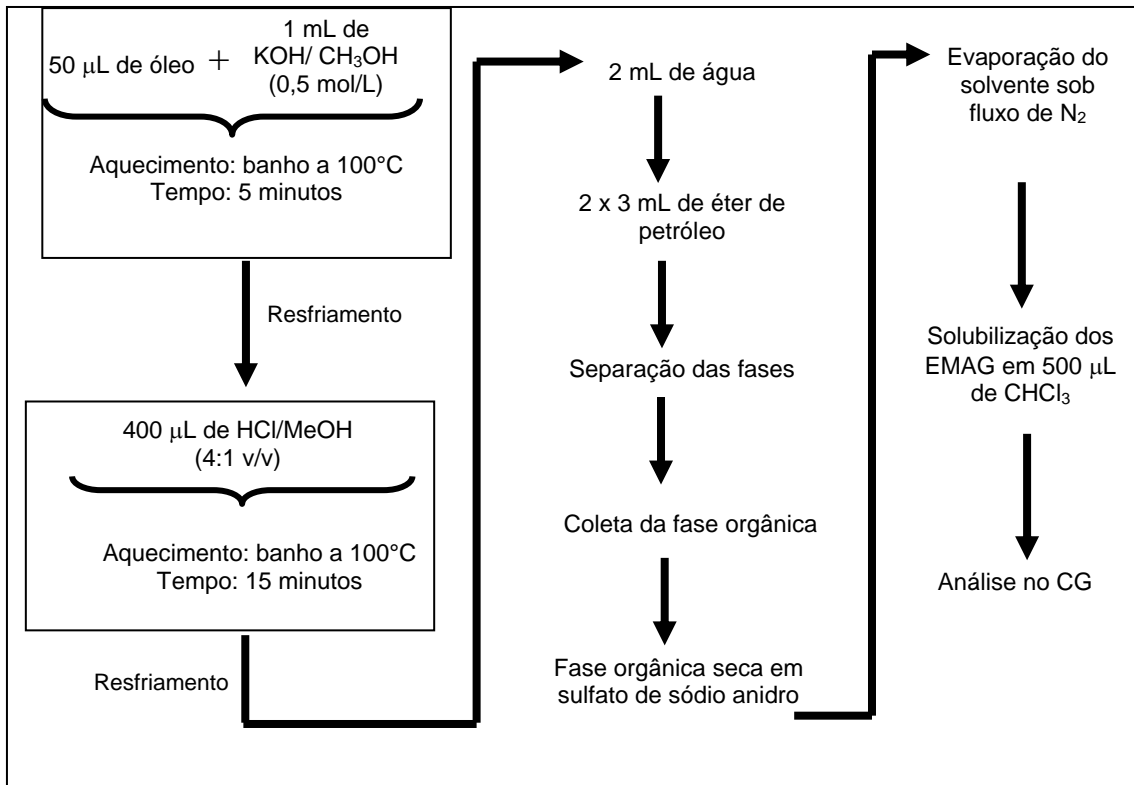
Fluxograma do método descrito por Bannon *et al.*, 1982a (BAN)



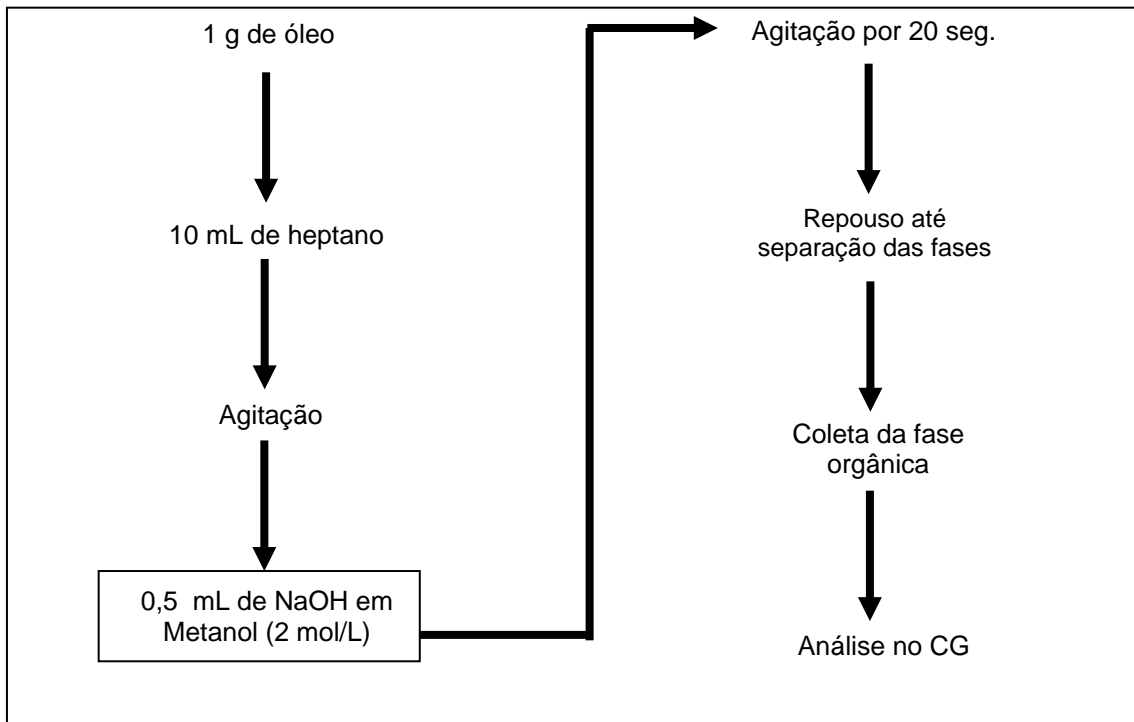
Fluxograma do método descrito por Joseph e Ackman, 1992 (JAC)



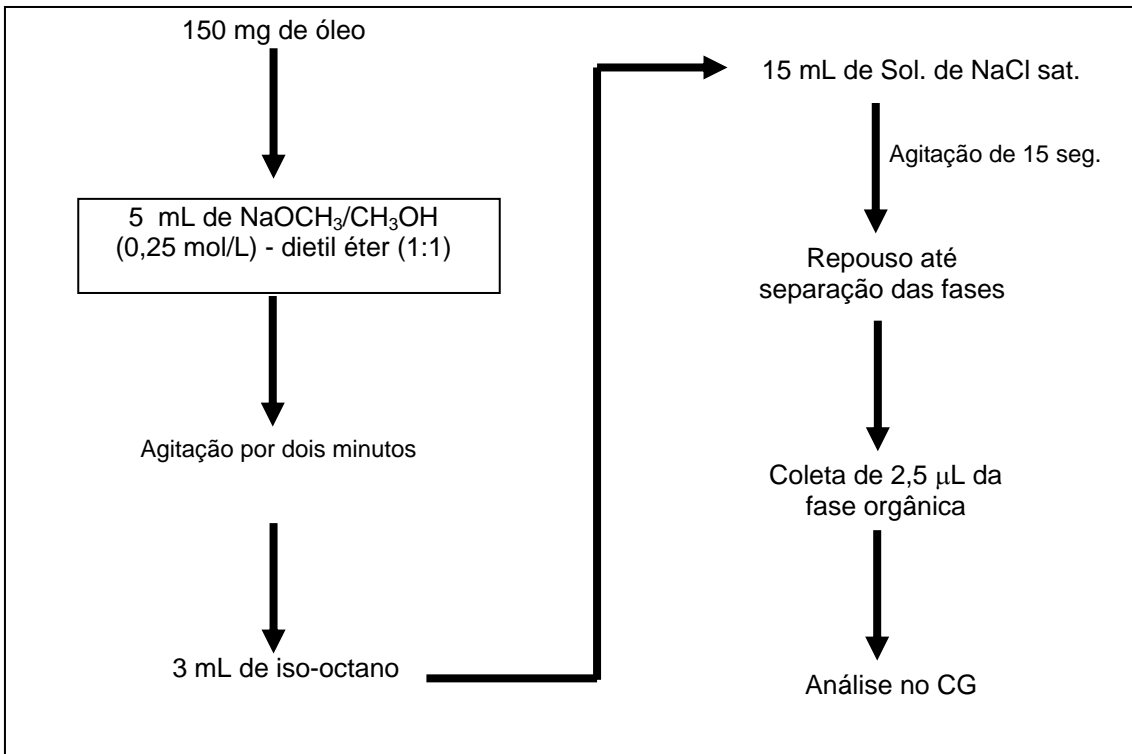
Fluxograma do método descrito por Hartman e Lago, 1973 (HLA)



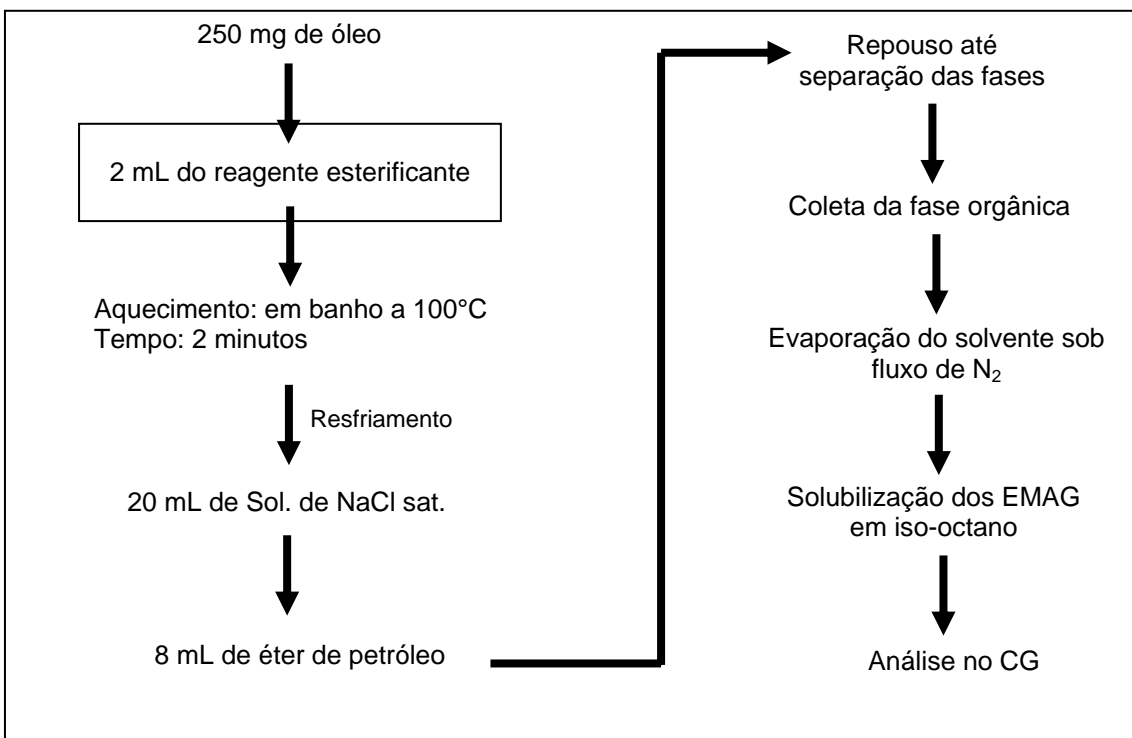
Fluxograma do método descrito por Jham *et al.*, 1982 (JHA)



Fluxograma do método descrito pela ISO, 1978 (ISO)

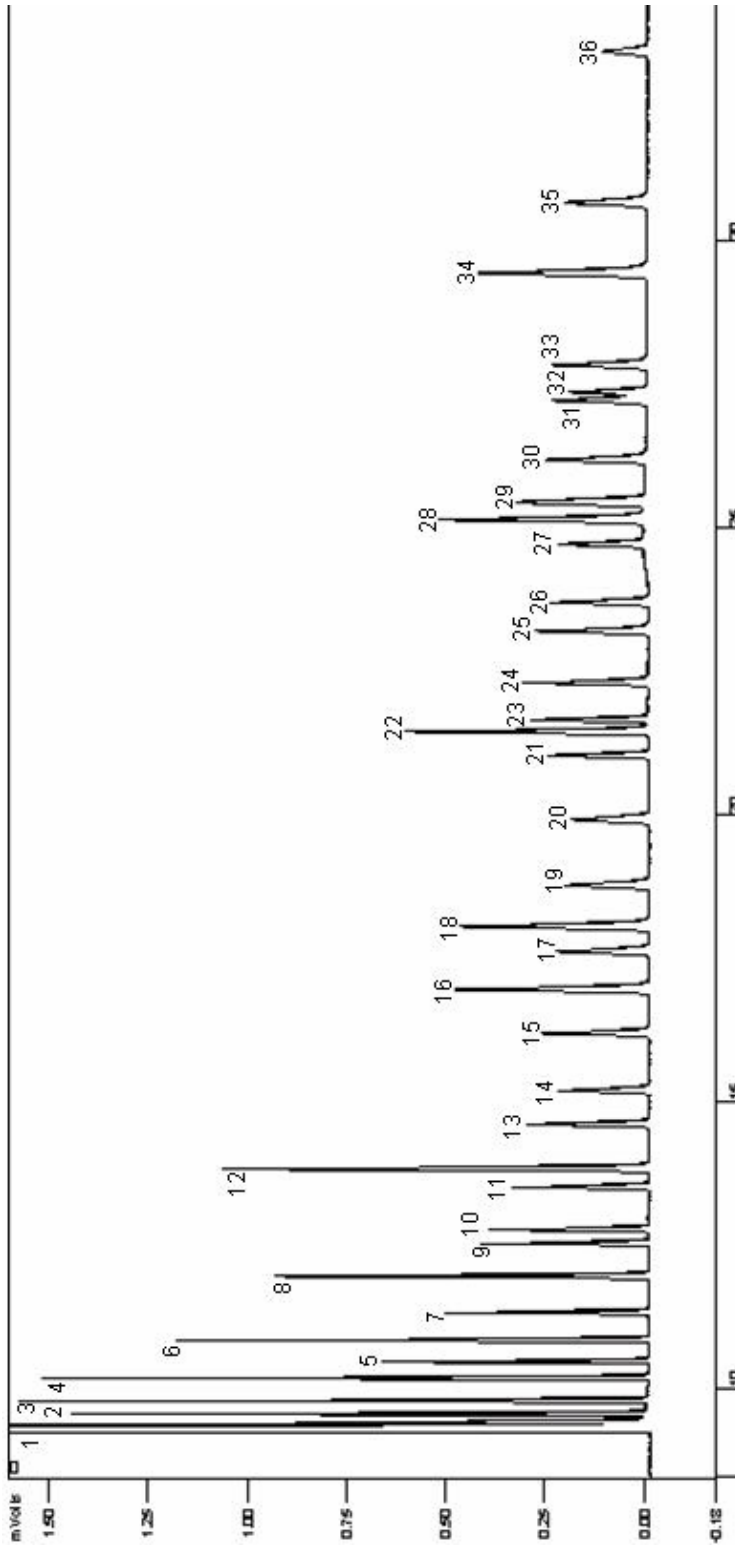


Fluxograma do método descrito por Bannon *et al.*, 1982b (BBA)



Fluxograma do método descrito por Schuchardt e Lopes, 1988 (SLO)

Anexo II: Cromatograma referente a uma mistura de padrões da marca Sigma usado para identificação dos EMAG nas amostras de óleos vegetais.



- 1:** Solvente + C4:0; **2:** C6:0; **3:** C8:0; **4:** C10:0; **5:** C11:0; **6:** C12:0; **7:** C13:0; **8:** C14:0; **9:** C14:1; **10:** C15:0; **11:** C15:1; **12:** C16:0; **13:** C16:1; **14:** C17:0; **15:** C17:1; **16:** C18:0; **17:** C18:1; **18:** C18:1n9; **19:** C18:2; **20:** C18:2n6; **21:** C18:3n6; **22:** C20:0; **23:** C18:3n3; **24:** C20:1n9; **25:** C21:0; **26:** C22:2n6; **27:** C20:3n6; **28:** C22:0; **29:** C20:3n3 + C20:4n6; **30:** C22:1n9; **31:** C23:0; **32:** C20:5n3; **33:** C22:2n6; **34:** C24:0; **35:** C24:1n9; **36:** C22:6n3.

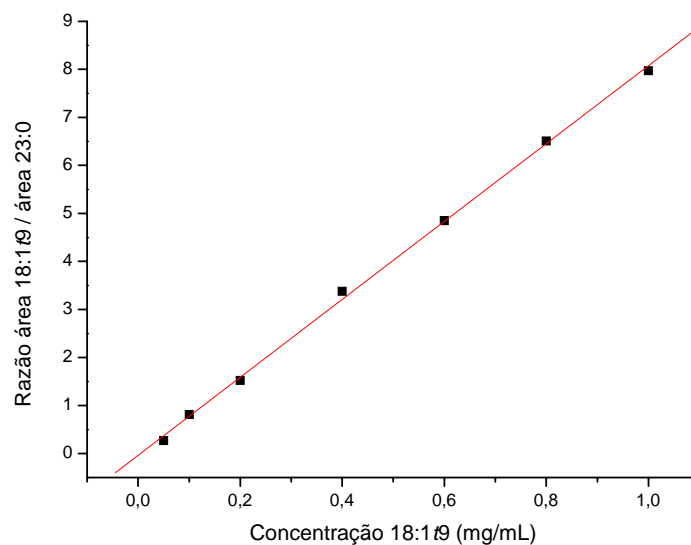
Anexo III: Valores de ECL calculados a partir do tempo de retenção corrigido de EMAG dos óleos vegetais, padrões e literatura.

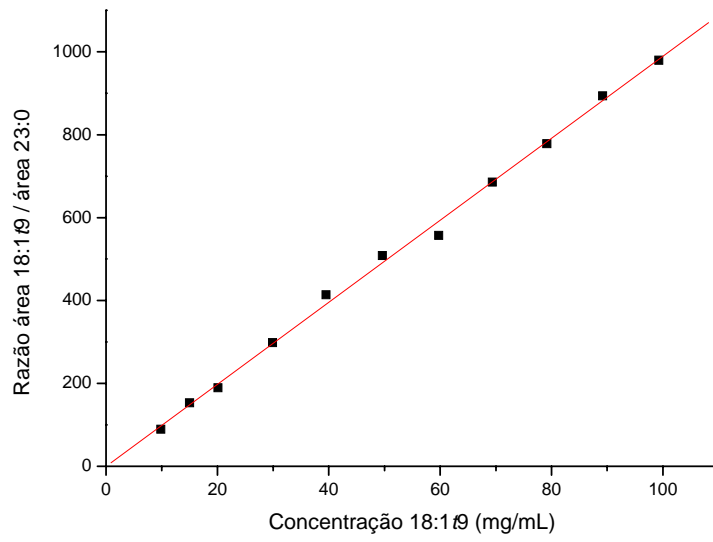
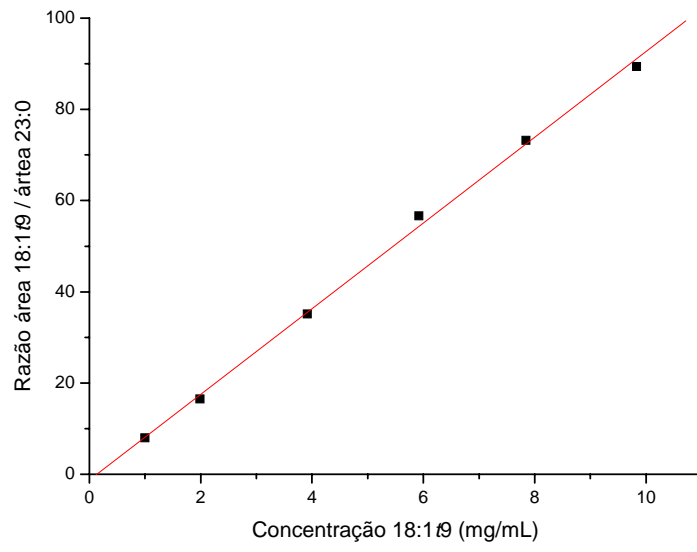
Ácidos graxos	Valores de ECL			
	Amostras ^a	Padrão ^b	1	2
C14:0	13,99 ± 0,02	13,99 ± 0,00	14,00	14,00
C16:0	16,02 ± 0,02	16,01 ± 0,00	16,00	16,00
C16:1n-9	16,22 ± 0,01			16,17
C16:1n-7		16,33 ± 0,00	16,31	16,31
C18:0	18,03 ± 0,04	18,04 ± 0,00	18,00	18,00
C18:1n-9	18,28 ± 0,06	18,27 ± 0,00	18,23	18,24
C18:1n-7	18,33 ± 0,05		18,30	18,30
C18:2n-6	18,73 ± 0,09	18,74 ± 0,00	18,71	18,70
C18:3n-6	19,08 ± 0,06	19,08 ± 0,00	19,03	19,02
C18:3n-3	19,38 ± 0,08	19,39 ± 0,00	19,36	19,35
C20:0	20,03 ± 0,02	20,03 ± 0,00	20,00	20,00
C20:1n-9	20,24 ± 0,02	20,25 ± 0,00	20,23	20,22
C22:0	21,98 ± 0,02	22,01 ± 0,00	22,00	22,00
C23:0		23,02 ± 0,00	23,01	23,00
C24:0	23,98 ± 0,05	23,96 ± 0,00	24,00	24,00

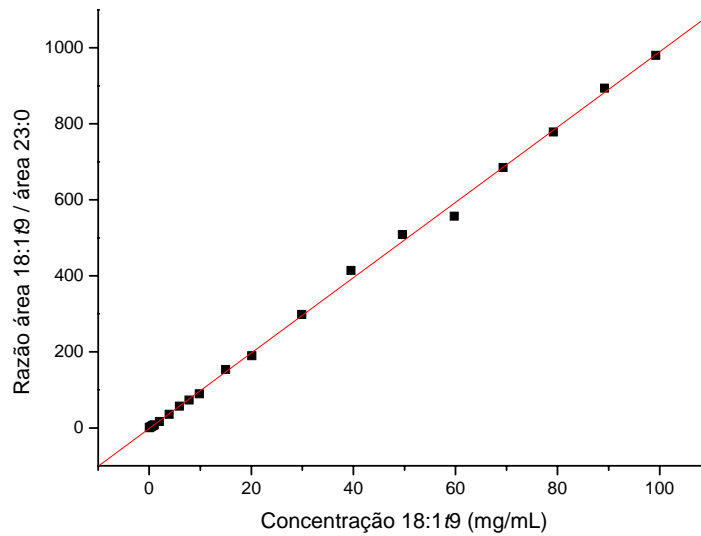
^aResultados expressos como média ± desvio padrão de seis repetições para os cinco óleos. ^b Resultados expressos como média ± desvio padrão de seis repetições para o padrão 189-19 (Sigma). 1- Stranky *et al.*, 1997. (Coluna DB-Wax 20M – 30 m x 0,25 mm x 0,25µm, isoterma à 200°C); 2- Thompson, 1996. (Coluna Carbowax 20M – 60 m x 0,25 mm x 0,25µm, isoterma à 200°C).

Anexo IV: Curvas usadas para cálculo dos fatores de resposta para diferentes faixas de concentração para os EMAG: C18:1 ω 9, C18:2n-6, C18:3n-3 e C20:0

Concentração de C18:1 ω 9 (mg/mL)	Razão entre área C18:1 ω 9 / área C23:0
0,051	0,27
0,101	0,81
0,202	1,52
0,397	3,38
0,601	4,85
0,796	6,51
0,998	7,97
1,989	16,48
3,914	35,13
5,919	56,68
7,842	73,21
9,831	89,38
15,000	153,32
20,085	189,65
29,911	298,04
39,520	413,95
49,638	508,47
59,771	557,12
69,365	685,28
79,190	778,29
89,209	893,96
99,275	979,80

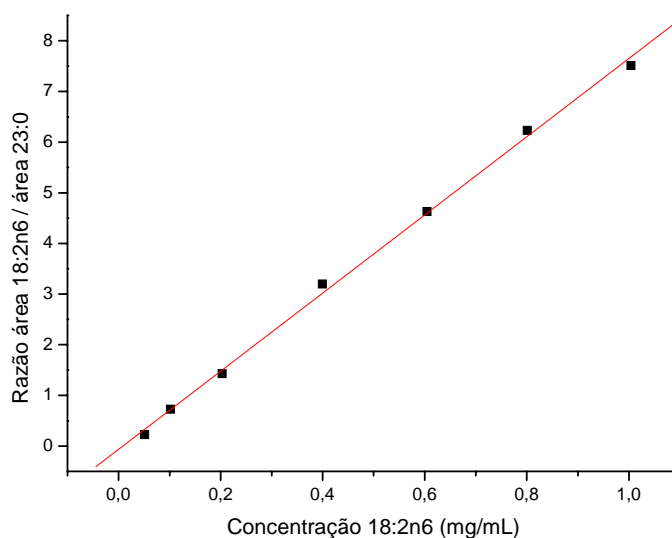


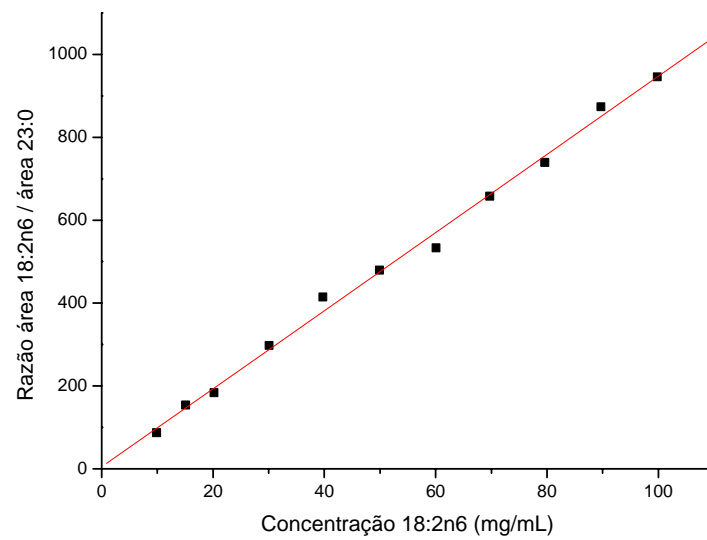
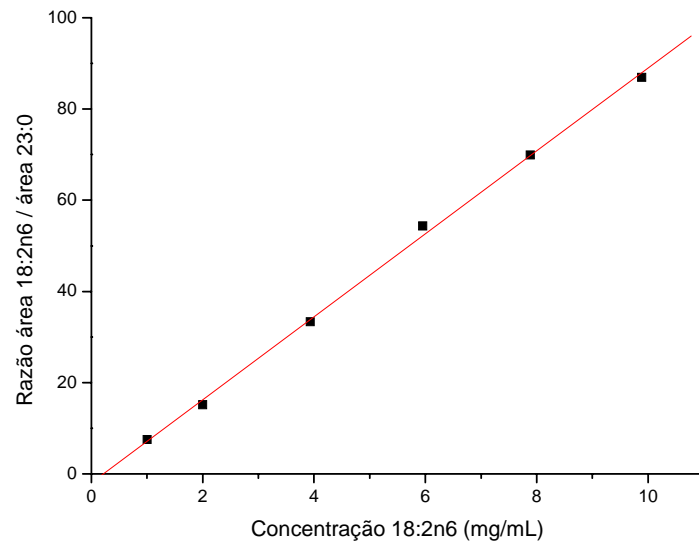


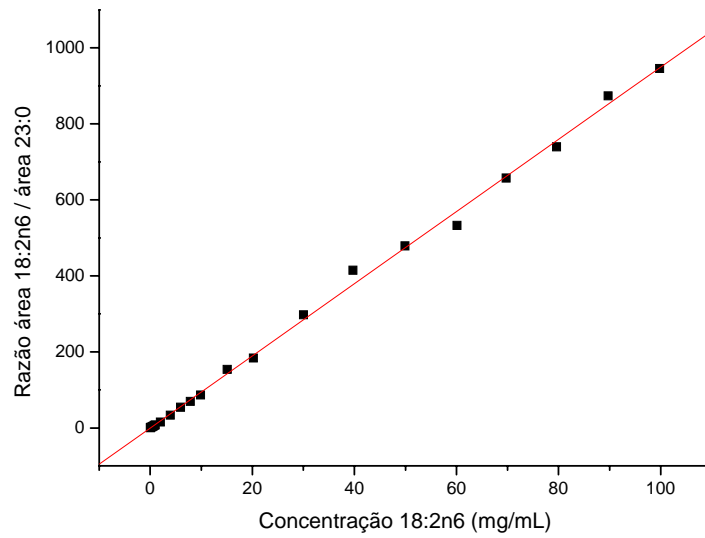


Faixa de Concentração do C18:1n7	$y = a + b * x$		r	F _{ce}
	a	b		
0,05 – 1	- 0,03466	8,11195	0,99943	1,235
1 – 10	- 1,26731	9,39421	0,99902	1,067
10 – 100	0,17456	9,88840	0,99875	1,013
0,05 - 100	- 1,31896	9,90916	0,99947	1,011

Concentração de C18:2n-6 (mg/mL)	Razão entre área C18:2n-6 / área C23:0
0,051	0,23
0,102	0,73
0,203	1,43
0,400	3,20
0,604	4,63
0,801	6,23
1,004	7,51
2,000	15,14
3,935	33,37
5,952	54,34
7,885	69,93
9,885	86,90
15,082	153,71
20,196	183,68
30,075	297,39
39,737	414,52
49,911	479,06
60,100	532,81
69,746	657,66
79,625	739,43
89,699	873,44
99,821	945,86

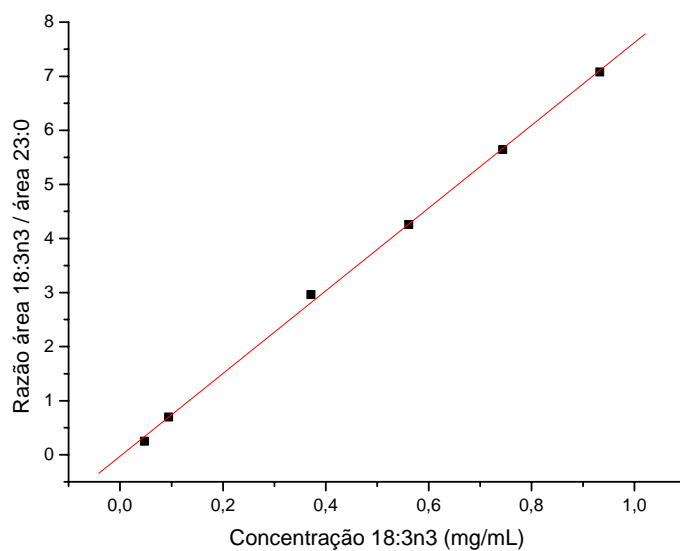


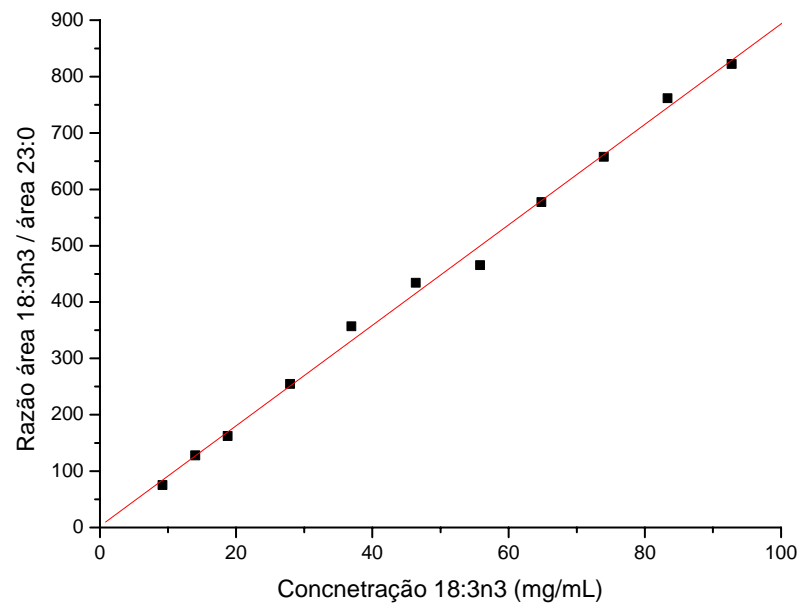
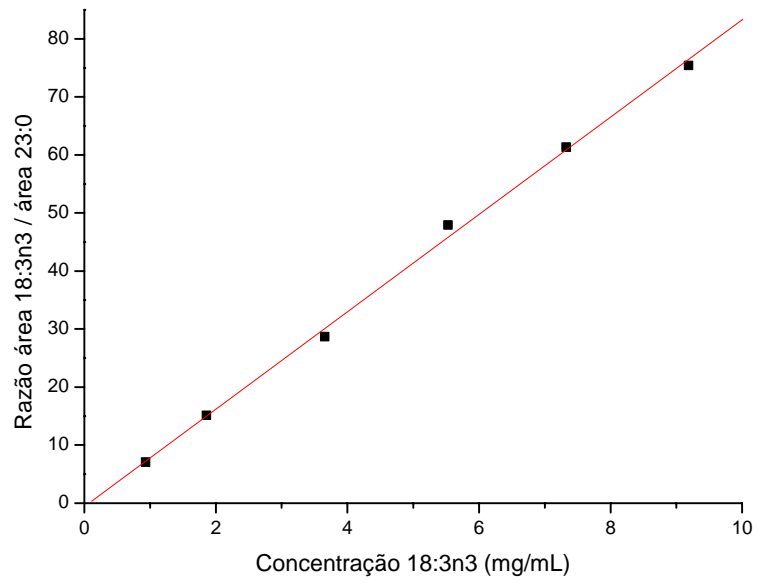


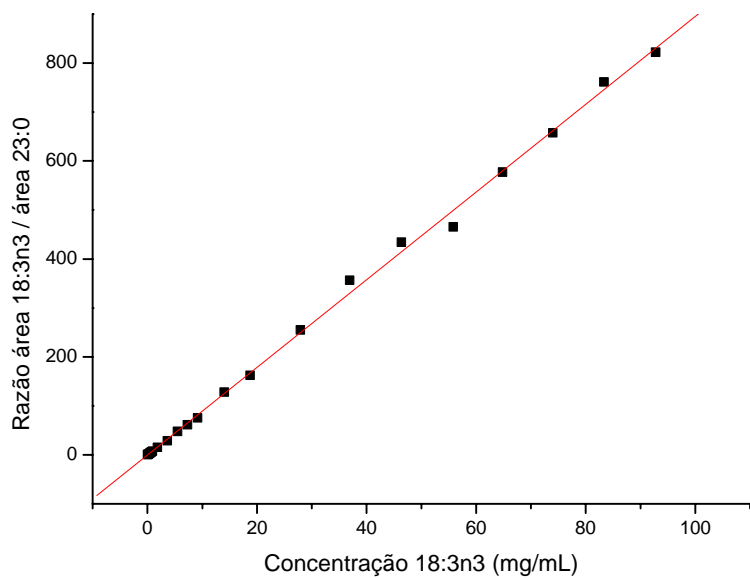


Faixa de Concentração do C18:2n6	$y = a + b * x$		r	F_{ce}
	a	b		
0,05 – 1	- 0,06359	7,71129	0,99903	1,299
1 – 10	- 1,93253	9,09274	0,99925	1,102
10 – 100	4,54906	9,42480	0,99771	1,063
0,05 - 100	- 0,55382	9,49773	0,99903	1,055

Concentração de C18:3n-3 (mg/mL)	Razão entre área C18:3n-3 / área C23:0
0,047	0,25
0,095	0,70
0,371	2,96
0,562	4,26
0,744	5,64
0,933	7,08
1,859	15,14
3,657	28,67
5,531	47,91
7,328	61,31
9,187	75,40
14,017	127,83
18,769	162,12
27,950	254,92
36,930	356,56
46,385	434,03
55,854	465,62
64,819	576,91
74,000	657,66
83,363	761,51
92,769	822,18

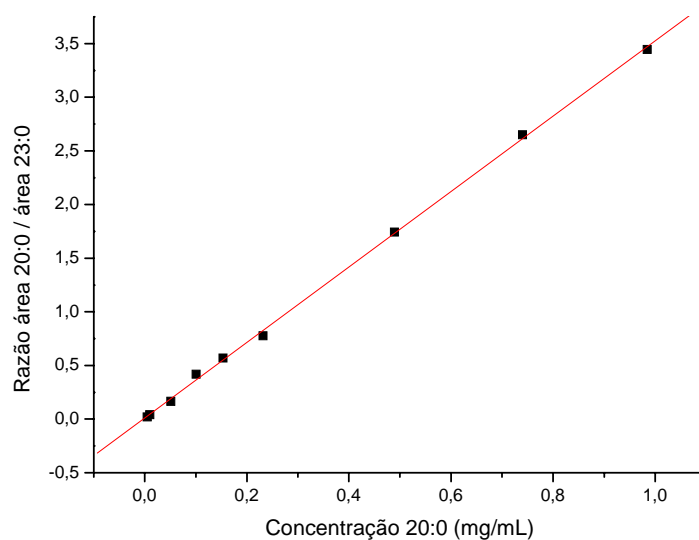


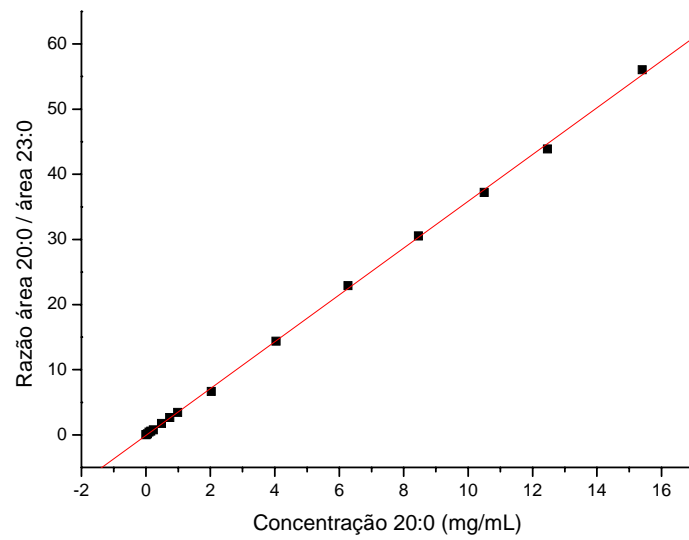
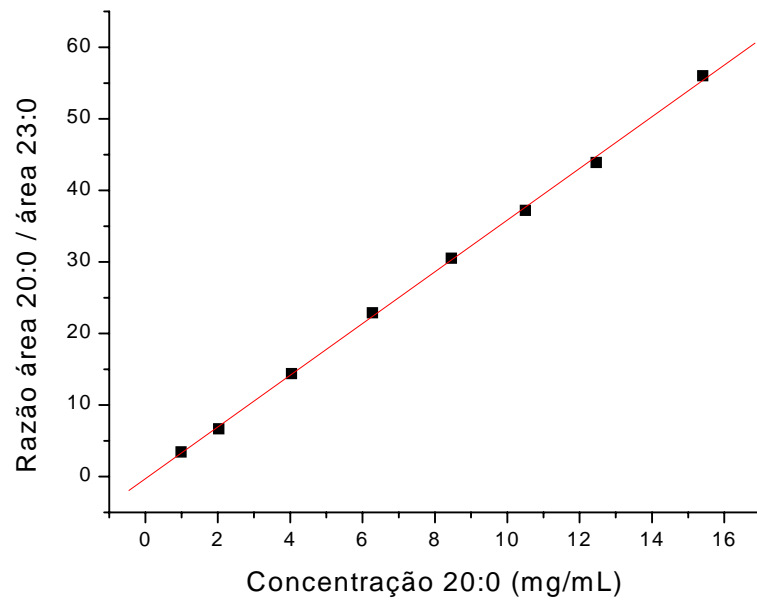


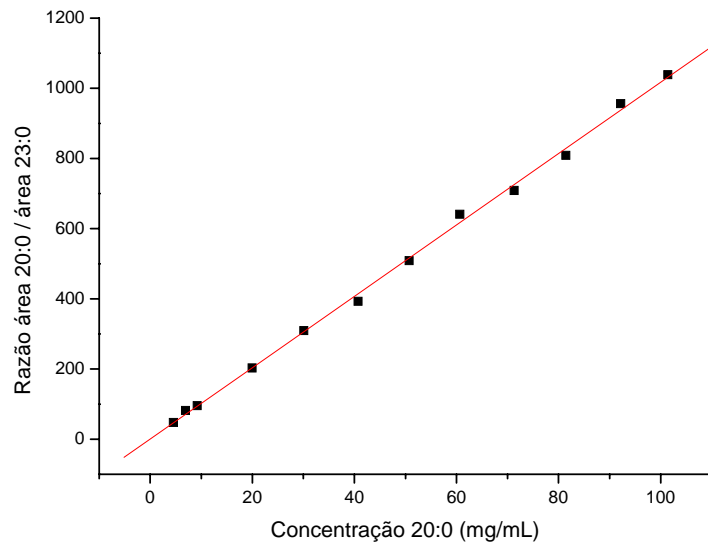


Faixa de Concentração do C18:3n3	$y = a + b * x$		r	F _{ce}
	a	b		
0,05 – 1	- 0,02644	7,64794	0,99959	1,310
1 – 10	- 0,56071	8,38329	0,99891	1,195
10 – 100	2,24301	8,91165	0,99801	1,124
0,05 - 100	- 0,6677	8,95607	0,99916	1,119

Concentração de C20:0 (mg/mL)	Razão entre área C20:0 / área C23:0	Concentração de C20:0 (mg/mL)	Razão entre área C20:0 / área C23:0
0,005	0,02	4,573	47,63
0,010	0,04	6,935	81,98
0,051	0,17	9,245	95,84
0,101	0,42	19,981	203,02
0,154	0,57	30,122	309,32
0,232	0,78	40,750	392,66
0,489	1,74	50,710	508,77
0,740	2,65	60,668	641,19
0,985	3,45	71,297	708,87
2,028	6,67	81,438	808,72
4,037	14,38	92,174	956,20
6,275	22,90	101,419	1038,58
8,454	30,52		
10,503	37,22		
12,462	43,89		
15,404	56,03		



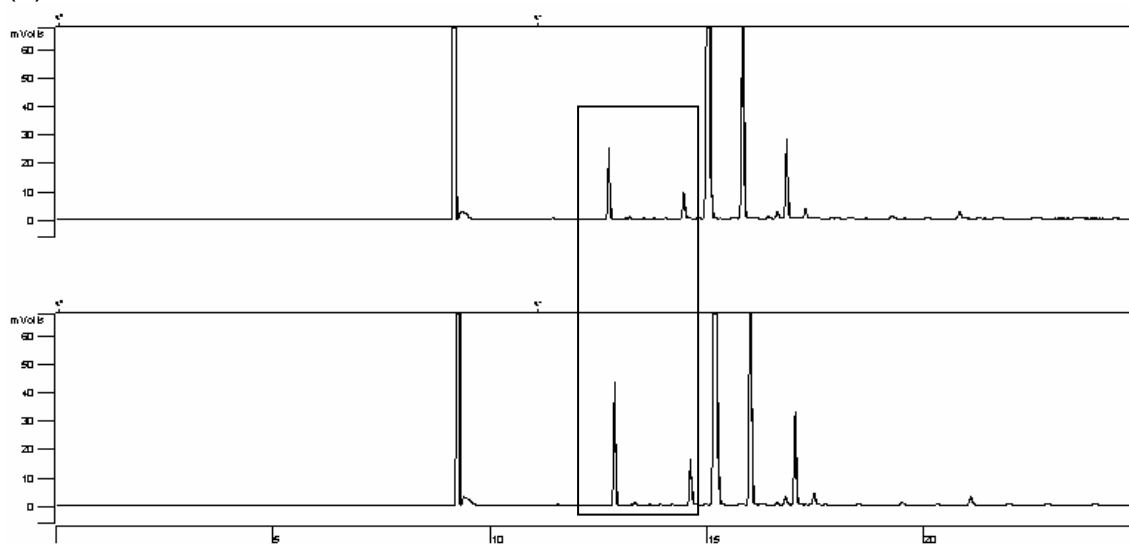




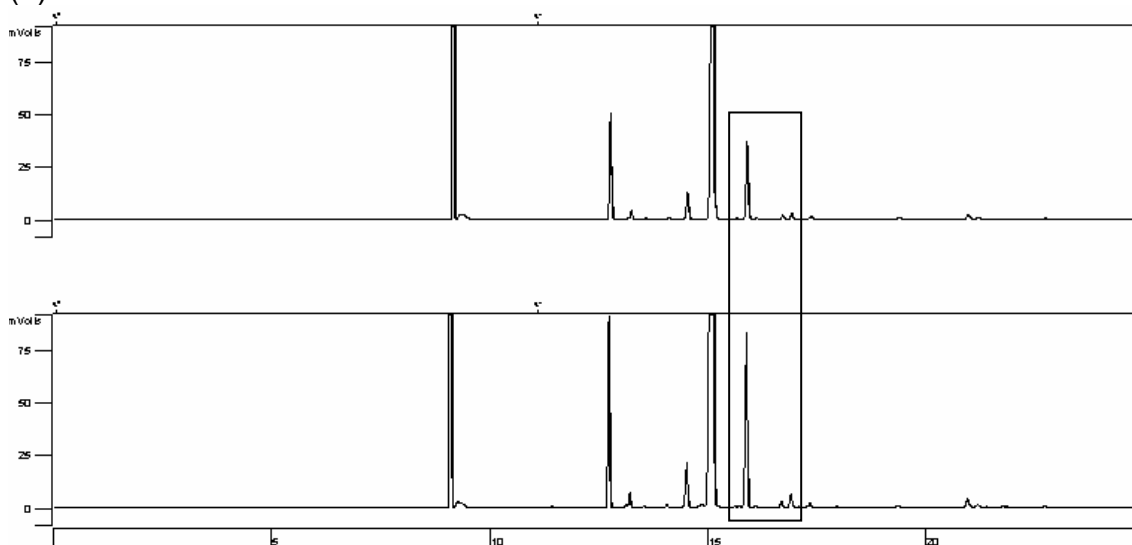
Faixa de Concentração	$y = a + b * x$		r	F _{ce}
	a	b		
0,005 – 1	0,01213	3,51478	0,99965	0,999
1 – 15	- 0,27954	3,61256	0,99961	0,972
0,005 – 15	- 0,06468	3,59236	0,99981	0,977
5 - 100	0,27065	10,16936	0,99914	1,120

Anexo V: Cromatogramas (a) representativo do teste de adição e recuperação dos TG C16:0 e C18:0 adicionados no óleo de canola. (b) representativo do teste de adição e recuperação dos TG C18:2n-6 e C18:3n-3 adicionados no óleo de oliva.

(a)



(b)



Anexo VI: Valores de conversão de EMAG para TG usado no cálculo do teste de adição e recuperação.

AG	F_{TG}
C14:0	0,9945
C16:0	0,9951
C18:0	0,9956
C18:1 ω 9	0,9955
C18:1n-9	0,9955
C18:1n-7	0,9955
C18:2 ω 9 ω 12	0,9955
C18:2 ω 9 ω 12	0,9955
C18:2n-6	0,9955
C18:3n-6	0,9955
C20:0	0,9959
C18:3n-3	0,9955
C22:0	0,9963
C24:0	0,9965

Cálculos a partir do peso molecular

$$F_{TG} = (PM\ TG) / (PM\ EMAG * 3)$$

Tabela 6. Concentração dos ésteres metílicos de ácidos graxos (mg/g de óleo) obtidos do azeite de dendê empregando diferentes métodos de esterificação.

EMAG (mg/g de óleo)	MÉTODOS*							
	CATÁLISE ÁCIDA				CATÁLISE BÁSICA			
	MET	BAN	JAC	HLA	JHA	ISO	BBA	SLO
C14:0	3,80 ± 0,181 B	3,67 ± 0,250 AB	3,61 ± 0,211 AB	3,71 ± 0,152 B	3,88 ± 0,130 B	3,66 ± 0,081 AB	3,37 ± 0,081 A	3,60 ± 0,090 AB
C16:0	390 ± 5,0 C	387 ± 3,4 BC	376 ± 4,8 A	403 ± 1,2 D	381 ± 4,6 AB	402 ± 3,2 D	382 ± 2,9 AB	398 ± 5,0 D
C18:0	49,1 ± 0,57	49,4 ± 0,18	49,6 ± 0,13	50,1 ± 0,20	49,2 ± 1,21	49,3 ± 0,76	49,8 ± 0,43	49,9 ± 0,11
C18:1**	426 ± 2,3 AB	423 ± 5,0 AB	443 ± 4,8 C	431 ± 2,7 B	421 ± 6,8 A	436 ± 1,2 BC	442 ± 4,0 C	419 ± 2,8 A
C18:2n-6	85,4 ± 1,21 AB	85,6 ± 1,09 AB	86,1 ± 0,54 B	83,6 ± 0,50 A	84,4 ± 2,33 AB	86,3 ± 0,19 B	86,2 ± 0,15 B	84,2 ± 0,68 AB
C20:0	2,84 ± 0,160 A	2,84 ± 0,101 A	2,99 ± 0,202 A	2,89 ± 0,093 A	2,88 ± 0,130 A	2,83 ± 0,044 A	2,53 ± 0,072 B	2,77 ± 0,034 A
C18:3n-3	2,30 ± 0,133	2,28 ± 0,091	2,33 ± 0,150	2,29 ± 0,132	2,30 ± 0,133	2,36 ± 0,103	2,34 ± 0,102	2,19 ± 0,051
C22:0	0,491 ± 0,0401 A	0,490 ± 0,0520 A	0,572 ± 0,0411 B	-	0,503 ± 0,0421 A	-	-	-
C24:0	-	0,522 ± 0,0410	0,511 ± 0,0402	-	0,502 ± 0,0520	-	-	-
SOMA	960 ± 8,5	955 ± 9,5	965 ± 10	977 ± 4,5	946 ± 14	982 ± 4,8	968 ± 7,1	960 ± 8,5

*Métodos descritos por Metcalfe *et al.*, 1966 (MET); Bannon *et al.*, 1982 (BAN), Joseph e Ackman, 1992 (JAC); Hartman e Lago, 1973 (HLA); Jham *et al.*, 1982 (JHA); ISO 5509, 1978 (ISO); Bannon *et al.*, 1982 (BBA); Schuchardt e Lopes, 1988 (SLO). **Somatório dos ésteres metílicos de ácidos graxos C18:1n-9 e C18:1n-7. Resultados expressos como média ± desvio padrão de dez repetições. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (P<0,05) pelo Teste de Tukey entre todos os métodos.

Tabela 7. Concentração dos ésteres metílicos de ácidos graxos (mg/g de óleo) obtidos do azeite de oliva empregando diferentes métodos de esterificação.

EMAG (mg/g de óleo)	MÉTODOS*							
	CATÁLISE ÁCIDA				CATÁLISE BÁSICA			
	MET	BAN	JAC	HLA	JHA	ISO	BBA	SLO
C16:0	101 ± 1,9 AB	100 ± 1,6 A	100 ± 1,5 AB	103 ± 1,1 BC	105 ± 2,5 C	102 ± 1,0 ABC	100 ± 0,7 AB	100 ± 0,2 AB
C18:0	29,1 ± 0,14	29,5 ± 0,13	29,4 ± 0,37	29,3 ± 0,31	29,5 ± 0,27	29,3 ± 0,06	29,3 ± 0,36	29,3 ± 0,31
C18:1**	756 ± 4,0 B	753 ± 2,0 B	779 ± 4,7 C	759 ± 3,6 B	741 ± 3,1 A	775 ± 5,0 C	773 ± 3,1 C	745 ± 2,5 A
C18:2n-6	72,9 ± 0,32 B	73,8 ± 0,83 B	80,4 ± 0,44 D	71,1 ± 0,76 A	73,2 ± 1,17 B	80,5 ± 0,57 D	80,8 ± 0,17 D	76,1 ± 0,80 C
C20:0	3,84 ± 0,092 BC	3,85 ± 0,031 BC	3,99 ± 0,050 C	3,62 ± 0,111 AB	3,86 ± 0,130 BC	3,83 ± 0,033 BC	3,50 ± 0,050 A	3,74 ± 0,073 B
C18:3n-3	5,85 ± 0,131 A	5,68 ± 0,053 A	6,57 ± 0,190 C	5,79 ± 0,090 A	6,15 ± 0,151 B	6,13 ± 0,060 B	6,38 ± 0,074 BC	5,83 ± 0,101 A
C22:0	1,11 ± 0,070 B	1,05 ± 0,020 AB	1,11 ± 0,050 B	1,05 ± 0,053 AB	1,06 ± 0,051 AB	1,05 ± 0,022 AB	1,07 ± 0,041 AB	1,02 ± 0,030 A
C24:0	0,543 ± 0,0512	0,502 ± 0,0210	0,531 ± 0,0512	0,492 ± 0,0322	-	0,491 ± 0,0330	-	0,482 ± 0,0312
SOMA	970 ± 6,2	967 ± 4,8	1001 ± 6,8	973 ± 5,5	960 ± 6,8	998 ± 6,6	994 ± 4,2	961 ± 3,7

*Métodos descritos por Metcalfe *et al.*, 1966 (MET); Bannon *et al.*, 1982 (BAN), Joseph e Ackman, 1992 (JAC); Hartman e Lago, 1973 (HLA); Jham *et al.*, 1982 (JHA); ISO 5509, 1978 (ISO); Bannon *et al.*, 1982 (BBA); Schuchardt e Lopes, 1988 (SLO). **Somatório dos ésteres metílicos de ácidos graxos C18:1n-9 e C18:1n-7. Resultados expressos como média ± desvio padrão de dez repetições. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (P<0,05) pelo Teste de Tukey entre todos os métodos.

Tabela 8. Concentração dos ésteres metílicos de ácidos graxos (mg/g de óleo) obtidos do óleo de soja empregando diferentes métodos de esterificação.

EMAG (mg/g de óleo)	MÉTODOS*							
	CATÁLISE ÁCIDA				CATÁLISE BÁSICA			
	MET	BAN	JAC	HLA	JHA	ISO	BBA	SLO
C14:0	0,781 ± 0,0500 B	0,622 ± 0,0210 A	0,730 ± 0,0601 B	0,721 ± 0,0211 B	0,720 ± 0,0601 B	0,623 ± 0,0222 A	0,930 ± 0,0641 C	0,611 ± 0,0121 A
C16:0	102 ± 0,5	101 ± 2,0	101 ± 1,0	104 ± 1,2	105 ± 6,6	102 ± 0,6	101 ± 1,0	101 ± 0,6
C18:0	29,9 ± 0,23	29,7 ± 0,30	30,3 ± 0,67	30,5 ± 0,32	30,4 ± 1,75	30,6 ± 0,33	30,4 ± 0,16	30,6 ± 0,37
C18:1 θ	0,502 ± 0,0412 A	0,651 ± 0,0322 B	0,652 ± 0,0501 B	0,710 ± 0,0201 B	0,803 ± 0,0511 C	0,681 ± 0,0210 B	-	0,651 ± 0,0201 B
C18:1**	210 ± 0,7 B	209 ± 0,72 B	218 ± 2,8 C	211 ± 2,4 B	200 ± 4,5 A	219 ± 1,1 C	217 ± 1,8 C	209 ± 3,1 B
C18:2c9t12	5,90 ± 0,551 A	6,73 ± 0,050 B	7,14 ± 0,240 B	7,22 ± 0,271 B	7,05 ± 0,271 B	7,20 ± 0,251 B	7,02 ± 0,040 B	7,25 ± 0,041 B
C18:2 θ c12	5,28 ± 0,610 A	6,51 ± 0,060 B	6,53 ± 0,331 B	6,78 ± 0,140 B	6,97 ± 0,310 B	6,67 ± 0,360 B	6,80 ± 0,041 B	6,94 ± 0,061 B
C18:2n-6	477 ± 5,7 A	472 ± 1,2 A	491 ± 4,1 B	471 ± 1,0 A	475 ± 3,5 A	501 ± 2,9 C	490 ± 3,1 B	473 ± 5,3 A
C18:3n-6	8,16 ± 0,054 D	7,05 ± 0,070 A	7,77 ± 0,161 C	7,44 ± 0,071 B	7,83 ± 0,331 C	8,05 ± 0,071 CD	7,35 ± 0,043 B	7,79 ± 0,060 C
C18:3 θ c12t15	1,68 ± 0,031 D	1,37 ± 0,010 A	1,63 ± 0,061 CD	1,50 ± 0,090 B	1,53 ± 0,091 C	1,59 ± 0,100 BCD	1,44 ± 0,010 ABC	1,50 ± 0,010 B
C20:0	11,0 ± 0,53 ABC	10,5 ± 0,13 A	11,3 ± 0,27 BC	11,1 ± 0,07 BC	11,1 ± 0,47 BC	11,5 ± 0,04 C	11,0 ± 0,04 AB	11,4 ± 0,07 BC
C18:3n-3	35,0 ± 0,43 B	32,5 ± 0,33 A	37,3 ± 1,11 C	34,3 ± 0,18 AB	32,4 ± 2,01 A	37,6 ± 0,17 C	36,9 ± 0,83 C	33,0 ± 1,26 A
C22:0	3,79 ± 0,161 A	3,84 ± 0,051 A	4,07 ± 0,133 AB	4,19 ± 0,111 B	3,80 ± 0,350 A	4,04 ± 0,040 AB	4,15 ± 0,061 B	4,03 ± 0,111 AB
C24:0	1,29 ± 0,050 B	1,38 ± 0,080 BC	1,94 ± 0,062 D	1,44 ± 0,064 C	1,14 ± 0,131 A	1,36 ± 0,020 BC	1,42 ± 0,053 BC	1,35 ± 0,051 BC
SOMA	892 ± 7,1	883 ± 4,1	919 ± 8,2	892 ± 4,7	884 ± 15	932 ± 7,7	915 ± 6,0	888 ± 9,3

*Métodos descritos por Metcalfe *et al.*, 1966 (MET); Bannon *et al.*, 1982 (BAN), Joseph e Ackman, 1992 (JAC); Hartman e Lago, 1973 (HLA); Jham *et al.*, 1982 (JHA); ISO 5509, 1978 (ISO); Bannon *et al.*, 1982 (BBA); Schuchardt e Lopes, 1988 (SLO). **Somatório dos ésteres metílicos de ácidos graxos C18:1n-9 e C18:1n-7. Resultados expressos como média ± desvio padrão de dez repetições. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (P<0,05) pelo Teste de Tukey entre todos os métodos.

Tabela 9. Concentração dos ésteres metílicos de ácidos graxos (mg/g de óleo) obtidos do óleo de canola empregando diferentes métodos de esterificação.

EMAG (mg/g de óleo)	MÉTODOS*							
	CATÁLISE ÁCIDA					CATÁLISE BÁSICA		
	MET	BAN	JAC	HLA	JHA	ISO	BBA	SLO
C14:0	0,602 ± 0,0312 B	0,482 ± 0,0511 A	0,630 ± 0,0501 B	0,601 ± 0,0101 B	0,610 ± 0,0111 B	-	-	0,520 ± 0,0310 A
C16:0	42,9 ± 0,25 A	43,4 ± 0,90 AB	44,9 ± 0,32 C	44,8 ± 0,24 BC	43,4 ± 0,97 AB	43,4 ± 0,65 AB	43,6 ± 0,30 AB	44,4 ± 0,74 BC
C18:0	20,6 ± 0,23 A	21,4 ± 0,24 BCD	21,8 ± 0,13 CD	21,4 ± 0,25 BCD	21,3 ± 0,30 BC	21,8 ± 0,25 D	21,7 ± 0,17 CD	21,0 ± 0,10 AB
C18:1 θ	-	-	0,530 ± 0,0512 A	0,530 ± 0,0223 A	0,661 ± 0,0512 B	0,481 ± 0,0201 A	-	0,480 ± 0,0332 A
C18:1**	574 ± 2,1 B	580 ± 4,5 B	606 ± 2,9 D	576 ± 2,3 B	562 ± 2,5 A	601 ± 3,8 CD	599 ± 1,7 C	566 ± 3,3 A
C18:2c9t12	0,561 ± 0,0401 A	-	0,540 ± 0,0423 A	0,721 ± 0,0001 B	0,581 ± 0,0212 A	0,801 ± 0,011 C	-	-
C18:2t9c12	-	-	-	0,480 ± 0,0503	-	0,481 ± 0,0421	-	-
C18:2n-6	218 ± 1,8 C	221 ± 1,4 C	237 ± 1,5 F	204 ± 1,3 A	225 ± 3,3 D	232 ± 1,1 E	231 ± 0,5 E	210 ± 2,4 B
C18:3n-6	1,90 ± 0,030 C	1,75 ± 0,022 B	1,89 ± 0,031 C	1,63 ± 0,021A	1,89 ± 0,050 C	1,75 ± 0,020 B	1,79 ± 0,021 B	1,64 ± 0,030 A
C20:0	6,63 ± 0,262 B	6,60 ± 0,181 B	7,25 ± 0,080 D	6,95 ± 0,081 C	6,96 ± 0,160 C	6,74 ± 0,081 BC	6,26 ± 0,122 A	6,48 ± 0,070 AB
C18:3n-3	62,3 ± 0,39 B	62,1 ± 1,09 AB	73,1 ± 0,53 E	60,7 ± 0,76 A	62,0 ± 0,87 AB	66,8 ± 0,52 C	70,2 ± 0,14 D	61,5 ± 0,93 AB
C22:0	2,53 ± 0,120 A	2,52 ± 0,151 A	2,76 ± 0,070 B	2,72 ± 0,083 B	2,59 ± 0,101 AB	2,59 ± 0,071 AB	2,61 ± 0,060 AB	2,48 ± 0,071 A
C24:0	1,26 ± 0,071 A	1,28 ± 0,100 A	1,61 ± 0,052 C	1,47 ± 0,121 BC	1,28 ± 0,061 A	1,33 ± 0,050 AB	1,28 ± 0,040 A	1,26 ± 0,060 A
SOMA	931 ± 4,4	941 ± 7,2	998 ± 4,8	922 ± 4,2	928 ± 7,0	979 ± 5,7	977 ± 2,6	916 ± 6,6

*Métodos descritos por Metcalfe *et al.*, 1966 (MET); Bannon *et al.*, 1982 (BAN), Joseph e Ackman, 1992 (JAC); Hartman e Lago, 1973 (HLA); Jham *et al.*, 1982 (JHA); ISO 5509, 1978 (ISO); Bannon *et al.*, 1982 (BBA); Schuchardt e Lopes, 1988 (SLO). **Somatório dos ésteres metílicos de ácidos graxos C18:1n-9 e C18:1n-7. Resultados expressos como média ± desvio padrão de dez repetições. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (P<0,05) pelo Teste de Tukey entre todos os métodos.

Tabela 10. Concentração dos ésteres metílicos de ácidos graxos (mg/g de óleo) obtidos do óleo de linhaça empregando diferentes métodos de esterificação.

EMAG (mg/g de óleo)	MÉTODOS*							
	CATÁLISE ÁCIDA				CATÁLISE BÁSICA			
	MET	BAN	JAC	HLA	JHA	ISO	BBA	SLO
C14:0	0,492 ± 0,0201 A	-	0,551 ± 0,0311 B	0,510 ± 0,0111 AB	0,540 ± 0,0513 AB	-	-	-
C16:0	58,8 ± 0,15 A	59,5 ± 0,92 A	61,1 ± 1,03 B	61,4 ± 0,28 B	61,0 ± 0,56 B	59,8 ± 0,30 A	59,6 ± 0,52 A	59,8 ± 0,39 A
C18:0	41,2 ± 0,63 A	42,5 ± 0,19 BC	43,0 ± 0,42 C	42,0 ± 0,79 AB	42,4 ± 0,44 BC	42,9 ± 0,12 C	42,0 ± 0,25 AB	42,1 ± 0,18 AB
C18:1**	181 ± 2,1 BC	183 ± 1,4 CD	185 ± 1,6 D	182 ± 0,5 C	171 ± 2,0 A	186 ± 0,7 D	186 ± 1,6 D	178 ± 1,5 B
C18:2n-6	123 ± 1,7 AB	122 ± 2,4 AB	132 ± 1,1 D	121 ± 1,2 A	123 ± 2,1 AB	133 ± 0,6 D	129 ± 0,8 C	124 ± 0,5 B
C18:3n-6	1,55 ± 0,070 B	1,71 ± 0,020 C	1,88 ± 0,020 D	1,61 ± 0,020 B	2,06 ± 0,053 E	1,87 ± 0,010 D	0,30 ± 0,021 A	1,72 ± 0,032 C
C20:0	1,61 ± 0,041 C	1,43 ± 0,101 B	1,69 ± 0,050 CD	1,24 ± 0,081 A	1,54 ± 0,124 BC	1,30 ± 0,010 AB	1,75 ± 0,050 CD	1,17 ± 0,081 A
C18:3n-3	432 ± 5,7 A	497 ± 7,1 C	577 ± 3,6 F	485 ± 4,2 B	554 ± 5,1 E	576 ± 3,4 F	559 ± 4,8 E	524 ± 1,7 D
C22:0	1,77 ± 0,061 E	1,33 ± 0,041 BC	1,35 ± 0,061 C	1,31 ± 0,041 BC	1,44 ± 0,071 D	1,28 ± 0,012 BC	0,530 ± 0,0301 A	1,24 ± 0,054 B
C24:0	1,00 ± 0,040 C	0,920 ± 0,0401 BC	0,881 ± 0,0812 B	0,911 ± 0,0521 BC	0,840 ± 0,0411 AB	0,861 ± 0,0221 B	0,732 ± 0,031 A	0,890 ± 0,0821 BC
SOMA	842 ± 8,6	909 ± 9,7	1004 ± 6,5	897 ± 5,7	958 ± 8,3	1003 ± 4,6	979 ± 7,0	933 ± 3,7

*Métodos descritos por Metcalfe *et al.*, 1966 (MET); Bannon *et al.*, 1982 (BAN), Joseph e Ackman, 1992 (JAC); Hartman e Lago, 1973 (HLA); Jham *et al.*, 1982 (JHA); ISO 5509, 1978 (ISO); Bannon *et al.*, 1982 (BBA); Schuchardt e Lopes, 1988 (SLO). **Somatório dos ésteres metílicos de ácidos graxos C18:1n-9 e C18:1n-7. Resultados expressos como média ± desvio padrão de dez repetições. Letras diferentes na mesma linha indicam diferenças significativas (P<0,05) pelo Teste de Tukey entre todos os métodos.