



Determinação de estigmastadienos e correlação com os teores de ésteres de monocloropropanodiol e ésteres de glicidol em azeites de oliva virgens, como marcadores complementares de fraudes

Geovana Soares **Pereira**¹; Eduardo **Vicente**²; Ana Maria Rauen de Oliveira **Miguel**³; Natália Vallim **Tavares**⁴, Kamille **Kamikata**⁵

Nº 18211

Azeite de oliva apresenta características muito apreciadas, sendo alvo de adulterações. A Instrução Normativa 01/2012 do MAPA estabelece limites para azeites, incluindo composição em ácidos graxos e teor de estigmastadienos, utilizado como marcador da adulteração de azeites de oliva virgens com óleos e azeites refinados. Estudos recentes mostram que como os estigmastadienos, os ésteres de monocloropropanodiol (MCPDE) e de glicidol (GE) são formados em altas temperaturas. Considerando seu potencial tóxico, sua ocorrência pode consistir em preocupação de saúde pública. Neste estudo 35 amostras foram analisadas, 15 azeites de oliva extra virgens (EV), 10 azeites tipo único (TU) e 10 óleos compostos (OC). Os resultados mostraram que 47% das amostras EV apresentaram valores de estigmastadienos maiores que o limite estabelecido (0,15 mg/kg), baixos teores de ácido oleico C18:1, somatório de ácidos *trans* C18:2+ C18:3t acima do permitido, indicando mistura com azeite refinado e/ou óleos refinados de outras origens. Estas mesmas amostras foram analisadas em outro estudo e apresentaram 3-MCPD, 2-MCPD e GE respectivamente entre 0,13 e 1,61 mg/kg, < 0,08 e 0,58 mg/kg e 0,27 e 1,98 mg/kg. Das amostras TU 80% apresentaram altos níveis de estigmastadienos, presença de 3-MCPD, 2-MCPD e GE, ácido oleico dentro do limite (55-83%), indicando processamento térmico, porém, sem evidência de adulteração com óleos de outras origens. As amostras OC contém estigmastadienos, 3-MCPD, 2-MCPD e GE, pois possuem óleos refinados em sua composição. A relação entre os resultados sugere o monitoramento de 3-MCPD, 2-MCPD e GE em azeites de oliva virgens como indicadores complementares de adulteração.

Palavras-chaves: Estigmastadienos; 3- MCPD; 2-MCPD; Glicidol; Azeite de oliva

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biomedicina, Universidade São Francisco, Bragança Paulista-SP; geovanaspereira2@gmail.com

2 Orientador :Diretor geral, ITAL, Campinas-SP; evicente@ital.sp.gov.br

3 Colaborador: Pesquisador Científico, ITAL, Campinas-SP

4 Colaborador :Técnico de Laboratório, ITAL, Campinas-SP

5 Colaborador: Aluna de Mestrado, ITAL, Campinas-SP



ABSTRACT

Olive oil has very appreciated characteristics and for this reason is always subject to adulteration. The Normative Instruction 01/2012 from Brazilian Department of Agriculture establishes limits for olive oils, including fatty acid composition and stigmastadienes content, used as a marker of the adulteration of virgin olive oils with refined oils. Recent studies show that, like stigmastadienes, monochloropropanediol esters (MCPDE) and glycidol (GE) esters are also formed at high temperatures. Considering its toxic potential, its occurrence may raise a public health concern. In this study 35 samples were analyzed, 15 extra virgin olive oils (EV), 10 olive oils (TU) and 10 oil blends (OC). The results showed that 47% of the EV samples had stigmastadienes values higher than the established limit (0.15 mg / kg), low levels of C18: 1 oleic acid, sum of C18: 2*t* + C18: 3*t trans* acids above the permitted limits, indicating a mixture with refined olive oil and / or refined oils from other sources. These same samples were analyzed in another study and presented 3-MCPD, 2-MCPD and GE respectively between 0.13 and 1.61 mg / kg, <0.08 and 0.58 mg / kg and 0.27 and 1.98 mg / kg. For olive oils TU, 80% showed high levels of stigmastadienes, presence of 3-MCPD, 2-MCPD and GE, oleic acid within the limit (55-83%), indicating thermal processing, however, without evidence of adulteration with oils of other origins. The OC samples contain stigmastadienes, 3-MCPD, 2-MCPD and GE, as they have refined oils in their composition. The relationship between the results suggests the monitoring of 3-MCPD, 2-MCPD and GE in virgin olive oils as complementary indicators of adulteration.

Key-words: Stigmastadienes; 3- MCPD; 2-MCPD; Glycidol; Olive Oil



1. INTRODUÇÃO

Dentre os óleos vegetais, o azeite de oliva é o que apresenta características mais marcantes e suas propriedades nutricionais e terapêuticas podem ser comprovadas pela presença de substâncias funcionais que atuam na proteção do organismo humano contra doenças coronarianas e na redução do estresse oxidativo celular (MIGUEL, 2012).

Essas características peculiares fazem desse produto um alvo constante de fraudes que resultam em problemas para as instituições governamentais reguladoras, para os produtores de azeite e para os consumidores. A adição de óleos vegetais de baixo valor comercial e nutricional aos azeites de oliva é a adulteração mais comum que se reporta, embora inúmeras outras fraudes, inclusive as mais sofisticadas, também já façam parte do relato de várias pesquisas (AGIOMYRGIANAKI et al, 2010; CHRISTOPOULOU ET AL, 2004).

A expansão do consumo nacional, principalmente de azeite de oliva extra virgem, justifica a existência de diretivas regulatórias que estabeleçam parâmetros e limites de controle de qualidade e identidade críticos o suficiente para garantir a autenticidade desses produtos, no momento de sua entrada no país, considerando tanto a perspectiva comercial quanto a de saúde pública.

O MAPA - Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária, publicou em 30/01/2012 a Instrução Normativa (IN) nº 1 - Regulamento Técnico do Azeite de Oliva e do Óleo de Bagaço de Oliva que contempla limites máximos e mínimos para diversos parâmetros de identidade e qualidade de azeites, incluindo a composição em ácidos graxos (impressão digital de óleos e gorduras) e os estigmastadienos, substâncias consideradas marcadoras da adulteração de azeite de oliva extra virgem com óleos e azeites refinados (BRASIL, 2012). Mas a literatura cita outros compostos, como os ésteres de monocloropropanodiol (MCPDE) e ésteres de glicidol (GE), que assim como o estigmastadienos, são formados em altas temperaturas através da reação entre lipídios e cloretos e que também poderiam ser estabelecidas como indicadores da ocorrência de fraudes (STADLER, 2015).

A detecção e quantificação dessas substâncias em amostras de azeite de oliva, sua comparação com os limites regulatórios e a correlação entre ambas, pode significar grande avanço na detecção mais rápida da ocorrência dessas fraudes. Além disso como as formas livres dos ésteres de monocloropropanodiol (MCPDE) e ésteres de glicidol (GE) constituem um conhecido grupo de contaminantes químicos formados a partir de lipídeos e cloretos durante o tratamento térmico de alimentos que tem relação direta com segurança alimentar, poderiam ser incluídos nas



legislações pertinentes como mais um parametro de controle de fraudes e também de potencial risco a saúde .

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Os padrões analíticos de colest-3,5-dieno, 2-MCPDE, 3-MCPDE e GE foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA) e TRC – Toronto Research Chemicals. Os reagentes e solventes utilizados foram todos de grau PA e HPLC. A sílica gel 60 usada na cromatografia de coluna (mesh 70-230) era marca Merck/Millipore. Para a validação da metodologia, com testes de exatidão para o valor de estigmastadienos, foram utilizadas amostras controle recebidas do COI – Conselho Oleícola Internacional (score $|z| \leq 2$), codificadas como: **COI CHEM 2016 M1** (azeite de oliva extra virgem sem filtrar + 10% de azeite de oliva refinado); **COI CHEM 2016 M2A** (75% de azeite de oliva extra virgem + 10% de óleo de girassol alto oleico refinado + 10% de Óleo de soja + 5% de gordura animal); **COI CHEM 2016 M2B** (75% de azeite de oliva extra virgem + 10% de óleo de girassol alto oleico refinado + 10% de Óleo de colza + 5% de gordura animal).

Para os testes de precisão da determinação de estigmastadienos (8 replicatas, em dias diferentes, com o mesmo técnico e utilizando a mesma metodologia) foi utilizada uma amostra comercial de azeite de oliva identificada como extra virgem.

A concentração de estigmastadienos foi determinada em 15 amostras de azeite de oliva rotuladas como extra virgem, 10 amostras de azeite tipo único e 10 amostras de óleo composto (mistura de azeite de oliva extra virgem, virgem, ou refinado com outro tipo de óleo vegetal) todas de diferentes marcas e adquiridas em pontos distintos no comércio de Campinas.

2.2. MÉTODOS

- **Determinação de Estigmastadienos:** A quantificação de estigmastadienos foi realizada a partir da matéria insaponificável dos azeites e subsequente separação da fração de hidrocarbonetos esteróides por cromatografia em coluna aberta, de sílica gel (COLLISON, 2017a). As amostras com teores de estigmastadienos acima de 4 mg/kg foram eluídas diretamente na coluna de sílica gel, adicionadas de 1ml de solução padrão (COLLISON, 2017d). A fase móvel usada foi hexano grau HPLC, com fluxo de 1 mL/min. Os primeiros 30 mL eluídos foram descartados e os 40 mL seguintes foram recolhidos em balão de fundo chato e rotaevaporados a



30°C. O resíduo foi resuspendido em 200µL de hexano e injetado em Cromatógrafo Gasoso Shimadzu usando: coluna capilar DB-5 (5% Fenil 95 % dimetilpolisiloxano), de 30m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm de filme; rampa de temperatura de 235 °C/6 min, aquecimento de 235°C a 285°C (2°C/min) e 285 °C/ 9 min; hidrogênio como gás de arraste a 1 mL/min e pressão de 90 kPa; injeção de 1 µL; temperatura do injetor 300°C; temperatura do detector por ionização de chama (FID) 320°C. A quantificação do estigmastadienos foi feita por padronização interna, com colestá-3,5-dieno como padrão interno). A concentração de estigmastadienos na amostra é calculada através da fórmula:

$$\text{mg estigmastadienos/kg} = \frac{(A_s) \times M_c}{(A_c) \times (M_a)}$$

onde:

A_s = área do pico de estigmastadienos

A_c = área do pico do padrão interno

M_c = massa de padrão adicionada (µg)

M_a = massa inicial de amostra (g)

- **Composição em ácidos graxos:** Os azeites foram transesterificados de acordo com Hartman & Lago (1973) e injetados em Cromatógrafo Gasoso Agilent Technologies usando: coluna capilar CP-SIL 88 (100 m x 0,25 mm i.d., 0,20 µm de filme), rampa de temperatura de 140°C/4min, aquecimento de 140°C a 230°C (4,5°C/min), e 230°C/ 24 min; gás de arraste hidrogênio a 0,6 mL/min; gás “make-up” nitrogênio a 30 mL/min; temperatura do injetor, 260°C; temperatura do detector FID 260°C; injeção de 1 µL. A identificação dos ácidos graxos foi feita pela comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras e de padrões específicos. A quantificação foi feita por normalização de área e os resultados expressos em g/100g de amostra (COLLISON, 2017b).

- **Ésteres de 2-MCPD, 3-MCPD e glicidol:** os azeites foram adicionados de soluções de padrão interno desses compostos e por reações de transesterificação com ácido sulfúrico e metanol, foram obtidas as formas livres de 2-MCPD, 3-MCPD e glicidol. Reações de derivatização com solução saturada de PBA (25%, p/v em acetona:água, 19:1, v/v) foram feitas na sequencia e os resíduos obtidos foram dissolvidos em 300 µL de heptano. Os compostos foram analisados por



CG-MS, em equipamento HP 7890A (CG) acoplado a um espectrômetro de massa Agilent Technologies 5975C. Os extratos foram injetados a 250°C no modo splitless pulsado, coluna capilar HP-1ms (30 m x 0,25 mm, 1 µm) rampa de temperatura de 80°C/1 min, de 80°C a 170°C a 10°C/min, de 170°C a 200°C a 3°C/min, de 200°C a 300°C a 15°C/min e 15 min a 300°C; hélio como gás de arraste a 0,8 mL/min; detector de monitoramento de íons. (COLLISON, 2017c).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Testes de exatidão

A Tabela 1 apresenta os resultados de estigmastadienos informados das amostras controle do COI, os obtidos nos laboratórios do CCQA e o percentual de recuperação entre os resultados.

Tabela 1 – Resultados de estigmastadienos (mg/kg) para as amostras COI (score $|z| \leq 2$) e CCQA e percentual de recuperação.

Amostras	Resultados COI (mg/kg)	Resultados CCQA (mg/kg)	% de recuperação
COI CHEM 2016 M1	0,78-1,08 Média = 0,93	0,86(0,04) _a CV (%) = 4,21	92,5%
COI CHEM 2016 M2A	3,33-4,59 Média = 3,96	3,74 (0,07) ^a CV (%) = 1,91	94,4%
COI CHEM 2016 M2B	4,59-6,33 Média = 5,46	5,69 (0,14) _a CV (%) = 2,39	104,2%

^aMédia e estimativa de desvio padrão.

Quattrocchi (1992) estabelece a relação entre a exatidão obtida e a exatidão requerida, aplicando-se a equação abaixo e considerando-se $t_{ob} < t_{tab(95;2)} = 4,303$:

$$t_{ob} = \frac{[100 - \bar{X}]}{CV \cdot \sqrt{n}}$$

Portanto, temos, para cada uma das amostras avaliadas:



$$t_{ob} = 1,29 < t_{tab(95;2)} = 4,303 \rightarrow \text{COI CHEM 2016 M1.}$$

$$t_{ob} = 2,07 < t_{tab(95;2)} = 4,303 \rightarrow \text{COI CHEM 2016 M2A.}$$

$$t_{ob} = 1,24 < t_{tab(95;2)} = 4,303 \rightarrow \text{COI CHEM 2016 M2B.}$$

De acordo com os resultados acima obtidos o método apresentou a exatidão requerida. A amostra COI CHEM 2016 M2B foi avaliada pelo método direto na coluna de sílica (COLLISON, 2017c).

3.2. Testes de precisão

Para os testes de precisão foram feitas 8 repetições analíticas da determinação de estigmastadienos, em dias diferentes, com o mesmo técnico e a mesma metodologia (COLLISON, 2017a). Para isso foi utilizada uma amostra comercial de azeite de oliva denominada extra virgem. A Tabela 2 mostra os resultados obtidos para a precisão do método.

Tabela 2 – Resultados da precisão do método de determinação de estigmastadienos, com áreas dos picos do padrão interno (colesta-3,5-dieno), dos estigmastadienos e o valor obtido em mg/kg.

Ensaio	Área do padrão interno (Ap)	Área dos estigmastadienos (Ae)	Estigmastadienos (mg/kg)
1	1249	1852	1,3950
2	1539	2323	1,4242
3	503	698	1,3105
4	1048	1115	1,0046
5	1667	2266	1,2839
6	2083	3031	1,3740
7	1782	2424	1,2826
8	285	347	1,1490
Média			1,28
DP			0,14
CV (%)			10,94
CVmáx (%)			15,42

DP = estimativa de desvio padrão; CV = coeficiente de variação

$$CV_{máx}(\%) = 2^{(1-0,5 \log 0,000001 * Média)} \text{ (equação de Horwitz)}$$



Segundo a equação de Horwitz (1982), o valor obtido de CV(%) ficou menor que o valor de CV máx(%) calculado. Portanto, a precisão do método foi adequada, considerando a concentração do analito estudado. E de acordo com Inmetro (2016), a recuperação do analito ficou dentro dos critérios de aceitação preconizados, considerando o limite de detecção de 0,01 mg/kg estabelecido no método padrão (COLLISON, 2017a).

3.3. Resultados das análises das amostras de azeite de oliva

Neste projeto de pesquisa foram avaliadas 15 amostras de azeites de oliva rotuladas como extra virgens (EV), 10 amostras de azeites de oliva rotuladas como tipo único (TU) e 10 amostras de óleo composto (OC), quanto ao seu teor de estigmastadienos, composição em ácidos graxos e ésteres de MCPD e glicidol. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.

Das amostras rotuladas como EV podemos observar que 7 delas (47%) apresentaram valores de estigmastadienos maiores que o limite estabelecido pela Instrução Normativa (IN) nº 1 do MAPA (BRASIL, 2012) que é de 0,15 mg/kg para azeites de oliva tipo extra virgem ou virgem.

Das amostras com teores de estigmastadienos maiores que o permitido, obteve-se baixa porcentagem de ácido oleico (C18:1), sendo este o ácido graxo de maior abundância em azeites de oliva. Em decorrência disso, obteve-se uma maior porcentagem de ácido inoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3), confirmando a mistura com outros óleos. Geralmente azeites de oliva com elevados níveis de ácido linoleico (C18:2) e linolenico (C18:3) indicam a mistura de óleos de soja, girassol, e milho etc, descaracterizando a sua classificação como extra virgem (CHRISTOPOULOU et al, 2004).

A maioria das amostras rotuladas como EV e com teor de estigmastadieno maior que 0,15mg/kg também apresentou somatório de ácidos graxos *trans* C18:2+ C18:3t acima de 0,05%, limite máximo estabelecido na legislação brasileira (BRASIL, 2012) o que significa que houve tratamento térmico das mesmas, provavelmente durante o processo de refino. Isso concorda com a afirmação de que houve possível mistura de óleos vegetais de outras origens, o que é legalmente proibido, uma vez que essas amostras apresentavam, na rotulagem, a designação de “extra virgem”. Essas mesmas amostras, analisadas num outro estudo apresentaram níveis de 3-MCPD variando de 0,13 a 1,6 mg/kg, 2-MCPD com variação de < 0,08 a 0,58 mg/kg e GE valores entre 0,27 a 1,98 mg/kg, corroborando com os resultados acima mencionados e indicando a ocorrência de tratamento térmico das amostras.



12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018
01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-145-5

Tabela 3 - Resultados do teor de estigmastadienos (EST) (mg/kg), de ésteres de 2-MCPD e 3-MCPD, glicidol (GE) e dos ácidos graxos C18:1, C18:2, C18:3, C18:1*t* e C18:2*t*+C18:3*t* nas amostras de azeite de oliva rotuladas como extra virgem (EV), tipo único (TU) e óleo composto (OC).

Amostras	EST (MG/KG)	C18:1	C18:2	C18:3	C18:1 <i>t</i>	C18:2 <i>t</i> + C18:3 <i>t</i>	3- MCPD	2- MCPD	GE
EV	<0,01	63,92	12,21	0,75	ND	ND	<0,03	<0,08	<0,08
EV	<0,01	73,77	5,31	0,69	ND	ND	<0,03	<0,08	<0,08
EV	>4MG/KG	27,01	46,24	3,85	ND	1,38	0,78	0,24	1,53
EV	>4MG/KG	29,32	44,78	4,28	0,07	0,54	0,30	0,15	1,98
EV	>4MG/KG	26,76	47,32	5,73	ND	0,22	0,15	0,02	0,40
EV	<0,01	64,51	11,54	0,61	ND	ND	<0,03	<0,08	<0,08
EV	<0,01	72,94	5,56	0,57	0,00	ND	<0,03	<0,08	<0,08
EV	>4MG/KG	26,13	46,45	3,99	0,14	1,61	1,61	0,58	0,82
EV	>4MG/KG	27,86	45,86	4,86	0,00	0,59	0,26	0,13	1,26
EV	>4MG/KG	28,16	46,08	5,19	0,10	0,32	0,24	0,11	0,53
EV	0,12	62,82	12,96	0,96	ND	ND	<0,03	<0,08	<0,08
EV	0,09	62,86	12,93	0,96	ND	ND	0,01	<0,08	<0,08
EV	<0,01	74,36	4,28	0,77	ND	ND	<0,03	<0,08	<0,08
EV	<0,01	74,91	4,72	0,87	ND	ND	<0,03	<0,08	<0,08
EV	1,41	69,17	9,04	0,99	ND	ND	0,13	<0,08	0,27
TU	38,77	31,69	44,21	4,43	0,54	1,55	0,87	0,21	0,45
TU	44,67	74,34	5,04	0,80	0,07	ND	0,71	0,41	0,00
TU	11,01	74,22	5,07	0,76	ND	ND	0,92	0,52	0,40
TU	7,77	72,03	6,68	0,80	ND	ND	0,65	0,34	0,24
TU	97,27	72,46	6,68	0,84	0,14	ND	0,67	0,23	0,21
TU	25,86	72,92	6,43	0,82	0,06	ND	0,80	0,25	0,24
TU	11,75	72,99	6,21	0,78	ND	ND	0,42	0,18	0,22
TU	39,84	27,51	46,25	4,41	ND	0,76	0,42	0,23	0,61
TU	34,35	70,86	12,10	0,86	0,09	0,12	0,56	0,26	0,99
TU	136,09	68,32	10,06	4,30	0,28	0,14	3,77	1,91	1,6
OC	2,57	30,94	43,13	4,86	ND	0,26	0,42	0,18	0,5
OC	11,37	29,22	44,84	4,67	ND	0,39	0,24	0,12	0,39
OC	5,61	27,72	46,91	5,19	ND	0,23	0,22	0,1	0,31
OC	11,46	30,22	44,39	5,01	ND	0,11	0,27	0,13	0,25
OC	8,19	30,55	43,45	3,90	ND	1,12	0,45	0,18	1,09
OC	8,47	26,86	46,61	5,41	ND	0,32	0,19	0,11	0,47
OC	11,59	24,77	48,75	5,54	0,06	0,37	0,13	0,13	0,86
OC	18,58	25,57	48,15	4,87	ND	0,60	0,19	0,25	1,76
OC	12,45	47,14	5,67	5,67	ND	0,42	0,22	0,26	0,48
OC	23,92	47,86	5,42	5,42	ND	0,44	0,39	0,19	1,72

ND = Não detectado

Amostras de azeite de oliva classificados como tipo único são definidas como o produto constituído pela mistura de azeite de oliva refinado, com azeite de oliva virgem ou extra virgem (BRASIL, 2012). Neste estudo foram avaliadas 10 amostras rotuladas como tipo único TU e todas



12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018
01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-145-5

elas apresentaram altos níveis de estigmastadienos, presença de 3-MCPD, 2-MCPD e GE, porém 80% destas continham concentrações de ácido oleico (C18:1) dentro do limite estabelecido na legislação brasileira (55-83%), indicando que essas amostras estão rotuladas corretamente. Apenas 2 delas apresentaram composição de ácidos oleico C18:1, linoleico C18:2 e linolênico C18:3 fora da especificação, indicando a adição de óleos vegetais de sementes, possivelmente óleo de soja, já que este é de maior produção e menor custo no Brasil (ANTONIASI e tal, 1998).

Por definição, óleos compostos são misturas de azeite de oliva virgem ou extra virgem, com óleos vegetais como os de soja, canola, girassol etc. Todas as amostras de óleo composto contempladas neste estudo (OC) continham altos níveis de estigmastadienos o que era esperado devido à presença de óleos refinados em sua composição. A presença de 3-MCPD, 2-MCPD e GE também foi constatada e é coerente pelas mesmas razões citadas para os estigmastadienos.

A presença de quantidades superiores a 0,15 mg/kg de estigmastadienos já é utilizada como marcador para a identificação de fraudes pela legislação brasileira (BRASIL, 2012). A correlação entre os resultados de estigmastadienos e 3-MCPD, 2-MCPD e GE foi concordante para todas as amostras avaliadas. Considerando este fato, sugere-se que estes analitos, considerados contaminantes em alimentos, sejam monitorados em azeites de oliva virgens e extra virgens e utilizados como indicadores complementares de adulteração com óleos e azeites refinados. Vale ressaltar que a mistura de óleos refinados de sementes pode elevar o teor de estigmastadienos e de GE, porém os teores dos MCPDE podem não ser muito elevados, visto que possuem baixas concentrações dos compostos clorados necessários à sua formação durante o refino.

As adulterações de azeite com óleos não refinados obtidos de outras fontes não poderão ser identificadas pela análise de estigmastadienos e nem de 3-MCPD, 2-MCPD e GE. Para esta identificação outras análises previstas na legislação deverão ser utilizadas.

As análises realizadas em óleo composto foram úteis para identificar o potencial de aplicabilidade das análises avaliadas, porém, não existem análises ou adulterações que possam ser constatadas neste tipo de produto.



4. CONCLUSÃO

Foi concluído, pelas análises de estigmastadienos das amostras controle enviadas pelo COI e pelas 8 repetições analíticas, que o método validado apresentou a exatidão e a precisão recomendadas, considerando a faixa de concentração do analito estudado.

Com base nas análises previstas na legislação foi possível identificar adulterações em parte das amostras analisadas neste trabalho classificadas e rotuladas como azeite extra virgem ou tipo único.

Nos azeites tipo único foi possível constatar adulteração com óleos de outras origens em duas amostras. A composição em ácidos graxos, das mesmas, fora da especificação, indicou que essas amostras não possuíam apenas azeite extra virgem e azeite refinado como componentes, mas também óleos de sementes, possivelmente soja.

A presença de 3-MCPD, 2-MCPD e GE foi concordante com a ocorrência de estigmastadienos acima do limite estabelecido na legislação e corrobora o uso destes analitos como indicador complementar para adulterações em azeite extra virgem.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica concedida e ao CCQA/ITAL pelo suporte financeiro para a realização do trabalho.

6. REFERÊNCIAS

AGIOMYRGIANAKI, A.; PETRAKIS, P.V.; DAIS, P. Detection of refined olive oil adulteration with refined hazelnut oil by employing NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. **Talanta**, v.80, p. 2165-2171, 2010.

ANTONIASSI, R.; PEREIRA, D.A.; SZPIZ, R.R.; JABLONKAS, F.H.; LAGO, R.C.A. Avaliação das características de identidade e qualidade de amostras de azeite de oliva. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v.1, n.1-2, p. 32-43, 1998..

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa 1, de 30 de janeiro de 2012. Regulamento Técnico do Azeite de Oliva e do Óleo de Bagaço de Oliva. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 de fevereiro de 2012.

COLLISON, M. W. (Ed.). **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 7th ed., Urbana: AOCS, 2017a. Met. Cd 26-96.



12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018
01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-145-5

COLLISON, M. W. (Ed.). **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 7th ed., Urbana: AOCS, 2017b. Met. Ce 1a-13.

COLLISON, M. W. (Ed.). **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 7th ed., Urbana: AOCS, 2017c. Met. Cd 29a-13.

COLLISON, M. W. (Ed.). **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 7th ed., Urbana: AOCS, 2017d. Met. Cd 27-96.

CHRISTOPOULOU, E.; LAZARAKI, M.; KOMAITIS, M.; KASELIMIS, K. Effectiveness of determinations of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive oils with vegetable oils. **Food Chemistry**, v.84, p. 463-474, 2004.

HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.**, V. 22 N. 8, P.494-495, 1973.

HORWITZ, W. Evaluation on analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**. v. 54, n. 1, pg. 67A – 76^A, 1982.

INMETRO - **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos** - DOQ-CGCRE-008. Coordenação Geral de Acreditação, Revisão 05, Agosto 2016. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf

MIGUEL, A.M.R.O.; SAKAZAKI, N.B. Índices de qualidade para azeite de oliva e azeitonas de mesa e legislação brasileira e internacional. In: OLIVEIRA, A.F. (Ed.). **Oliveira no Brasil: Tecnologias de Produção**. 1ª Ed. Belo Horizonte. EPAMIG, 2012. Capítulo 21, p. 673-725.

QUATTROCCHI, O. A., ANDRIZZI, S. A., LABA, R. F. Introducción a la HPLC aplicación y práctica. Buenos Aires. **Artes Prácticas Farro S.A.** p. 301-328, 1992.

STADLER, R.H. Monochloropropane-1,2-diol esters (MCPDEs) and glycidyl esters (GEs): an update. **Current Opinion in Food Science**, 6, 12–18, 2015.



Determinação de estigmastadienos e correlação com os teores de ésteres de monocloropropanodiol e ésteres de glicidol em azeites de oliva virgens, como marcadores complementares de fraudes

Geovana Soares **Pereira**¹; Eduardo **Vicente**²; Ana Maria Rauen de Oliveira **Miguel**³; Natália Vallim **Tavares**⁴, Kamille **Kamikata**⁵

Nº 18211

Azeite de oliva apresenta características muito apreciadas, sendo alvo de adulterações. A Instrução Normativa 01/2012 do MAPA estabelece limites para azeites, incluindo composição em ácidos graxos e teor de estigmastadienos, utilizado como marcador da adulteração de azeites de oliva virgens com óleos e azeites refinados. Estudos recentes mostram que como os estigmastadienos, os ésteres de monocloropropanodiol (MCPDE) e de glicidol (GE) são formados em altas temperaturas. Considerando seu potencial tóxico, sua ocorrência pode consistir em preocupação de saúde pública. Neste estudo 35 amostras foram analisadas, 15 azeites de oliva extra virgens (EV), 10 azeites tipo único (TU) e 10 óleos compostos (OC). Os resultados mostraram que 47% das amostras EV apresentaram valores de estigmastadienos maiores que o limite estabelecido (0,15 mg/kg), baixos teores de ácido oleico C18:1, somatório de ácidos *trans* C18:2+ C18:3t acima do permitido, indicando mistura com azeite refinado e/ou óleos refinados de outras origens. Estas mesmas amostras foram analisadas em outro estudo e apresentaram 3-MCPD, 2-MCPD e GE respectivamente entre 0,13 e 1,61 mg/kg, < 0,08 e 0,58 mg/kg e 0,27 e 1,98 mg/kg. Das amostras TU 80% apresentaram altos níveis de estigmastadienos, presença de 3-MCPD, 2-MCPD e GE, ácido oleico dentro do limite (55-83%), indicando processamento térmico, porém, sem evidência de adulteração com óleos de outras origens. As amostras OC contém estigmastadienos, 3-MCPD, 2-MCPD e GE, pois possuem óleos refinados em sua composição. A relação entre os resultados sugere o monitoramento de 3-MCPD, 2-MCPD e GE em azeites de oliva virgens como indicadores complementares de adulteração.

Palavras-chaves: Estigmastadienos; 3- MCPD; 2-MCPD; Glicidol; Azeite de oliva

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Biomedicina, Universidade São Francisco, Bragança Paulista-SP; geovanaspereira2@gmail.com

2 Orientador :Diretor geral, ITAL, Campinas-SP; evicente@ital.sp.gov.br

3 Colaborador: Pesquisador Científico, ITAL, Campinas-SP

4 Colaborador :Técnico de Laboratório, ITAL, Campinas-SP

5 Colaborador: Aluna de Mestrado, ITAL, Campinas-SP



ABSTRACT

Olive oil has very appreciated characteristics and for this reason is always subject to adulteration. The Normative Instruction 01/2012 from Brazilian Department of Agriculture establishes limits for olive oils, including fatty acid composition and stigmastadienes content, used as a marker of the adulteration of virgin olive oils with refined oils. Recent studies show that, like stigmastadienes, monochloropropanediol esters (MCPDE) and glycidol (GE) esters are also formed at high temperatures. Considering its toxic potential, its occurrence may raise a public health concern. In this study 35 samples were analyzed, 15 extra virgin olive oils (EV), 10 olive oils (TU) and 10 oil blends (OC). The results showed that 47% of the EV samples had stigmastadienes values higher than the established limit (0.15 mg / kg), low levels of C18: 1 oleic acid, sum of C18: 2*t* + C18: 3*t trans* acids above the permitted limits, indicating a mixture with refined olive oil and / or refined oils from other sources. These same samples were analyzed in another study and presented 3-MCPD, 2-MCPD and GE respectively between 0.13 and 1.61 mg / kg, <0.08 and 0.58 mg / kg and 0.27 and 1.98 mg / kg. For olive oils TU, 80% showed high levels of stigmastadienes, presence of 3-MCPD, 2-MCPD and GE, oleic acid within the limit (55-83%), indicating thermal processing, however, without evidence of adulteration with oils of other origins. The OC samples contain stigmastadienes, 3-MCPD, 2-MCPD and GE, as they have refined oils in their composition. The relationship between the results suggests the monitoring of 3-MCPD, 2-MCPD and GE in virgin olive oils as complementary indicators of adulteration.

Key-words: Stigmastadienes; 3- MCPD; 2-MCPD; Glycidol; Olive Oil



1. INTRODUÇÃO

Dentre os óleos vegetais, o azeite de oliva é o que apresenta características mais marcantes e suas propriedades nutricionais e terapêuticas podem ser comprovadas pela presença de substâncias funcionais que atuam na proteção do organismo humano contra doenças coronarianas e na redução do estresse oxidativo celular (MIGUEL, 2012).

Essas características peculiares fazem desse produto um alvo constante de fraudes que resultam em problemas para as instituições governamentais reguladoras, para os produtores de azeite e para os consumidores. A adição de óleos vegetais de baixo valor comercial e nutricional aos azeites de oliva é a adulteração mais comum que se reporta, embora inúmeras outras fraudes, inclusive as mais sofisticadas, também já façam parte do relato de várias pesquisas (AGIOMYRGIANAKI et al, 2010; CHRISTOPOULOU ET AL, 2004).

A expansão do consumo nacional, principalmente de azeite de oliva extra virgem, justifica a existência de diretivas regulatórias que estabeleçam parâmetros e limites de controle de qualidade e identidade críticos o suficiente para garantir a autenticidade desses produtos, no momento de sua entrada no país, considerando tanto a perspectiva comercial quanto a de saúde pública.

O MAPA - Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária, publicou em 30/01/2012 a Instrução Normativa (IN) nº 1 - Regulamento Técnico do Azeite de Oliva e do Óleo de Bagaço de Oliva que contempla limites máximos e mínimos para diversos parâmetros de identidade e qualidade de azeites, incluindo a composição em ácidos graxos (impressão digital de óleos e gorduras) e os estigmastadienos, substâncias consideradas marcadoras da adulteração de azeite de oliva extra virgem com óleos e azeites refinados (BRASIL, 2012). Mas a literatura cita outros compostos, como os ésteres de monocloropropanodiol (MCPDE) e ésteres de glicidol (GE), que assim como o estigmastadienos, são formados em altas temperaturas através da reação entre lipídios e cloretos e que também poderiam ser estabelecidas como indicadores da ocorrência de fraudes (STADLER, 2015).

A detecção e quantificação dessas substâncias em amostras de azeite de oliva, sua comparação com os limites regulatórios e a correlação entre ambas, pode significar grande avanço na detecção mais rápida da ocorrência dessas fraudes. Além disso como as formas livres dos ésteres de monocloropropanodiol (MCPDE) e ésteres de glicidol (GE) constituem um conhecido grupo de contaminantes químicos formados a partir de lipídeos e cloretos durante o tratamento térmico de alimentos que tem relação direta com segurança alimentar, poderiam ser incluídos nas



legislações pertinentes como mais um parametro de controle de fraudes e também de potencial risco a saúde .

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. MATERIAIS

Os padrões analíticos de colest-3,5-dieno, 2-MCPDE, 3-MCPDE e GE foram adquiridos da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA) e TRC – Toronto Research Chemicals. Os reagentes e solventes utilizados foram todos de grau PA e HPLC. A sílica gel 60 usada na cromatografia de coluna (mesh 70-230) era marca Merck/Millipore. Para a validação da metodologia, com testes de exatidão para o valor de estigmastadienos, foram utilizadas amostras controle recebidas do COI – Conselho Oleícola Internacional (score $|z| \leq 2$), codificadas como: **COI CHEM 2016 M1** (azeite de oliva extra virgem sem filtrar + 10% de azeite de oliva refinado); **COI CHEM 2016 M2A** (75% de azeite de oliva extra virgem + 10% de óleo de girassol alto oleico refinado + 10% de Óleo de soja + 5% de gordura animal); **COI CHEM 2016 M2B** (75% de azeite de oliva extra virgem + 10% de óleo de girassol alto oleico refinado + 10% de Óleo de colza + 5% de gordura animal).

Para os testes de precisão da determinação de estigmastadienos (8 replicatas, em dias diferentes, com o mesmo técnico e utilizando a mesma metodologia) foi utilizada uma amostra comercial de azeite de oliva identificada como extra virgem.

A concentração de estigmastadienos foi determinada em 15 amostras de azeite de oliva rotuladas como extra virgem, 10 amostras de azeite tipo único e 10 amostras de óleo composto (mistura de azeite de oliva extra virgem, virgem, ou refinado com outro tipo de óleo vegetal) todas de diferentes marcas e adquiridas em pontos distintos no comércio de Campinas.

2.2. MÉTODOS

- **Determinação de Estigmastadienos:** A quantificação de estigmastadienos foi realizada a partir da matéria insaponificável dos azeites e subsequente separação da fração de hidrocarbonetos esteróides por cromatografia em coluna aberta, de sílica gel (COLLISON, 2017a). As amostras com teores de estigmastadienos acima de 4 mg/kg foram eluídas diretamente na coluna de sílica gel, adicionadas de 1ml de solução padrão (COLLISON, 2017d). A fase móvel usada foi hexano grau HPLC, com fluxo de 1 mL/min. Os primeiros 30 mL eluídos foram descartados e os 40 mL seguintes foram recolhidos em balão de fundo chato e rotaevaporados a



30°C. O resíduo foi resuspendido em 200µL de hexano e injetado em Cromatógrafo Gasoso Shimadzu usando: coluna capilar DB-5 (5% Fenil 95 % dimetilpolisiloxano), de 30m, 0,25 mm d.i., 0,25 µm de filme; rampa de temperatura de 235 °C/6 min, aquecimento de 235°C a 285°C (2°C/min) e 285 °C/ 9 min; hidrogênio como gás de arraste a 1 mL/min e pressão de 90 kPa; injeção de 1 µL; temperatura do injetor 300°C; temperatura do detector por ionização de chama (FID) 320°C. A quantificação do estigmastadienos foi feita por padronização interna, com colestá-3,5-dieno como padrão interno). A concentração de estigmastadienos na amostra é calculada através da fórmula:

$$\text{mg estigmastadienos/kg} = \frac{(A_s) \times M_c}{(A_c) \times (M_a)}$$

onde:

A_s = área do pico de estigmastadienos

A_c = área do pico do padrão interno

M_c = massa de padrão adicionada (µg)

M_a = massa inicial de amostra (g)

- **Composição em ácidos graxos:** Os azeites foram transesterificados de acordo com Hartman & Lago (1973) e injetados em Cromatógrafo Gasoso Agilent Technologies usando: coluna capilar CP-SIL 88 (100 m x 0,25 mm i.d., 0,20 µm de filme), rampa de temperatura de 140°C/4min, aquecimento de 140°C a 230°C (4,5°C/min), e 230°C/ 24 min; gás de arraste hidrogênio a 0,6 mL/min; gás “make-up” nitrogênio a 30 mL/min; temperatura do injetor, 260°C; temperatura do detector FID 260°C; injeção de 1 µL. A identificação dos ácidos graxos foi feita pela comparação do tempo de retenção dos ácidos graxos das amostras e de padrões específicos. A quantificação foi feita por normalização de área e os resultados expressos em g/100g de amostra (COLLISON, 2017b).

- **Ésteres de 2-MCPD, 3-MCPD e glicidol:** os azeites foram adicionados de soluções de padrão interno desses compostos e por reações de transesterificação com ácido sulfúrico e metanol, foram obtidas as formas livres de 2-MCPD, 3-MCPD e glicidol. Reações de derivatização com solução saturada de PBA (25%, p/v em acetona:água, 19:1, v/v) foram feitas na sequencia e os resíduos obtidos foram dissolvidos em 300 µL de heptano. Os compostos foram analisados por



CG-MS, em equipamento HP 7890A (CG) acoplado a um espectrômetro de massa Agilent Technologies 5975C. Os extratos foram injetados a 250°C no modo splitless pulsado, coluna capilar HP-1ms (30 m x 0,25 mm, 1 µm) rampa de temperatura de 80°C/1 min, de 80°C a 170°C a 10°C/min, de 170°C a 200°C a 3°C/min, de 200°C a 300°C a 15°C/min e 15 min a 300°C; hélio como gás de arraste a 0,8 mL/min; detector de monitoramento de íons. (COLLISON, 2017c).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Testes de exatidão

A Tabela 1 apresenta os resultados de estigmastadienos informados das amostras controle do COI, os obtidos nos laboratórios do CCQA e o percentual de recuperação entre os resultados.

Tabela 1 – Resultados de estigmastadienos (mg/kg) para as amostras COI (score $|z| \leq 2$) e CCQA e percentual de recuperação.

Amostras	Resultados COI (mg/kg)	Resultados CCQA (mg/kg)	% de recuperação
COI CHEM 2016 M1	0,78-1,08 Média = 0,93	0,86(0,04) _a CV (%) = 4,21	92,5%
COI CHEM 2016 M2A	3,33-4,59 Média = 3,96	3,74 (0,07) ^a CV (%) = 1,91	94,4%
COI CHEM 2016 M2B	4,59-6,33 Média = 5,46	5,69 (0,14) _a CV (%) = 2,39	104,2%

^aMédia e estimativa de desvio padrão.

Quattrocchi (1992) estabelece a relação entre a exatidão obtida e a exatidão requerida, aplicando-se a equação abaixo e considerando-se $t_{ob} < t_{tab(95;2)} = 4,303$:

$$t_{ob} = \frac{[100 - \bar{X}]}{CV \cdot \sqrt{n}}$$

Portanto, temos, para cada uma das amostras avaliadas:



$$t_{ob} = 1,29 < t_{tab(95;2)} = 4,303 \rightarrow \text{COI CHEM 2016 M1.}$$

$$t_{ob} = 2,07 < t_{tab(95;2)} = 4,303 \rightarrow \text{COI CHEM 2016 M2A.}$$

$$t_{ob} = 1,24 < t_{tab(95;2)} = 4,303 \rightarrow \text{COI CHEM 2016 M2B.}$$

De acordo com os resultados acima obtidos o método apresentou a exatidão requerida. A amostra COI CHEM 2016 M2B foi avaliada pelo método direto na coluna de sílica (COLLISON, 2017c).

3.2. Testes de precisão

Para os testes de precisão foram feitas 8 repetições analíticas da determinação de estigmastadienos, em dias diferentes, com o mesmo técnico e a mesma metodologia (COLLISON, 2017a). Para isso foi utilizada uma amostra comercial de azeite de oliva denominada extra virgem. A Tabela 2 mostra os resultados obtidos para a precisão do método.

Tabela 2 – Resultados da precisão do método de determinação de estigmastadienos, com áreas dos picos do padrão interno (colesta-3,5-dieno), dos estigmastadienos e o valor obtido em mg/kg.

Ensaio	Área do padrão interno (Ap)	Área dos estigmastadienos (Ae)	Estigmastadienos (mg/kg)
1	1249	1852	1,3950
2	1539	2323	1,4242
3	503	698	1,3105
4	1048	1115	1,0046
5	1667	2266	1,2839
6	2083	3031	1,3740
7	1782	2424	1,2826
8	285	347	1,1490
Média			1,28
DP			0,14
CV (%)			10,94
CVmáx (%)			15,42

DP = estimativa de desvio padrão; CV = coeficiente de variação

$$CVmáx(\%) = 2^{(1-0,5 \log 0,000001 * Média)} \text{ (equação de Horwitz)}$$



Segundo a equação de Horwitz (1982), o valor obtido de CV(%) ficou menor que o valor de CV máx(%) calculado. Portanto, a precisão do método foi adequada, considerando a concentração do analito estudado. E de acordo com Inmetro (2016), a recuperação do analito ficou dentro dos critérios de aceitação preconizados, considerando o limite de detecção de 0,01 mg/kg estabelecido no método padrão (COLLISON, 2017a).

3.3. Resultados das análises das amostras de azeite de oliva

Neste projeto de pesquisa foram avaliadas 15 amostras de azeites de oliva rotuladas como extra virgens (EV), 10 amostras de azeites de oliva rotuladas como tipo único (TU) e 10 amostras de óleo composto (OC), quanto ao seu teor de estigmastadienos, composição em ácidos graxos e ésteres de MCPD e glicidol. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 3.

Das amostras rotuladas como EV podemos observar que 7 delas (47%) apresentaram valores de estigmastadienos maiores que o limite estabelecido pela Instrução Normativa (IN) nº 1 do MAPA (BRASIL, 2012) que é de 0,15 mg/kg para azeites de oliva tipo extra virgem ou virgem.

Das amostras com teores de estigmastadienos maiores que o permitido, obteve-se baixa porcentagem de ácido oleico (C18:1), sendo este o ácido graxo de maior abundância em azeites de oliva. Em decorrência disso, obteve-se uma maior porcentagem de ácido inoleico (C18:2) e ácido linolênico (C18:3), confirmando a mistura com outros óleos. Geralmente azeites de oliva com elevados níveis de ácido linoleico (C18:2) e linolenico (C18:3) indicam a mistura de óleos de soja, girassol, e milho etc, descaracterizando a sua classificação como extra virgem (CHRISTOPOULOU et al, 2004).

A maioria das amostras rotuladas como EV e com teor de estigmastadieno maior que 0,15mg/kg também apresentou somatório de ácidos graxos *trans* C18:2+ C18:3t acima de 0,05%, limite máximo estabelecido na legislação brasileira (BRASIL, 2012) o que significa que houve tratamento térmico das mesmas, provavelmente durante o processo de refino. Isso concorda com a afirmação de que houve possível mistura de óleos vegetais de outras origens, o que é legalmente proibido, uma vez que essas amostras apresentavam, na rotulagem, a designação de “extra virgem”. Essas mesmas amostras, analisadas num outro estudo apresentaram níveis de 3-MCPD variando de 0,13 a 1,6 mg/kg, 2-MCPD com variação de < 0,08 a 0,58 mg/kg e GE valores entre 0,27 a 1,98 mg/kg, corroborando com os resultados acima mencionados e indicando a ocorrência de tratamento térmico das amostras.



12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018
01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-145-5

Tabela 3 - Resultados do teor de estigmastadienos (EST) (mg/kg), de ésteres de 2-MCPD e 3-MCPD, glicidol (GE) e dos ácidos graxos C18:1, C18:2, C18:3, C18:1*t* e C18:2*t*+C18:3*t* nas amostras de azeite de oliva rotuladas como extra virgem (EV), tipo único (TU) e óleo composto (OC).

Amostras	EST (MG/KG)	C18:1	C18:2	C18:3	C18:1 <i>t</i>	C18:2 <i>t</i> + C18:3 <i>t</i>	3- MCPD	2- MCPD	GE
EV	<0,01	63,92	12,21	0,75	ND	ND	<0,03	<0,08	<0,08
EV	<0,01	73,77	5,31	0,69	ND	ND	<0,03	<0,08	<0,08
EV	>4MG/KG	27,01	46,24	3,85	ND	1,38	0,78	0,24	1,53
EV	>4MG/KG	29,32	44,78	4,28	0,07	0,54	0,30	0,15	1,98
EV	>4MG/KG	26,76	47,32	5,73	ND	0,22	0,15	0,02	0,40
EV	<0,01	64,51	11,54	0,61	ND	ND	<0,03	<0,08	<0,08
EV	<0,01	72,94	5,56	0,57	0,00	ND	<0,03	<0,08	<0,08
EV	>4MG/KG	26,13	46,45	3,99	0,14	1,61	1,61	0,58	0,82
EV	>4MG/KG	27,86	45,86	4,86	0,00	0,59	0,26	0,13	1,26
EV	>4MG/KG	28,16	46,08	5,19	0,10	0,32	0,24	0,11	0,53
EV	0,12	62,82	12,96	0,96	ND	ND	<0,03	<0,08	<0,08
EV	0,09	62,86	12,93	0,96	ND	ND	0,01	<0,08	<0,08
EV	<0,01	74,36	4,28	0,77	ND	ND	<0,03	<0,08	<0,08
EV	<0,01	74,91	4,72	0,87	ND	ND	<0,03	<0,08	<0,08
EV	1,41	69,17	9,04	0,99	ND	ND	0,13	<0,08	0,27
TU	38,77	31,69	44,21	4,43	0,54	1,55	0,87	0,21	0,45
TU	44,67	74,34	5,04	0,80	0,07	ND	0,71	0,41	0,00
TU	11,01	74,22	5,07	0,76	ND	ND	0,92	0,52	0,40
TU	7,77	72,03	6,68	0,80	ND	ND	0,65	0,34	0,24
TU	97,27	72,46	6,68	0,84	0,14	ND	0,67	0,23	0,21
TU	25,86	72,92	6,43	0,82	0,06	ND	0,80	0,25	0,24
TU	11,75	72,99	6,21	0,78	ND	ND	0,42	0,18	0,22
TU	39,84	27,51	46,25	4,41	ND	0,76	0,42	0,23	0,61
TU	34,35	70,86	12,10	0,86	0,09	0,12	0,56	0,26	0,99
TU	136,09	68,32	10,06	4,30	0,28	0,14	3,77	1,91	1,6
OC	2,57	30,94	43,13	4,86	ND	0,26	0,42	0,18	0,5
OC	11,37	29,22	44,84	4,67	ND	0,39	0,24	0,12	0,39
OC	5,61	27,72	46,91	5,19	ND	0,23	0,22	0,1	0,31
OC	11,46	30,22	44,39	5,01	ND	0,11	0,27	0,13	0,25
OC	8,19	30,55	43,45	3,90	ND	1,12	0,45	0,18	1,09
OC	8,47	26,86	46,61	5,41	ND	0,32	0,19	0,11	0,47
OC	11,59	24,77	48,75	5,54	0,06	0,37	0,13	0,13	0,86
OC	18,58	25,57	48,15	4,87	ND	0,60	0,19	0,25	1,76
OC	12,45	47,14	5,67	5,67	ND	0,42	0,22	0,26	0,48
OC	23,92	47,86	5,42	5,42	ND	0,44	0,39	0,19	1,72

ND = Não detectado

Amostras de azeite de oliva classificados como tipo único são definidas como o produto constituído pela mistura de azeite de oliva refinado, com azeite de oliva virgem ou extra virgem (BRASIL, 2012). Neste estudo foram avaliadas 10 amostras rotuladas como tipo único TU e todas



12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018
01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-145-5

elas apresentaram altos níveis de estigmastadienos, presença de 3-MCPD, 2-MCPD e GE, porém 80% destas continham concentrações de ácido oleico (C18:1) dentro do limite estabelecido na legislação brasileira (55-83%), indicando que essas amostras estão rotuladas corretamente. Apenas 2 delas apresentaram composição de ácidos oleico C18:1, linoleico C18:2 e linolênico C18:3 fora da especificação, indicando a adição de óleos vegetais de sementes, possivelmente óleo de soja, já que este é de maior produção e menor custo no Brasil (ANTONIASI e tal, 1998).

Por definição, óleos compostos são misturas de azeite de oliva virgem ou extra virgem, com óleos vegetais como os de soja, canola, girassol etc. Todas as amostras de óleo composto contempladas neste estudo (OC) continham altos níveis de estigmastadienos o que era esperado devido à presença de óleos refinados em sua composição. A presença de 3-MCPD, 2-MCPD e GE também foi constatada e é coerente pelas mesmas razões citadas para os estigmastadienos.

A presença de quantidades superiores a 0,15 mg/kg de estigmastadienos já é utilizada como marcador para a identificação de fraudes pela legislação brasileira (BRASIL, 2012). A correlação entre os resultados de estigmastadienos e 3-MCPD, 2-MCPD e GE foi concordante para todas as amostras avaliadas. Considerando este fato, sugere-se que estes analitos, considerados contaminantes em alimentos, sejam monitorados em azeites de oliva virgens e extra virgens e utilizados como indicadores complementares de adulteração com óleos e azeites refinados. Vale ressaltar que a mistura de óleos refinados de sementes pode elevar o teor de estigmastadienos e de GE, porém os teores dos MCPDE podem não ser muito elevados, visto que possuem baixas concentrações dos compostos clorados necessários à sua formação durante o refino.

As adulterações de azeite com óleos não refinados obtidos de outras fontes não poderão ser identificadas pela análise de estigmastadienos e nem de 3-MCPD, 2-MCPD e GE. Para esta identificação outras análises previstas na legislação deverão ser utilizadas.

As análises realizadas em óleo composto foram úteis para identificar o potencial de aplicabilidade das análises avaliadas, porém, não existem análises ou adulterações que possam ser constatadas neste tipo de produto.



4. CONCLUSÃO

Foi concluído, pelas análises de estigmastadienos das amostras controle enviadas pelo COI e pelas 8 repetições analíticas, que o método validado apresentou a exatidão e a precisão recomendadas, considerando a faixa de concentração do analito estudado.

Com base nas análises previstas na legislação foi possível identificar adulterações em parte das amostras analisadas neste trabalho classificadas e rotuladas como azeite extra virgem ou tipo único.

Nos azeites tipo único foi possível constatar adulteração com óleos de outras origens em duas amostras. A composição em ácidos graxos, das mesmas, fora da especificação, indicou que essas amostras não possuíam apenas azeite extra virgem e azeite refinado como componentes, mas também óleos de sementes, possivelmente soja.

A presença de 3-MCPD, 2-MCPD e GE foi concordante com a ocorrência de estigmastadienos acima do limite estabelecido na legislação e corrobora o uso destes analitos como indicador complementar para adulterações em azeite extra virgem.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de Iniciação Científica concedida e ao CCQA/ITAL pelo suporte financeiro para a realização do trabalho.

6. REFERÊNCIAS

AGIOMYRGIANAKI, A.; PETRAKIS, P.V.; DAIS, P. Detection of refined olive oil adulteration with refined hazelnut oil by employing NMR spectroscopy and multivariate statistical analysis. **Talanta**, v.80, p. 2165-2171, 2010.

ANTONIASSI, R.; PEREIRA, D.A.; SZPIZ, R.R.; JABLONKAS, F.H.; LAGO, R.C.A. Avaliação das características de identidade e qualidade de amostras de azeite de oliva. **Brazilian Journal of Food Technology**. Campinas, v.1, n.1-2, p. 32-43, 1998..

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa 1, de 30 de janeiro de 2012. Regulamento Técnico do Azeite de Oliva e do Óleo de Bagaço de Oliva. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 de fevereiro de 2012.

COLLISON, M. W. (Ed.). **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 7th ed., Urbana: AOCS, 2017a. Met. Cd 26-96.



12º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2018
01 a 03 de agosto de 2018 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-145-5

COLLISON, M. W. (Ed.). **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 7th ed., Urbana: AOCS, 2017b. Met. Ce 1a-13.

COLLISON, M. W. (Ed.). **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 7th ed., Urbana: AOCS, 2017c. Met. Cd 29a-13.

COLLISON, M. W. (Ed.). **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 7th ed., Urbana: AOCS, 2017d. Met. Cd 27-96.

CHRISTOPOULOU, E.; LAZARAKI, M.; KOMAITIS, M.; KASELIMIS, K. Effectiveness of determinations of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive oils with vegetable oils. **Food Chemistry**, v.84, p. 463-474, 2004.

HARTMAN, L. & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Lab. Pract.**, V. 22 N. 8, P.494-495, 1973.

HORWITZ, W. Evaluation on analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Analytical Chemistry**. v. 54, n. 1, pg. 67A – 76^A, 1982.

INMETRO - **Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos** - DOQ-CGCRE-008. Coordenação Geral de Acreditação, Revisão 05, Agosto 2016. Disponível em: http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf

MIGUEL, A.M.R.O.; SAKAZAKI, N.B. Índices de qualidade para azeite de oliva e azeitonas de mesa e legislação brasileira e internacional. In: OLIVEIRA, A.F. (Ed.). **Oliveira no Brasil: Tecnologias de Produção**. 1ª Ed. Belo Horizonte. EPAMIG, 2012. Capítulo 21, p. 673-725.

QUATTROCCHI, O. A., ANDRIZZI, S. A., LABA, R. F. Introducción a la HPLC aplicación y práctica. Buenos Aires. **Artes Prácticas Farro S.A.** p. 301-328, 1992.

STADLER, R.H. Monochloropropane-1,2-diol esters (MCPDEs) and glycidyl esters (GEs): an update. **Current Opinion in Food Science**, 6, 12–18, 2015.