



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
CCQA**

**KAMILLE KAMIKATA**

**CONTAMINAÇÃO DE AZEITE DE OLIVA COM ÉSTERES DE 3-MCPD,  
2-MCPD E GLICIDOL E CORRELAÇÃO COM OS PARÂMETROS DE  
IDENTIDADE E QUALIDADE**

**CAMPINAS  
2018**



**KAMILLE KAMIKATA**

**CONTAMINAÇÃO DE AZEITE DE OLIVA COM ÉSTERES DE 3-MCPD, 2-MCPD E GLICIDOL E CORRELAÇÃO COM OS PARÂMETROS DE IDENTIDADE E QUALIDADE**

*Dissertação apresentada ao Instituto de Tecnologia de Alimentos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.*

Aluna: Kamille Kamikata

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Amelia Verdiani Tfouni

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Kamille Kamikata e orientada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Amelia Verdiani Tfouni.

**CAMPINAS**

**2018**

**Agência:** CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

### **Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Bibliotecária Adriana Gomes do Nascimento CRB/8 8853 –  
Biblioteca Central do ITAL- Instituto de Tecnologia de Alimentos.

K15c Kamikata, Kamille. Contaminação de azeite de oliva com ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol e correlação com os parâmetros de identidade e qualidade. Kamille Kamikata / Dissertação de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2018.

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvia Amelia Verdiani Tfouni (orientador)

Inclui bibliografia

1. Ésteres de 3-MCPD. 2. Ésteres de 2-MCPD. 3. Ésteres de glicidol.  
4. Adulteração. 5. Azeite de oliva. I. Instituto de Tecnologia de Alimentos, CCQA - Centro de Ciência e qualidade de Alimentos. II. Kamille Kamikata. III. Título.

**Título em inglês:** Contamination of olive oil with 3-MCPD, 2-MCPD and glycidyl esters and correlation with identity and quality parameters

**Key-words:** 3-MCPD esters, 2-MCPD esters, glycidyl esters, adulteration, olive oil

**Titulação:** Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Banca Examinadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silvia Amelia Verdiani Tfouni (orientadora)

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Adriana Pavesi Ariseto (membro titular)

Prof. Dr. Mateus Henrique Petrarca (membro titular)

Prof. Dr. Marcelo Antonio Morgano (membro suplente)

**Data da Defesa:** 06 de abril de 2018

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

## BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Kamille Kamikata, aprovada pela Comissão Julgadora em 06 de abril de 2018.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silvia Amelia Verdiani Tfouni  
CCQA/ITAL - (Presidente)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Pavesi Ariseto Bragotto  
FEA/UNIICAMP (titular)

---

Dr. Mateus Henrique Petrarca

---

Prof. Dr. Marcelo Antônio Morgano  
CCQA/ITAL (suplente)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer a Deus por me guiar em todos os momentos de minha caminhada.

À minha família, mãe, pai, irmãos e minha cunhada Carol que já faz parte da família, que sempre me apoiaram nas minhas decisões e me incentivaram a ir em busca dos meus sonhos. Vocês fizeram toda a diferença.

Ao Johan, meu namorado, que sempre me incentivou e me deu forças, o meu muito obrigada.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Silvia Amelia Verdiani Tfouni pela oportunidade concedida, por toda ajuda e paciência.

Ao Dr. Eduardo Vicente por ter me recebido no ITAL para a realização do estágio, e por me orientar ao longo dessa etapa e do mestrado. Obrigada pela atenção, dedicação e por todo o tempo disponibilizado para me ensinar.

A todos os amigos do mestrado pela amizade e incentivo de sempre.

Ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) pela formação profissional. E aos pesquisadores e funcionários do CCQA por toda ajuda e colaboração.

Agradeço também à CAPES pela concessão da bolsa.

À Dr<sup>a</sup> Adriana P. Ariseto e ao Dr. Mateus H. Petrarca por terem aceito o convite de participação como membros da banca de defesa.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Nos últimos anos, pesquisas com 3-MCPDE (ésteres de 3-monocloropropano-1,2-diol), 2-MCPDE (ésteres de 2-monocloropropano-1,3-diol) e GE (ésteres de glicidol) tem recebido bastante atenção devido à sua ampla ocorrência em produtos alimentícios, sendo uma preocupação em relação à segurança de alimentos. Esses compostos são, em geral, considerados substâncias tóxicas formadas principalmente durante o processamento/refino de óleos comerciais. A International Agency for Research on Cancer – IARC categorizou o 3-MCPD como um "possível carcinógeno humano" e o glicidol como um "provável carcinógeno para seres humanos". O azeite de oliva é um produto muito consumido no mundo inteiro devido às suas propriedades organolépticas características, além dos seus benefícios para a saúde. Porém, os azeites de oliva e misturas contendo azeite de oliva com óleo de bagaço de oliva ou outros óleos vegetais refinados podem ser fonte desses contaminantes, causando dessa forma uma preocupação à saúde dos consumidores. Dessa forma, o objetivo do presente projeto foi determinar os níveis de 3-MCPDE, 2-MCPDE e GE em amostras comercializadas como azeite de oliva extra virgem (EVOO), azeite de oliva e óleo composto (n = 76), através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e correlacionar os dados obtidos com os parâmetros de identidade e qualidade. Os níveis de 3-MCPDE, 2-MCPDE e GE variaram de não detectados a 1,16 mg/kg, não detectados a 0,58 mg/kg e não detectados a 1,98 mg/kg em EVOO, respectivamente. As amostras comercializadas como azeite de oliva apresentaram concentrações de 3-MCPDE que variaram de 0,28 a 3,77 mg/kg, de 2-MCPDE de 0,17 a 1,91 mg/kg e de GE de não detectado a 1,88 mg/kg. Para os óleos compostos, os níveis de 3-MCPDE encontrados foram de 0,18 a 0,61 mg/kg, de 2-MCPDE foram de não detectados a 0,25 mg/kg e GE de 0,31 a 1,84 mg/kg. Esses contaminantes foram detectados em 34,8% das amostras comercializadas como EVOO. Como o processamento de EVOO não requer o uso de altas temperaturas, esses ésteres não devem estar presentes nesses produtos, indicando uma possível adulteração com a adição de algum tipo de óleo refinado. De acordo com este estudo, a determinação de 3-MCPDE, 2-MCPDE e GE pode ser utilizada também como um indicador complementar de adulteração de EVOO.

**Palavras-chave:**

Contaminantes; ésteres de 3-MCPD; ésteres de 2-MCPD; ésteres de glicidol; azeite de oliva.



## **ABSTRACT**

In recent years, research on 3-MCPDE (3-monochloropropane-1,2-diol esters), 2-MCPDE (2-monochloropropane-1,3-diol esters) and GE (glycidyl ester) has received attention because of its wide occurrence in food products, being a concern to food safety. These compounds are considered toxic substances formed mainly during the processing/refining of oils. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has categorized 3-MCPD as a "possible human carcinogen" and glycidol as a "probable human carcinogen." Olive oil is a widely consumed product worldwide due to its characteristic organoleptic properties, in addition to its health benefits. However, olive oils and blends containing olive oil with olive pomace oil or other refined vegetable oils may be a source of these contaminants, being a concern to consumers health. The objective of the present project was to determine the levels of 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE in samples commercialized as extra virgin olive oil (EVOO), olive oil and oil blend (n = 76), using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and correlate the data obtained with the parameters of identity and quality. Concentrations of 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE ranged from not detected to 1.16 mg/kg, not detected to 0.58 mg/kg and not detected to 1.98 mg/kg in EVOO, respectively. The samples commercialized as olive oil presented concentrations ranging from 0.28 to 3.77 mg/kg for 3-MCPDE, from 0.17 to 1.91 mg/kg for 2-MCPDE and from not detected to 1.88 mg/kg for GE. For oil blends, 3-MCPDE levels were from 0.18 to 0.61 mg/kg, 2-MCPDE levels were from not detected to 0.25 mg/kg and GE ranged from 0.31 to 1.84 mg/kg. These contaminants were detected in 34.8% of samples commercialized as EVOO. As the processing of EVOO does not require the use of high temperatures, these esters should not be present in these products, indicating that they were probably adulterated with the addition of some types of refined oil. According to this study, the determination of 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE can also be used as a complementary indicator of adulteration of EVOO.

### **Key words:**

Contaminants; 3-MCPD esters; 2-MCPD esters; glycidyl esters; olive oil.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	v
ABSTRACT .....	vii
SUMÁRIO .....	viii
INTRODUÇÃO .....	1
Referências Bibliográficas.....	2
Objetivos específicos .....	3
CAPÍTULO 1 .....	4
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3-MCPD, 2-MCPD e glicidol .....	4
Ésteres de 3-MCPD e 2-MCPD .....	6
Ésteres de Glicidol.....	10
Azeite de oliva .....	11
Adulteração de azeite de oliva.....	18
Formação e ocorrência de ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol em azeites refinados e óleo de bagaço de oliva.....	19
Métodos Analíticos .....	21
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
CAPÍTULO 2 - Occurrence of 3-MCPD, 2-MCPD and glycidyl esters in extra virgin olive oils, olive oils and oil blends and correlation with identity and quality parameters	34
Abstract.....	34
1. Introduction .....	35
2. Material and methods.....	38
2.1. Samples.....	38
2.2. Standards .....	38
2.3. Solvents and reagents .....	39

2.4. Method for 3-MCPD, 2-MCPD and glycidyl esters determination .....	39
2.4.1. Sample preparation .....	39
2.4.2. GC-MS.....	41
2.4.3. Method validation.....	41
2.5. Free Fatty Acids, Peroxide Value, Specific Extinction, Fatty Acids Composition and Stigmastadienes .....	42
2.6. Statistical Analysis .....	44
3. Results and discussion .....	44
3.1. 3-MCPD, 2-MCPD and glycidyl esters.....	44
3.2. Identity and quality parameters for olive oils .....	48
4. Conclusions.....	54
5. References.....	55
CONCLUSÕES .....	62
ANEXO 1.....	63
ANEXO 2.....	64
Resultados dos parâmetros de identidade e qualidade .....	64

## INTRODUÇÃO

A formação de compostos tóxicos durante o processamento de alimentos tem recebido atenção nas últimas décadas pelo fato de colocar sob suspeita alimentos amplamente consumidos pela população e considerados seguros ou até mesmo saudáveis.

Os ésteres de 3-monocloropropano-1,2-diol (3-MCPD), 2-monocloropropano-1,3-diol (2-MCPD) e glicidol são contaminantes potencialmente tóxicos, formados principalmente durante o refino de óleos vegetais quando esses são submetidos a altas temperaturas. A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer - IARC) classificou o 3-MCPD como possível carcinógeno e o glicidol como provável carcinógeno (IARC; 2000, 2012). Uma vez que o processamento de azeite de oliva extra virgem não requer o uso de altas temperaturas, não são esperadas quantidades significativas de ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol, a menos que o produto tenha sido adulterado com a adição de um óleo vegetal refinado.

O azeite de oliva extra virgem é um produto de alto valor agregado e que apresenta alto valor nutricional e benefícios significativos em termos de saúde. O azeite de oliva virgem é obtido do fruto da oliveira somente através de processos mecânicos ou outros meios físicos. Quando este está impróprio para o consumo, é considerado como lampante. O óleo de bagaço de oliva refinado é definido como o produto obtido através do tratamento do bagaço de frutos da oliveira, com solventes ou outros tipos de tratamentos físicos. Este produto deve obrigatoriamente ser refinado e não deve ser designado como "azeite de oliva".

Para ampliar ganhos econômicos, os azeites de oliva extra virgem tem sido objeto de vários tipos de adulterações. As mais comuns são as misturas do azeite de oliva extra virgem com azeite de oliva de qualidades distintas, como o azeite de oliva virgem, lampante, refinado e o óleo de bagaço de oliva. E ainda, outra adulteração comum é a adição de outros óleos vegetais de valor comercial inferior (Aued-Pimentel *et al.*, 2008; Meira *et al.*, 2014).

As adulterações que até o momento eram formas de lesar o consumidor para obter vantagem econômica, passam a ter outro significado. Tendo em vista a

toxicidade associada aos ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol, a questão acrescenta um potencial risco à saúde da população.

Neste contexto, o objetivo geral do presente projeto foi realizar um levantamento dos níveis de ocorrência de ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol em azeites de oliva extra virgem, azeites de oliva e óleos compostos, avaliando se há correlação desses contaminantes com os parâmetros de identidade e qualidade estabelecidos para azeite de oliva pela legislação brasileira (teor de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, extinção específica a 232 e 270 nm, delta K, composição em ácidos graxos e estigmastadienos).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aued-Pimentel, S.; Takemoto, E.; Kumagai e. E.; Cano C. B. (2008). Determinação da diferença entre o valor real e o teórico do triglicerídeo ECN 42 para a detecção de adulteração em azeites de oliva comercializados no Brasil. *Química Nova*, 31(1).

IARC (International Agency for Research on Cancer). (2000). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Glicidol, p. 469–486.

IARC (International Agency for Research on Cancer). (2012). 3-Monochloro-1,2-propanediol. Monographs V. 101. Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-water. Lyon, France, 349-374.

Meira, M., Quintella, C. M., Ribeiro, E. M. D. O., Santos, M. a, Luna, S., Lopes, A., & Cid, D. (2014). Identification of Adulteration of Olive Oil with Other Edible Oils by LED-induced Fluorescence and Multivariate Calibration. *International Journal of Chemistry*, 6(4), 31–37.

## **OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho tem como objetivo realizar um levantamento dos níveis de ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol em azeites de oliva e misturas contendo azeite de oliva comercializadas no Brasil e correlacionar com os principais parâmetros de identidade e qualidade, de acordo com a Instrução Normativa 1, de 30 de janeiro de 2012 e confrontar sua denominação de venda.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Validar o método oficial da AOCS Cd 29a-13 (Firestone, 2014a) para quantificação de ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol.
- Determinar os níveis de ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol em azeites de oliva extra virgem, azeites de oliva e óleos compostos.
- Avaliar indícios de adulteração em azeites de oliva extra virgem através da determinação dos parâmetros de identidade e qualidade (teor de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, extinção específica a 232 e 270 nm, delta K, estigmastadienos e composição em ácidos graxos).
- Verificar a existência de correlação entre a presença dos ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol e parâmetros de identidade e qualidade para azeite de oliva.

## CAPÍTULO 1

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### ***3-MCPD, 2-MCPD e glicidol***

Os cloropropanóis são considerados contaminantes formados durante o processamento de alimentos, tendo lipídeos e cloretos como precursores. Os cloropropanóis são compostos derivados do glicerol e são estruturalmente formados por álcoois e dióis de três carbonos ligados a um ou dois átomos de cloro. Entre eles estão o 3-MCPD (3-monocloropropano-1,2-diol) e o 2-MCPD (2-monocloropropano-1,3-diol) (Seefelder *et al.*, 2011; Svejková *et al.*, 2004). O glicidol, por sua vez, é um composto orgânico que está relacionado à formação e decomposição do 3-MCPD e do 2-MCPD e forma ésteres com os ácidos graxos durante o refino de óleos vegetais (EFSA, 2016).

Em 1978, Velíšek e colaboradores descobriram que os cloropropanóis poderiam ser formados em proteína vegetal hidrolisada durante a sua reação de hidrólise com ácido clorídrico (Velíšek *et al.*, 1978). O ácido clorídrico utilizado na hidrólise reage com o residual de lipídeos presente na proteína levando à formação dos cloropropanóis, principalmente o 3-MCPD, em quantidades maiores, e o 2-MCPD, em quantidades menores. Após a descoberta, vários estudos sobre a ocorrência de 3-MCPD foram realizados demonstrando que os cloropropanóis são contaminantes que também podem ser formados a partir do processamento industrial ou doméstico de outros alimentos como produtos de panificação (como pães, bolos e donuts), peixes, queijos e carnes (Stadler, 2015).

O 3-MCPD foi avaliado pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer – IARC) em 2012, tendo a agência classificado o composto na categoria 2B, como possível carcinógeno humano. Com base em estudos toxicológicos em animais, os órgãos mais afetados pelo 3-MCPD são os rins, causando nefropatia, hiperplasia tubular e adenomas. Além disso, foi observado que o 3-MCPD tem a capacidade de afetar a fertilidade e pode levar a supressão da função imunológica (IARC, 2012).

Em 2016, o Instituto Nacional de Saúde Pública da Holanda realizou uma avaliação preliminar da exposição alimentar ao 3-MCPD no país, através da ingestão diária tolerável (TDI) para este contaminante estabelecida pela EFSA. A TDI é uma estimativa da quantidade de uma substância que pode ser ingerida diariamente durante toda a vida sem riscos à saúde. Os grupos de alimentos como bolos e biscoitos, margarina, óleos e gorduras foram identificados como os que mais contribuem para a exposição a esse contaminante. O Instituto avaliou também os grupos etários mais baixos, mostrando que na faixa etária entre dois e seis anos, cerca de 18% das crianças apresentaram um valor de ingestão que excedia a TDI para o 3-MCPD de 0,8 mg/kg de peso corpóreo/dia. As crianças de sete anos foram as que apresentaram o maior nível de exposição, estando 35% delas acima da TDI (Becking *et al.*, 2007; Boon & te Biesebeek, 2016).

Quanto ao 2-MCPD, há indícios de que ele não é genotóxico, tendo sido observado que seu efeito colateral é diferente dos apresentados pelo 3-MCPD (Schilter, 2011). Em um estudo em ratos conduzido durante 28 dias, foi observado que o 2-MCPD produziu efeitos tóxicos qualitativa e quantitativamente diferentes dos produzidos pelo 3-MCPD. Os órgãos mais afetados foram os músculos do coração e o músculo estriado, também sendo observado o efeito tóxico nos rins e fígado. O nível sem efeitos adversos (NOAEL) é a dose determinada experimentalmente do maior nível que não provoca alteração detectável de morfologia, crescimento, desenvolvimento ou vida média. O NOAEL observado para o 2-MCPD foi de 2 mg/kg peso corpóreo/dia, entretanto ainda não foram estabelecidos parâmetros de ingestão segura devido à insuficiência de dados decorrente do número limitado de estudos com o 2-MCPD (Gaylor, 1992; Larsen, 2009; Marchesini apud Schilter *et al.*, 2011).

O glicidol na sua forma livre apresenta propriedades carcinogênicas e genotóxicas, tendo sido classificado pela IARC (2000) na categoria 2A como um "provável carcinógeno para seres humanos". Em estudos realizados em várias espécies de animais, foram observados efeitos tóxicos do glicidol em diversos órgãos como o cérebro, testículos, rins, pulmão, fígado, glândulas mamárias, pele e no sistema imunológico (Irwin *et al.*, 1996; National Toxicology Program apud Schilter *et al.*, 2011).

Nenhuma TDI pode ser estabelecida para os ésteres de glicidol. Para a avaliação de risco destes ésteres, a EFSA utilizou a Margem de Exposição (MOE).

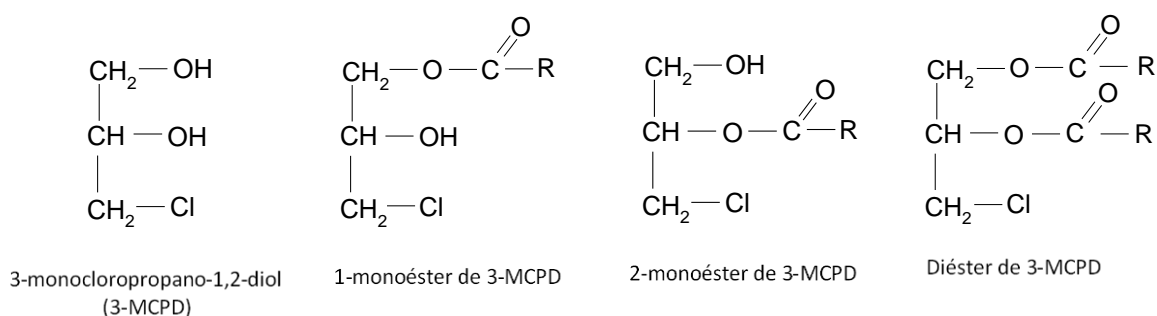


Essa abordagem determina o nível de preocupação e compara a margem entre os níveis dos ésteres de glicidol que causam câncer em animais e os níveis de exposição humana estimados. A EFSA concluiu que a exposição a esse contaminante aumenta a preocupação com a saúde de bebês e crianças, principalmente de bebês que possuem uma dieta apenas de fórmulas infantis. Existe também uma preocupação com os grupos de adolescentes, adultos e idosos que possuem altos níveis de exposição através da dieta (EFSA, 2012, 2016).

Foi relatado recentemente que os cloropropanóis, em especial os cloropropanodióis (MCPD), estão presentes em alguns produtos alimentícios não apenas em sua forma livre, mas também na forma esterificada. Estudos envolvendo a forma esterificada de MCPD e glicidol têm sido realizados nos últimos anos devido a sua ampla ocorrência em produtos alimentícios, sendo uma preocupação em relação à segurança de alimentos, principalmente em relação à sua presença em óleos e gorduras comestíveis (Stadler, 2015).

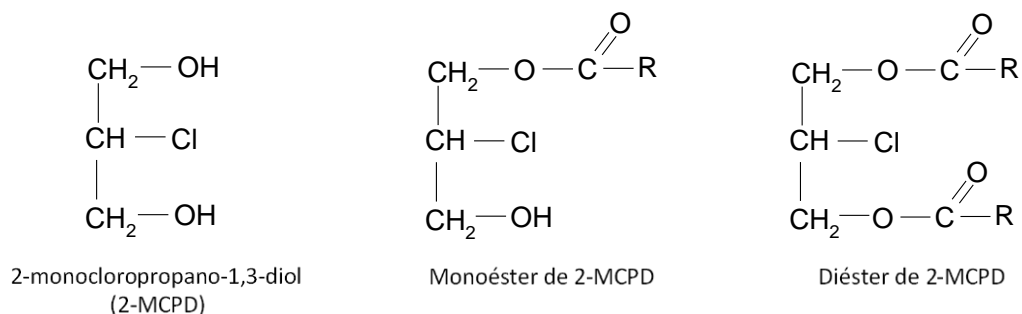
### Ésteres de 3-MCPD e 2-MCPD

O 3-MCPD (Figura 1) não está presente nos alimentos apenas em sua forma livre, mas também na forma de monoésteres e diésteres em concentrações muito mais elevadas (Zelinková *et al.*, 2006). Os monoésteres ainda podem ser divididos em 1- e 2-monoésteres de 3-MCPD, de acordo com a posição da cadeia de ácido graxo (Seefelder *et al.*, 2011).



**Figura 1.** Estruturas químicas da forma livre do 3-MCPD e de seus ésteres (R = grupo alquila)

Os ésteres de 2-MCPD (Figura 2) podem ser categorizados em mono e diésteres de acordo com os grupos hidroxilas da molécula estarem parcialmente ou totalmente esterificados com os ácidos graxos (Seefelder *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Estruturas químicas da forma livre do 2-MCPD e de seus ésteres (R = grupo alquila)

A European Food Safety Authority (EFSA) avaliou os MCPDs e seus ésteres em 2013 e 2016 e reportou que os estudos até então realizados indicam que os efeitos tóxicos apresentados pelos ésteres de 3-MCPD são os mesmos da sua forma livre (EFSA, 2013; 2016). A TDI para o 3-MCPD e seus ésteres foi alterado de 0,8 µg/kg pc/dia para 2,0 µg/kg pc/dia pelo painel sobre contaminantes da EFSA em 2017. E o Comitê Conjunto FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares (JECFA) estabeleceu uma TDI de 4,0 µg/kg pc/dia (EFSA, 2016, 2017; JECFA, 2016).

Ensaio *in vitro* mostraram que os ésteres de 3-MCPD e 2-MCPD são hidrolisados através de um modelo de suco entérico contendo lipase pancreática. E de acordo com estes ensaios, os ésteres de 2-MCPD foram clivados mais eficientemente do que os ésteres de 3-MCPD (Schilter *et al.*, 2011). Seefelder e colaboradores (2008) realizaram um estudo demonstrando que *in vitro* a lipase pancreática utiliza os ésteres de 3-MCPD como substratos e logo em seguida ocorre a hidrólise dos ésteres. Em estudos com células Caco-2 como modelo *in vitro* celular do intestino humano, os ésteres de 3-MCPD e 2-MCPD, foram hidrolisados eficientemente pelas células Caco-2 em algumas horas, apesar desse ensaio não conter lipase pancreática (Buhrke *et al.*, 2015).

Os efeitos toxicológicos dos ésteres de 2-MCPD, por sua vez, ainda não estão bem definidos devido à quantidade limitada de dados disponíveis sobre esse contaminante (Ermacora & Hrnčířík, 2014b; Seefelder *et al.*, 2011).

Os precursores e condições para a formação dos ésteres de 3-MCPD e 2-MCPD são cloro, glicerol, acilgliceróis, temperatura e tempo. Segundo Rahn e Yaylayan (2011), a formação dos ésteres de 3-MCPD pode ocorrer através de quatro mecanismos diferentes. Dois dos mecanismos envolvem um ataque nucleofílico direto pelo íon cloreto no átomo de carbono da molécula de glicerol, carregando um grupo éster ou um grupo hidroxila protonado. Nos outros dois mecanismos ocorre a formação de compostos reativos intermediários, tais como um íon aciloxônio ou um anel epóxido formando glicidol antes do ataque nucleofílico pelo íon cloreto.

Estudos observaram que pode acontecer um processo de transformação bidirecional entre o 2-MCPD e o 3-MCPD, não só em suas formas livres, mas também na forma esterificada, através do glicidol como intermediário e na presença de íons cloreto (Ermacora & Hrnčirik, 2014c; Rahn & Yaylayan, 2011; Weißhaar & Perz, 2010).

A presença de ésteres de 3-MCPD em alimentos processados foi relatada primeiramente em 2004, quando 20 amostras de diversos tipos de alimentos comercializados em Praga foram analisadas (Svejkovská *et al.*, 2004). Estudos realizados desde então indicam que os ésteres de 3-MCPD estão presentes em grandes concentrações principalmente em óleos, gorduras e alimentos contendo elevada quantidade de frações lipídicas (Ermacora & Hrnčirik, 2014a; Jędrkiewicz *et al.*, 2016; Zelinková *et al.*, 2006).

Estudos mostram que a formação de ésteres de 3-MCPD em alimentos processados deve ocorrer assim como ocorre na sua forma livre, através da reação entre lipídeos e cloretos, sendo que essa reação é favorecida em óleos vegetais refinados (Calta *et al.*, 2004; Seefelder *et al.*, 2011). No processo de fabricação da maioria dos óleos e gorduras comestíveis, estes precisam ser submetidos a um processo de refino que tem como objetivo a remoção de pigmentos, ácidos graxos livres, fosfolipídeos e outros compostos que podem afetar a qualidade final do produto. É principalmente nessa etapa que os ésteres de 2-MCPD, 3-MCPD e glicidol são formados, mais especificamente na etapa de desodorização, que consiste na destilação por arraste de vapor das substâncias voláteis utilizando altas temperaturas, uma vez que em temperaturas que excedem 200°C ocorre uma maior

incidência dos níveis dos ésteres de 3-MCPD nesses produtos (Becalski *et al.*, 2015; Hrnčirik & Van Duijn, 2011; Li *et al.*, 2016a).

Na formação dos ésteres de MCPD, os triacilgliceróis são considerados os intermediários predominantes na etapa da desodorização em temperaturas entre 180 e 270°C (Hrnčirik & van Duijn, 2011; Matthäus *et al.*, 2011). Foi observado que a quantidade de ésteres de 3-MCPD aumenta com a elevação da temperatura de 160 a 220°C, sendo que os ésteres de 3-MCPD são formados em maiores quantidades a 220°C. E à medida que a temperatura é elevada de 220 para 250°C, ocorre uma diminuição desses níveis, possivelmente devido à decomposição dos ésteres de 3-MCPD (Li *et al.*, 2016b).

Zelinková e colaboradores (2006) relataram quantidades significativas de ésteres de 3-MCPD variando de 300 até 2462 µg/kg em óleos refinados, inclusive em azeites de oliva refinados, sendo que em óleos virgens foram detectados níveis relativamente baixos desses ésteres.

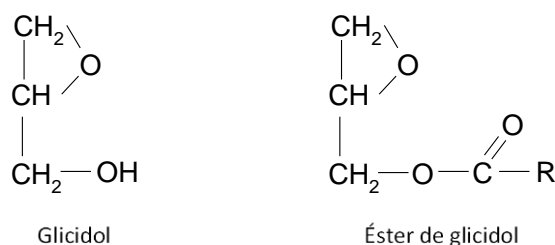
Os ésteres de 2-MCPD têm sido encontrados em diversos produtos alimentícios e representam cerca de um terço do total de ésteres de MCPD presentes (Ermacora & Hrnčirik, 2014b; Seefelder *et al.*, 2011). Em estudo de Seefelder e Schilter (2009) foi analisada uma grande variedade de óleos refinados que apresentaram valores de ésteres de 2-MCPD menores que 150 µg/kg (Seefelder & Schilter apud Larsen, 2009). Jędrkiewicz *et al.* (2016), avaliaram amostras de óleos comestíveis, óleo de peixe e margarina comercializadas na Polônia e verificaram a presença de ésteres de 2-MCPD e 3-MCPD nos produtos que haviam passado por algum processo de refino. Os ésteres não foram detectados em amostras de óleos prensadas à frio e não refinadas.

Óleos provenientes de frutos, como a oliva e a palma, apresentam uma maior tendência à formação desses contaminantes do que os óleos extraídos de sementes. Esse fato pode ser devido à presença de íons cloreto oriundos da polpa desses frutos, o que pode ser tanto proveniente de ocorrência natural quanto devido aos fertilizantes utilizados no campo (Šmidrkal *et al.*, 2016; Stadler, 2015). Além disso, óleos provenientes de polpas têm um alto teor de água e lipases, que produzem por hidrólise, acilgliceróis durante o manuseio e armazenamento dos frutos. Os acilgliceróis podem então tornar-se os precursores dos ésteres de 3-MCPD (Caltá *et al.*, 2004; Zelinková *et al.*, 2006).

## Ésteres de Glicidol

Os ésteres de glicidol passaram a ser detectados em óleos refinados após a investigação de resultados discrepantes de métodos analíticos para a determinação dos ésteres de MCPD. Durante o preparo de amostra em metodologias em que é utilizado o cloreto, quando este é adicionado, os ésteres de 3-MCPD são formados a partir dos ésteres de glicidol através da abertura do anel epóxido e entrada do cloro na estrutura. Dessa forma, os ésteres de glicidol são identificados juntamente com os ésteres de 3-MCPD inicialmente presentes (Larsen, 2009; Rahn & Yaylayan, 2011; Weißhaar & Perz, 2010).

O glicidol (2,3-epóxi-1-propanol) é formado por uma molécula de glicerol contendo os grupos funcionais epóxido e álcool (Figura 3). Como o glicidol tem apenas um grupo hidroxila, este composto forma apenas monoésteres. Os ésteres de glicidol são encontrados em quantidades elevadas em óleos vegetais e gorduras refinados, sendo formados durante a etapa de refino (EFSA, 2016; Larsen, 2009). Em óleos e gorduras refinados, os ésteres de glicidol foram encontrados em níveis semelhantes aos dos ésteres de 3-MCPD (Kuhlmann, 2011).



**Figura 3.** Estruturas químicas da forma livre do glicidol e de seu éster (R = grupo alquila)

As rotas de formação dos ésteres de 3-MCPD e do glicidol são diferentes, sendo que para os ésteres de glicidol, as condições durante a etapa de desodorização e os níveis de diacilgliceróis influenciam de maneira significativa. Os ésteres de glicidol podem ser formados a partir de diacilgliceróis a altas temperaturas através do rearranjo intramolecular, seguido pela consequente eliminação de ácidos graxos livres. Os ésteres de glicidol também podem ser formados durante a hidrólise de monoacilgliceróis, porém estes últimos são removidos durante a desodorização do óleo tornando sua contribuição para a

formação desses contaminantes praticamente desprezível. Além disso, estudos sugerem que a formação de ésteres de glicidol é acelerada quando os níveis de diacilgliceróis em óleos refinados excedem 3-4 % do total de lipídeos (Destailats *et al.*, 2012; Craft *et al.*, 2012a).

A temperatura e o tempo de exposição influenciam a formação dos ésteres de glicidol. Em estudo realizado por Hrnčirik e Duijn (2011), foi reportado um aumento dos níveis de ésteres de glicidol, ao aumentar a temperatura de 180 a 230°C durante a etapa de desodorização. Em outro estudo realizado por Craft e colaboradores (2012b), foi visto que em temperaturas abaixo de 180°C não ocorre a formação dos ésteres de glicidol e em temperaturas acima de 230-240°C a formação dos ésteres é extensa.

Ainda não há muitos dados quanto aos efeitos tóxicos dos ésteres de glicidol. De acordo com dados disponíveis, os ésteres de glicidol apresentam uma menor genotoxicidade quando comparado à sua forma livre (FSCJ, 2015). Porém, no sistema digestivo humano o glicidol pode ser liberado quase que completamente de seus ésteres. Em um estudo com ratos, a neurotoxicidade do glicidol foi observada após 28 dias de tratamento com uma ingestão de 200 mg/kg pc/dia (EFSA, 2016).

Em estudo realizado na Holanda em 2013, Ermacora e Hrnčičík reportaram uma média de 1,13 mg/kg de ésteres de glicidol em amostras de azeites de oliva. Becalski e colaboradores (2015) encontraram uma média de 0,52 mg/kg desses ésteres em amostras de azeite de oliva do Canadá, porém estes não foram detectados em nenhuma das 6 diferentes marcas de azeite de oliva extra virgem analisadas.

### **Azeite de oliva**

O azeite de oliva consiste no óleo obtido exclusivamente do fruto da oliveira *Olea europaea* L. É um produto muito consumido no mundo inteiro devido às suas propriedades organolépticas características, seu alto teor de ácidos graxos monoinsaturados e suas propriedades antioxidantes (Van Durme & Vandamme, 2016).

O azeite de oliva virgem é formado por uma fração saponificável e outra insaponificável. A fração saponificável é composta majoritariamente de triacilgliceróis

~98%), seguida pelos ácidos graxos livres, monoacilgliceróis e diacilgliceróis. O ácido graxo presente em maior abundância no azeite é o ácido oleico (C18:1) que representa aproximadamente 70% do total de ácidos graxos, seguido pelo palmítico (C16:0), linoleico (C18:2), esteárico (C18:0), palmitoleico (C16:1), e outros em quantidades menores como o linolênico (C18:3) por exemplo. A alta quantidade de ácido oleico é importante uma vez que esse ácido graxo é menos susceptível à oxidação quando comparado aos ácidos graxos poli-insaturados que predominam nos outros óleos, favorecendo dessa forma a estabilidade do azeite. A composição de ácidos graxos nos azeites pode variar dependendo da zona de produção, do clima, da variedade da oliva e do estágio de maturação do fruto (Boskou *et al.*, 2006; Owen *et al.*, 2000). Os diacilgliceróis presentes no azeite de oliva, por sua vez, representam de 1 a 2,8% do total de ácidos graxos, e os monoacilgliceróis representam menos de 0,25% (Boskou *et al.*, 2006).

A fração insaponificável é rica em hidrocarbonetos, carotenoides e clorofila (ambos conferindo tonalidades esverdeadas e amareladas ao azeite), fosfatídeos, esteróis, tocoferóis, polifenóis (responsáveis pelo sabor amargo, adstringente e picante), vitaminas, compostos voláteis e aromáticos. Os compostos antioxidantes estão associados aos efeitos benéficos à saúde, como a redução da incidência de câncer e doença de Alzheimer (Boskou *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2008; Peñalvo *et al.*, 2016).

O consumo de azeite registrado entre 2016 e 2017 no Brasil foi de 59,5 mil toneladas, sendo que os países que mais consomem o produto são a Itália (514,0 mil toneladas), Espanha (457,2 mil toneladas) e Estados Unidos (315,0 mil toneladas) (COI – International Olive Council, 2017b).

O Brasil não possui produção expressiva de azeite de oliva, portanto, importa praticamente todo o produto que consome. Atualmente o país é o terceiro maior importador de azeite de oliva do mundo, sendo que nos últimos 5 anos houve um aumento de 60% nas importações do produto (COI, 2011). As importações brasileiras de azeite de oliva e óleo de bagaço de oliva têm aumentado 19% ano-a-ano. No que diz respeito às importações que o país realiza, 84% provêm de países europeus, sendo 57% de Portugal, 20% da Espanha, 6% da Itália e 1% da Grécia. Os 16% restantes provêm da Argentina (9%), Chile (6%) e outros países (1%). Atualmente, 87% do azeite de oliva importado é da categoria de azeite virgem ou

extra virgem, 12% de azeite de oliva e apenas 1% de óleo de bagaço (COI – International Olive Council, 2017a).

No Brasil existem algumas regiões de cultivo nacional de oliveiras e produção de azeite de oliva, que possuem microclimas favoráveis à cultura, dentre elas estão a Serra da Mantiqueira nos estados de Minas Gerais e São Paulo e também no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, e Paraná (Workshop de Azeite de Oliva, 2017).

Para a produção de azeite de oliva, é recomendada que a colheita das azeitonas seja realizada quando estas estiverem com a máxima maturação, já que nessas condições produzem o azeite de melhor qualidade e o percentual de óleo no fruto é maior. As azeitonas colhidas das árvores e as recolhidas do solo devem ser separadas e o transporte, extração e armazenamento devem ser realizados separadamente pois os produtos finais terão qualidades distintas. Os azeites produzidos a partir dos frutos colhidos das árvores apresentam índice de acidez e peróxidos baixos e maior qualidade sensorial quando comparados aos azeites produzidos a partir das azeitonas recolhidas do solo (Ojeda, 2006).

As etapas de elaboração do azeite de oliva, segundo Ojeda (2006), incluem o preparo da pasta através da moagem e batimento; prensagem e centrifugação para a separação das fases sólida e líquidas (matéria seca, azeite e água); separação de fases líquidas através da decantação natural e centrifugação; armazenamento e maturação do azeite.

A Resolução RDC nº270 da ANVISA (Brasil, 2005) e a Instrução Normativa nº1, de 30 de janeiro de 2012 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) definem os tipos de azeite de oliva e óleo de bagaço como:

- Azeite de oliva é o produto obtido exclusivamente dos frutos da oliveira (*Olea europaea* L.), excluindo os óleos obtidos através de solventes, reesterificação e/ou qualquer mistura com outros tipos de óleos.
- Azeite de oliva virgem é definido como o produto obtido do fruto da oliveira somente através de processos mecânicos ou outros meios físicos, em condições térmicas que não levam a alteração do azeite, e que não tenha sido submetido a outros tratamentos além da lavagem, decantação, centrifugação e filtração.
- Óleo de bagaço de oliva refinado é definido como o produto obtido através do tratamento do bagaço de frutos da oliveira (*Olea europaea* L.), com solventes



ou outros tipos de tratamentos físicos, excluídos os óleos obtidos por reesterificação ou qualquer mistura de outros tipos de óleos. Este produto deve obrigatoriamente ser refinado e não deve ser designado como "azeite de oliva".

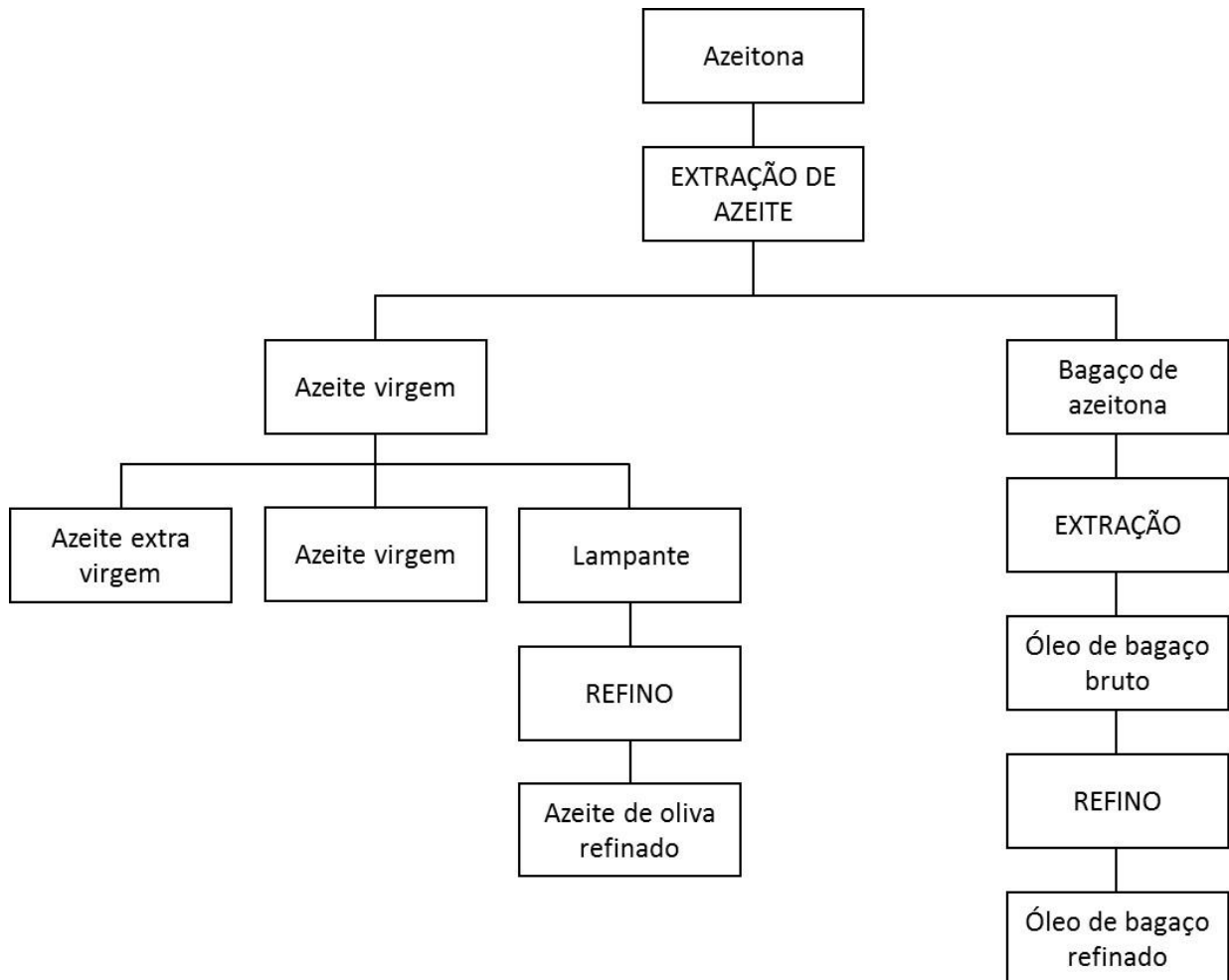
- Óleos compostos ou mistos: é o produto obtido a partir da mistura de dois óleos vegetais ou mais.

A Instrução Normativa nº1, de 30 de janeiro de 2012 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem como objetivo classificar e fiscalizar o azeite de oliva importado e/ou produzido no Brasil. De acordo com essa Instrução Normativa, o produto vendido como azeite de oliva pode ser constituído pela mistura de azeite de oliva refinado com azeite de oliva virgem ou extra virgem. E o azeite de oliva refinado é o produto obtido do azeite de oliva virgem que passa pela etapa de refino e que não provoca alteração na estrutura glicéridica inicial (Brasil, 2012). Quanto à acidez, o azeite de oliva virgem ainda pode ser classificado como azeite de oliva virgem e extra virgem. Os limites máximos de acidez estabelecidos pela legislação brasileira para o azeite de oliva extra virgem é de 0,8%, para o azeite de oliva virgem de 2,0%, para o azeite de oliva de 1,0% e para azeites refinados de 0,3% (Brasil, 2005; 2012).

O azeite de oliva extra virgem e virgem são considerados óleos de qualidade mais elevada já que é obtido da azeitona exclusivamente por processo mecânico que não provoca alterações do produto e não passa pela etapa de refino. A pureza do azeite é de grande importância no aspecto da qualidade devido às suas propriedades sensoriais e os seus benefícios à saúde (Apetrei, 2014; Garcia *et al.*, 2013).

O azeite de oliva pode ser classificado ainda como lampante quando está impróprio para o consumo, podendo ser destinado ao processo de refino para se enquadrar no grupo de azeite de oliva ou azeite de oliva refinado. E o bagaço de oliva gerado na produção pode ser aquecido para a recuperação do óleo residual ou pode ser realizada uma extração por solvente, obtendo dessa forma o óleo de bagaço bruto que deve passar pelo processo de refino para ser destinado ao consumo humano. Para a comercialização do óleo de bagaço refinado, não é

permitido o uso da palavra "azeite" para a sua designação (Brasil, 2012; Ojeda, 2006) (Figura 4).



**Figura 4.** Tipos de azeite de oliva de acordo com a IN 1/2012 do MAPA

Fonte: BRASIL, 2012.

A Resolução RDC nº270 da ANVISA (BRASIL, 2005) e IN 1/2012 do MAPA (BRASIL, 2012) estabelecem os parâmetros de identidade e qualidade do azeite de oliva baseadas nas definições como a do CODEX STAN 33 (CODEX, 1981) e do *International Olive Council* (COI, 2015).

#### *Teor de Ácidos Graxos Livres (acidez livre)*

Esse parâmetro de qualidade do azeite de oliva está diretamente relacionado à qualidade do azeite e à sua degradação hidrolítica, que é geralmente

causada pelo uso de matéria-prima de baixa qualidade, etapas durante o processamento e condições inadequadas no armazenamento. Além disso, esse parâmetro é utilizado para detectar adulterações em azeites de oliva de alta qualidade quando há adição de óleos de qualidade inferior (Firestone, 2014b; Wabaidur, 2016).

A determinação do teor de ácidos graxos livres baseia-se na dissolução à quente do azeite em álcool etílico neutralizado, seguido de titulação com uma solução padrão de hidróxido de sódio, na presença de fenolftaleína como indicador. O teor de ácidos graxos livres é expresso em porcentagem de ácido oleico, já que este é o ácido graxo predominante em azeites de oliva.

### *Índice de Peróxidos*

A reação de oxidação é a mais frequente e a mais importante reação de degradação que ocorre em óleos e gorduras, pois provoca alterações indesejáveis e irreversíveis nas suas características organolépticas e na sua composição nutricional. O índice de peróxidos é considerado um parâmetro de qualidade para óleos e gorduras, uma vez que permite a quantificação dos compostos primários de reação e é capaz de mensurar a rancidez oxidativa. O método determina todas as substâncias presentes na amostra que oxidam iodeto de potássio, nas condições do teste. Essas substâncias são geralmente consideradas como peróxidos ou outros produtos similares resultantes da oxidação lipídica. O resultado é expresso em miliequivalentes de peróxidos por quilograma de amostra. A variação do índice de peróxido em função do tempo ocorre de forma gaussiana e um baixo valor não demonstra necessariamente uma boa estabilidade oxidativa, podendo indicar uma alteração pronunciada (Firestone, 2014c; Silva *et al.*, 1999).

### *Extinção específica a 232 e 270 nm*

Esse parâmetro fornece informações sobre a qualidade de um óleo, seu estado de conservação, alterações causadas pela aplicação de processamento e também pode auxiliar na detecção de fraudes. Esse método consiste na análise

espectrofotométrica na região do ultravioleta nos comprimentos de onda de 232 e 270 nm. A absorção nos comprimentos de onda especificados é devida à presença de dienos e trienos conjugados (produtos secundários formados durante as etapas de refino e branqueamento). Azeite de oliva virgem de boa qualidade e estocado de forma adequada contém poucos produtos de oxidação que absorvem no comprimento de onda 232 nm. Azeites que possuem a presença de substâncias formadas a partir da oxidação ou do refino de óleo apresentam valores altos de extinção específica a 270 nm (Firestone, 2014d; Aued-Pimentel *et al.*, 2008).

A análise consiste na dissolução do azeite de oliva em isooctano ou ciclohexano e a determinação da extinção específica da solução é medida em espectrofotômetro na região do ultravioleta, com comprimento de onda específico em relação ao solvente puro (Firestone, 2014d).

### *Estigmastadienos*

Os estigmastadienos são hidrocarbonetos com estrutura esteroideal que não estão naturalmente presentes no azeite de oliva extra virgem. Eles são formados no processo de refino por meio da desidratação do beta sitosterol, devido à utilização de altas temperaturas. Sendo assim, a sua presença é um importante indicativo da presença de azeites ou outros óleos vegetais refinados (Garcia-González *et al.*, 2008). O limite de tolerância de estigmastadienos em azeite de oliva virgem é de até 0,15 mg/kg (Brasil, 2012).

A determinação dos estigmastadienos é mais sensível e confiável para o controle de azeites do que a extinção específica a 232 e 270 nm, já que os dienos e trienos conjugados podem ser formados durante o armazenamento, o que não ocorre com a desidratação dos esteróis (Bonvehí *et al.*, 2001).

### *Composição em ácidos graxos*

A composição em ácidos graxos representa a impressão digital dos óleos e azeites, determinando a quantidade de cada ácido graxo específico presente, inclusive os ácidos graxos *trans*. Cada óleo possui composição em ácidos graxos

bem característica e já bastante conhecida, no caso a composição no azeite de oliva é majoritariamente de ácido oleico. Assim, a composição em ácidos graxos pode ser utilizada para avaliar a autenticidade do óleo, sendo utilizada para a detecção de adulterações de azeite de oliva de alta qualidade com óleos de qualidades inferiores. A presença de ácidos graxos *trans*, por sua vez, indica a presença de óleo que passou por processo de refino (Firestone, 2014f; Horwitz, 2010; O'Brien, 2009).

### **Adulteração de azeite de oliva**

O azeite de oliva extra virgem é um produto de alto valor agregado e que apresenta alto valor nutricional e benefícios significativos em termos de saúde. Para ampliar ganhos econômicos, os azeites de oliva extra virgem sofrem vários tipos de adulterações. As mais comuns são as misturas do azeite de oliva extra virgem com azeite de oliva de qualidades distintas, como o azeite de oliva virgem, lampante, refinado e o óleo de bagaço de oliva. E ainda, outra adulteração comum é a adição de outros óleos vegetais de valor comercial inferior como o óleo de soja, milho, canola, algodão, girassol, abacate, amendoim e amêndoa (Aued-Pimentel *et al.*, 2008; Meira *et al.*, 2014).

No Brasil, o principal tipo de adulteração em azeite de oliva é a adição de outros óleos vegetais refinados de menor valor comercial, tendo destaque o óleo de soja. Esse tipo de fraude é muito comum em azeites importados e que não são envasados em seu país de origem (Aued-Pimentel *et al.*, 2008; Fasciotti & Pereira Neto, 2010; Peixoto *et al.*, 1998; Tfouni *et al.*, 2017).

Outro grande problema das fraudes em azeite de oliva são os "alérgenos ocultos", como por exemplo a adição de óleo de avelã, amêndoa ou nozes. Esses ingredientes quando não declarados são um risco grave para a saúde de consumidores que possuem alergia a esses ingredientes, podendo causar um choque anafilático (Arlorio *et al.*, 2010).

O azeite de oliva lampante possui baixíssima qualidade, alta acidez e diversos defeitos organolépticos, devendo ser obrigatoriamente refinado para poder ser utilizado como um ingrediente de gênero alimentício. Assim, um tipo de adulteração que pode ocorrer em azeite de oliva é a adição de um azeite de oliva lampante. Esses azeites podem ser submetidos a uma desodorização em condições leves de

processamento, a baixas temperaturas (80 a 120°C) e a vácuo, removendo dessa forma os compostos voláteis que causam os defeitos organolépticos desse azeite (Brasil, 2012; Saba *et al.*, 2005).

Os escândalos relacionados a fraudes em azeite de oliva estão cada vez mais frequentes. Em 2017, foi divulgada a operação ISIS de abrangência nacional do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) implantada para a fiscalização e regulação de azeite de oliva. Nessa operação foram inspecionadas empresas envasadoras, importadoras e distribuidoras de azeite. O MAPA encontrou irregularidades em 45 marcas de azeite de oliva dentre as 140 coletadas nos 2 anos anteriores à divulgação dos resultados. As empresas envasadoras que importam à granel foram as que apresentaram maiores irregularidades. Foram encontrados produtos com denominações de venda que destacavam azeite de oliva no rótulo levando o consumidor a pensar que estava adquirindo um azeite de oliva do tipo extra virgem quando na realidade se tratava de um óleo composto. Nessa operação, as amostras que apresentaram irregularidades foram apreendidas e utilizou-se de medidas cautelares através da suspensão da comercialização desses produtos, além de intimação para a adequação do rótulo (MAPA, 2017; Workshop de Óleos Vegetais, 2017).

### ***Formação e ocorrência de ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol em azeites refinados e óleo de bagaço de oliva***

Uma vez que o processamento de azeite extra virgem não requer o uso de altas temperaturas, não são esperados níveis consideráveis de ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol nesse produto a menos que ele tenha sido adulterado com a adição de um óleo vegetal refinado. No processo de refino, devido às altas temperaturas empregadas durante a etapa de desodorização, ocorre a formação desses compostos, portanto não é esperada a sua presença no azeite de oliva extra virgem, pois o mesmo é obtido através de prensagem a frio.

Em 2014, Ariseto e colaboradores encontraram concentrações de até 1,29 mg/kg de ésteres de 3-MCPD em amostras comercializadas no Brasil como azeite de oliva extra virgem. Os autores consideraram esse fato um indicativo de que essas amostras estavam adulteradas (Ariseto *et al.*, 2014). A adulteração de azeite de

oliva além de ser uma fraude econômica, pode contribuir como uma fonte de risco a mais à saúde dos consumidores já que há a possibilidade de formação dos ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol durante a produção de azeites e óleos de bagaço de oliva refinados.

Em estudos em que foram analisadas amostras de azeites de oliva virgens/não refinados não foram encontrados níveis detectáveis de ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol. Becalski e colaboradores (2015) analisaram óleos e azeites de oliva rotulados como virgem, não processados e não refinados, no qual não encontraram níveis detectáveis desses ésteres. Com exceção às amostras analisadas de óleo de palma que continha de 0,10 a 0,56 mg/kg de ésteres de MCPD e também o óleo de gergelim em que foram encontrados de 0,60 a 1,29 mg/kg, sendo que não foram detectados os ésteres de glicidol. Em estudo conduzido por Kuhlmann (2011), foram analisados azeites de oliva, óleos e gorduras não refinados como o de abacate, girassol, cacau, gergelim, mamona, cominho, palma, páprica, semente de abóbora e nozes, em que não foram encontradas quantidades significativas (< LOD) de ésteres de 3-MCPD e glicidol. Özdikicierler *et al.* (2015) avaliaram amostras de azeite de oliva que não passaram por processos térmicos e os ésteres de 3-MCPD e glicidol também não foram detectados. Em outros estudos foram encontradas concentrações de ésteres de 3-MCPD abaixo de 0,3 mg/kg em amostras de azeite extra virgem (Hung *et al.*, 2017; Zelinková *et al.*, 2006).

Em um estudo de processamento do azeite de oliva realizado em 2015, amostras de bagaço de oliva antes de passarem pela etapa de refino apresentaram níveis de ésteres de 3-MCPD de 4,1 mg/kg, indicando que os contaminantes foram formados durante a secagem do bagaço da azeitona que antecede a extração do óleo (Özdikicierler *et al.*, 2015). Segundo Hung e colaboradores (2017), o óleo de bagaço de oliva apresenta ésteres de 3-MCPD em níveis entre os de amostras de azeite de oliva extra virgem e óleo de bagaço refinado, dessa forma sendo possível a utilização dos ésteres de 3-MCPD como composto alvo para diferenciar azeite de oliva extra virgem, do refinado e do óleo de bagaço.

O refino de azeites do tipo lampante e a produção de óleo de bagaço refinado são formas de aproveitamento da matéria-prima que, em virtude da elevada acidez, não podem ser destinados ao consumo humano sem processamento prévio.

Estes produtos são usualmente misturados com azeite de oliva extra virgem para melhorar as suas características sensoriais, já que são produtos de baixa qualidade.

No Brasil, misturas de azeite de oliva virgem com azeite de oliva refinado, óleo de bagaço de oliva refinado ou óleo de outras fontes vegetais podem ser comercializadas desde que atendam aos critérios de identidade e qualidade do grupo e/ou tipo. Essas misturas são classificadas como óleo composto e proporcionam a comercialização de um produto de menor custo acessível à uma parcela significativa da população. Nesse caso a designação do produto deve estar claramente apresentada no rótulo sem induzir o consumidor ao engano (Brasil, 2005).

### **Métodos Analíticos**

#### *Metodologias para análise de ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol*

Os ésteres de 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol podem ser analisados tanto por métodos analíticos diretos quanto por métodos indiretos. Os métodos mais comuns descritos para as análises desses ésteres são os métodos indiretos, que quantificam os contaminantes nas suas formas livres, liberados de seus ésteres, utilizando determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e são mais adequados às análises de rotina. Esses métodos, porém utilizam condições de hidrólise ácida ou básica relativamente severas, o que pode levar à formação ou destruição do 3-MCPD e do glicidol.

Os métodos diretos, que quantificam os ésteres diretamente, possuem a vantagem de fornecer a composição dos ésteres, mas a sua desvantagem está associada à quantificação quando há um grande número de espécies a serem determinadas devido ao amplo número de padrões analíticos requeridos para a análise. Como o método direto não requer hidrólise dos ésteres, não há a possibilidade de formação ou destruição de 3-MCPD ou glicidol durante a hidrólise (Ermacora & Hrnčířík, 2013; MacMahon *et al.*, 2013a). Nos métodos diretos descritos até então, os ésteres são detectados através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) empregando analisadores de



massas do tipo triplo quadrupolo (MS/MS) e *time of flight* (ToF) (Haines *et al.*, 2011; Hori *et al.*, 2012; Macmahon *et al.*, 2013b).

O princípio dos métodos indiretos é a hidrólise para a liberação do 3-MCPD, 2-MCPD e glicidol de seus ésteres, que são então analisados em suas formas livres. Os principais métodos empregam a transesterificação enzimática, alcalina ou ácida (Koyama *et al.*, 2016; Kuhlmann, 2011). A AOCS (American Oil Chemists' Society) validou 3 métodos indiretos para a determinação desses ésteres em óleos e gorduras vegetais utilizando GC/MS. O método Cd 29a-13 baseia-se na conversão do glicidol em 3-MBPD e em uma transesterificação ácida de 16 horas, o Cd 29b-13 requer o mesmo tempo de transesterificação, porém esta ocorre em meio alcalino, com posterior conversão do glicidol em 3-MBPD. Já o Cd 29c-13 é um método diferencial que emprega a transesterificação alcalina com tempo de reação menor (3,5 a 5,5 min), onde a determinação do glicidol é feita de forma indireta. Neste método a conversão de glicidol em 3-MCPD é o fator crítico da análise.

O método utilizado para o desenvolvimento do presente projeto foi o Cd 29a-13. O método se baseia na conversão dos ésteres de glicidol em derivados halogenados, os ésteres de 3-monobromo-propano-1,2-diol (3-MBPD), que possuem estrutura similar aos ésteres de MCPD. Os ésteres de 3-MBPD, juntamente com os ésteres de 2-MCPD e 3-MCPD, são, em seguida, convertidos nas formas livres (não-esterificadas) em solução metanólica de ácido sulfúrico. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos produzidos durante a reação são extraídos e separados da amostra. O 2-MCPD, 3-MCPD e 3-MBPD são derivatizados com ácido fenilborônico (PBA) para a formação de derivados voláteis estáveis e analisados por (GC-MS). Para a quantificação são adicionados padrões internos deuterados às amostras de óleo (Firestone, 2014a).

Em 2015, o EC Joint Research Centre (JRC) publicou um método validado para determinar os ésteres de MCPD e glicidol utilizando GC-MS, com uma abordagem semelhante ao da AOCS Cd 29a-13, que pode ser aplicado para a maioria das matrizes de alimentos. Esse método pode ser aplicado para a análise de vários produtos, como pão, produtos de padaria, produtos de peixe, carne, alimentos à base de cereais e margarina. Os pontos críticos no método analítico são a etapa preliminar de extração da gordura, bem como as potenciais interferências cromatográficas devido às matrizes complexas (Wenzl *et al.*, 2015).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Apetrei, I. M., & Apetrei, C. (2014). Detection of virgin olive oil adulteration using a voltammetric e-tongue. *Computers and Electronics in Agriculture*, 108, 148–154.

Arisseto, A. P., Marcolino, P. F. C., & Vicente, E. (2014). Determination of 3-monochloropropane-1,2-diol fatty acid esters in Brazilian vegetable oils and fats by an in-house validated method. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(8), 1385–1392.

Arlorio, M., Coisson, J. D., Bordiga, M., Travaglia, F., Garino, C., Zuidmeer, L., Van Ree, V., Giuffrida, M. G., Conti, A., & Martelli, A. (2010). Olive oil adulterated with hazelnut oils: simulation to identify possible risks to allergic consumers. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 27(1), 11-18.

Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th Ed. 2005. Current Through Revision 3, 2010 Gaithersburg, Maryland, 2010. Chapter 41 Met. 996.06, p. 20.

Aued-Pimentel, S.; Takemoto, E.; Kumagai e. E.; Cano C. B. (2008). Determinação da diferença entre o valor real e o teórico do triglicerídeo ECN 42 para a detecção de adulteração em azeites de oliva comercializados no Brasil. *Química Nova*, 31(1).

Becalski, A., Feng, S., Lau, B. P-Y., & Zhao, T. (2015). A pilot survey of 2- and 3-monochloropropanediol and glycidol fatty acid esters in foods on the Canadian market 2011-2013. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, 58–66.

Becking GC, Nordberg M, Nordberg GF. (2007). Essential Metals: Assessing Risks from Deficiency and Toxicity. *Handbook on the Toxicology of Metals 3E*, Cap 9.

Bonvehi, J. S., Torrento, M. S., & Coll, F. V. (2001). A laboratory study of the bleaching process in stigmasta-3,5-diene concentration in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 78(3), 305–310.

Boon, P.E., te Biesebeek, J.D. (2016). Preliminary Assessment of Dietary Exposure to 3-MCPD in the Netherlands. RIVM (Netherlands National Institute for Public Health and the Environment), Letter Report 2015-0199.

Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). Olive oil composition. In: Boskou, D. Olive oil: Chemistry and Technology. 2nd Edition, Thessaloniki: American Oil Chemists' Society, 4, 41-72.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. Diário Oficial da União, Brasília, 2005.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº1, de 30 de janeiro de 2012. Regulamento Técnico do Azeite de Oliva e do Óleo de Bagaço de Oliva. Diário Oficial da União, Brasília, 2012.

Buhrke, T., Frenzel, F., Kuhlmann, J., Lampen, A. (2015). 2-Chloro-1,3-propanediol (2-MCPD) and its fatty acid esters: cytotoxicity, metabolism, and transport by human intestinal Caco-2 cells. *Archives Toxicology*, 89(12), 2243–2251.

Calta, P., Velisek, J., Dolezal, M., Hasnip, S., Crews, C., Réblová, Z. (2004). Formation of 3-chloropropane-1,2-diol in systems simulating processed foods. *European Food Research Technology*, 218(6), 501–506.

CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO). (1981). Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils. CODEX STAN 33. Rome, v.5.

COI – INTERNATIONAL OLIVE COUNCIL. (2015). Trade Standard Applying to Olive Oils and Olive-Pomace Oils COI/T.15/NC No 3/Rev. 10, Madrid, November 2015.

COI – International Olive Council. (2017a). Market newsletter – October 2017. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org/news/view/697-year-2017-news/897-market-newsletter-october-2017>>. Acesso em 09 jan. 2018.

COI – International Olive Council. (2017b). World olive oil figures. Disponível em: <<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>>.

Acesso em 26 dez. 2017.

Craft, B. D., Nagy, K., Seefelder, W., Dubois, M., & Destailats, F. (2012a). Glycidyl esters in refined palm (*Elaeis guineensis*) oil and related fractions. Part I: Practical recommendations for effective mitigation. *Food Chemistry*, 132(1), 73–79.

Destailats, F., Craft, B. D., Dubois, M., & Nagy, K. (2012). Glycidyl esters in refined palm (*Elaeis guineensis*) oil and related fractions. Part I: Formation mechanism. *Food Chemistry*, 131(4), 1391-1398.

EFSA. (2012). Statement on the applicability of the Margin of Exposure approach for the safety assessment of impurities which are both genotoxic and carcinogenic in substances added to food/feed. *EFSA Journal*, 10(3).

EFSA. (2013). Analysis of occurrence of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in food in Europe in the years 2009-2011 and preliminary exposure assessment. *EFSA Journal*, 11(9), 1–45.

EFSA. (2016). Risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food. *EFSA Journal*, Volume 14, Issue 5.

Ermacora, A., & Hrnčířík, K. (2013). A novel method for simultaneous monitoring of 2-MCPD, 3-MCPD and glycidyl esters in oils and fats. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(1), 1–8.

Ermacora, A., & Hrnčířík, K. (2014a). Development of an analytical method for the simultaneous analysis of MCPD esters and glycidyl esters in oil-based foodstuffs. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 31(6), 985-994.

Ermacora, A., & Hrnčirik, K. (2014b). Influence of oil composition on the formation of fatty acid esters of 2-chloropropane-1,3-diol (2-MCPD) and 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) under conditions simulating oil refining. *Food Chemistry*, 161, 383–389.

Ermacora, A., & Hrnčirik, K. (2014c). Study on the thermal degradation of 3-MCPD esters in model systems simulating deodorization of vegetable oils. *Food Chemistry*, 150, 158–163.

Fasciotti, M., & Pereira Netto, A. D. (2010). Optimization and application of methods of triacylglycerol evaluation for characterization of olive oil adulteration by soybean oil with HPLC-APCI-MS-MS. *Talanta*, 81(3), 1116–1125.

Firestone, D. (Ed.). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 6<sup>th</sup> ed., 3<sup>rd</sup> printing, Urbana: AOCS, 2014a. Met. Cd 29a-13 “2- and 3-MCPD Fatty Acid Esters and Glycidyl Fatty Acid Esters in Edible Oils and Fats Based on Acid Transesterification”.

Firestone, D. (Ed.). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 6<sup>th</sup> ed., 3<sup>rd</sup> printing, Urbana: AOCS, 2014b. Met. Ca 5a-40 “Free Fatty Acids”.

Firestone, D. (Ed.). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 6<sup>th</sup> ed., 3<sup>rd</sup> printing, Urbana: AOCS, 2014c. Met. Cd 8b-90 “Peroxide Value Acetic Acid-Isooctane Method”.

Firestone, D. (Ed.). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 6<sup>th</sup> ed., 3<sup>rd</sup> printing, Urbana: AOCS, 2014d. Met. Ch 5-91 “Determination of Specific Extinction of Oils and Fats, Ultraviolet Absorption”.

Firestone, D. (Ed.). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. 6<sup>th</sup> ed., 3<sup>rd</sup> printing, Urbana: AOCS, 2014e. Met. Cd 26-96 “Stigmastadienes in Vegetable Oils”.

Firestone, D. (Ed.). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 6th ed., 3rd printing, Urbana: AOCS, 2014f, Met. Ce 1h-05 “Determination of cis-, tran, Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids in Vegetable or Non-ruminant Animal Oils and Fats by Capillary GLC”.

FSCJ (Food Safety Commission of Japan). (2015). Considerations on glycidol and its fatty acid esters in foods: Executive summary. *Food Safety*, 3(2), 67-69.

García-González, D. L., Aparicio-Ruiz, R., & Aparicio, R. (2008). Virgin olive oil - Chemical implications on quality and health. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(7), 602–607.

Garcia, R., Martins, N., & Cabrita, M. J. (2013). Putative markers of adulteration of extra virgin olive oil with refined olive oil: Prospects and limitations. *Food Research International*, 54(2), 2039–2044.

Gaylor, D. W. (1992). Incidence of Developmental Defects at the No Observed Effect Level (NOAEL). *Regul Toxicol Pharmacol.* 15:151–160.

Haines, T. D., Adlaf, K. J., Pierceall, R. M., Lee, I., Venkitasubramanian, P., & Collison, M. W. (2011). Direct Determination of MCPD Fatty Acid Esters and Glycidyl Fatty Acid Esters in Vegetable Oils by LC – TOFMS. *J Am Oil Chem Soc*, 88, 1–14.

Hori, K., Koriyama, N., Omori, H., Kuriyama, M., Arishima, T., & Tsumura, K. (2012). Simultaneous determination of 3-MCPD fatty acid esters and glycidol fatty acid esters in edible oils using liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *LWT - Food Science and Technology*, 48(2), 204–208.

Horwitz, W. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 18th Ed. 2005. Current Through Revision 3, 2010 Gaithersburg, Maryland, AOAC, 2010. Chapter 41 Met. 996.06, p. 20.

Hrncirik, K., & van Duijn, G. (2011). An initial study on the formation of 3-MCPD esters during oil refining. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 374–379.

Hung, W., Peng, G., Tsai, W., Chang, M. Liao, C., Tseng, S., Kao, Y., Wang, D. & Cheng, H. (2017). Identification of 3-MCPD esters to verify the adulteration of extra virgin olive oil. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 10(3), 233-239.

IARC (International Agency for Research on Cancer). (2000). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Glycidol, p. 469–486.

IARC (International Agency for Research on Cancer). (2012). 3-Monochloro-1,2-propanediol. Monographs V. 101. Some Chemicals Present in Industrial and Consumer Products, Food and Drinking-water. Lyon, France, 349-374.

Irwin, R. D., Eustis, S. L., Stefanski, S., & Haseman, J. K. (1996). Carcinogenicity of Glycidol in F344 Rats and B6C3FI Mice. *Journal of applied toxicology*, 16(3), 201–209.

JECFA. (2016). Evaluations of contaminants. JECFA 83rd Meeting Summary.

Jędrkiewicz, R., Głowacz, A., Gromadzka, J., & Namieśnik, J. (2016). Determination of 3-MCPD and 2-MCPD esters in edible oils, fish oils and lipid fractions of margarines available on Polish market. *Food Control*, 59, 487–492.

Jędrkiewicz, R., Kupska, M., Głowacz, A., Gromadzka, J., & Namieśnik, J. (2015). 3-MCPD: A Worldwide Problem of Food Chemistry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(14), 2268-2277.

Koyama, K., Miyazaki, K., Abe, K., Egawa, Y., Kido, H., Kitta, T., Miyashita, T., Nezu, T., Nohara, H., Sano, T., Takahashi, Y., Taniguchi, H., Yada, H., Yamazaki, K., Watanabe, Y. (2016). Collaborative Study of an Indirect Enzymatic Method for the

Simultaneous Analysis of 3-MCPD, 2-MCPD, and Glycidyl Esters in Edible Oils. *Journal of Oleo Science*, 65(7), 557–568.

Kuhlmann, J. (2011). Determination of bound 2,3-epoxy-1-propanol (glycidol) and bound monochloropropanediol (MCPD) in refined oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 335–344.

Larsen, J. C. (2009). 3-MCPD Esters in Food Products. Summary Report and presentations of ILSI Workshop, Brussels, Belgium.

Li, C., Li, L., Jia, H., Wang, Y., Shen, M., Nie, S., & Xie, M. (2016a). Formation and reduction of 3-monochloropropane-1,2-diol esters in peanut oil during physical refining. *Food Chemistry*, 199, 605–611.

Li, C., Zhou, Y., Zhu, J., Wang, S., Nie, S., & Xie, M. (2016b). Formation of 3-chloropropane-1,2-diol esters in model systems simulating thermal processing of edible oil. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 586–592.

MacMahon, S., Begley, T. H., & Diachenko, G. W. (2013a). Occurrence of 3-MCPD and glycidyl esters in edible oils in the United States. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 30(12), 37–41.

Macmahon, S., Mazzola, E., Begley, T. H., & Diachenko, G. W. (2013b). Analysis of processing contaminants in edible oils. Part 1. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the direct detection of 3-monochloropropanediol monoesters and glycidyl esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(20), 4737–4747.

MAPA. Inspeção do Ministério da Agricultura identifica 45 marcas de azeite fraudados, 2017. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapa-identifica-45-marcas-de-azeite-fraudados>>. Acesso em 28 dez. 2017.



Matthäus, B., Pudel, F., Fehling, P., Vosmann, K., & Freudenstein, A. (2011). Strategies for the reduction of 3-MCPD esters and related compounds in vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 380–386.

Meira, M., Quintella, C. M., Ribeiro, E. M. D. O., Santos, M. a, Luna, S., Lopes, A., & Cid, D. (2014). Identification of Adulteration of Olive Oil with Other Edible Oils by LED-induced Fluorescence and Multivariate Calibration. *International Journal of Chemistry*, 6(4), 31–37.

O'Brien, R. (2009). *Fats and Oils – Formulating and Processing for Applications*. 3rd Ed., CRC Press, Boca Raton, 744 p.

Ojeda, M. U. (2012). Extração de azeite de oliva de qualidade in: *Oliveira no Brasil Tecnologias de Produção*. EPAMIG, cap. 20.

Oliveira, A. F., Barcelos, M. F. P., Gonçalves, E. D., & Neto, J. V. (2008). Azeite de oliva: conceitos, classificação, usos e benefícios para a saúde humana. EPAMIG – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, Circular técnica, n. 40.

Owen, R. W., Giacosa, A., Hull, W. E., Haubner, R., Würtele, G., Spiegelhalder, B., & Bartsch, H. (2000). Olive-oil consumption and health: the possible role of antioxidants. *The Lancet Oncology*, 1, 107–12.

Özdikicierler, O., Yemisçioğlu, F., Gümüşkesen, A. S. (2015). Effects of process parameters on 3-MCPD and glycidyl ester formation during steam distillation of olive oil and olive pomace oil. *European Food Research and Technology*, 1-9.

Peixoto, E. R. M., Santana, D. M. N., Abrantes, S. (1998). Avaliação dos índices de identidade e qualidade do azeite de oliva – Proposta para atualização da legislação brasileira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 18(4), 444-452.

Peñalvo, G. C., Robledo, V. R., Callado, C. S. C., Santander-Ortega, M. J., Castro-Vázquez, L., Lozano, M. V., Arroyo-Jiménez, M. M. (2016). Improving green

enrichment of virgin olive oil by oregano. Effects on antioxidants. *Food Chemistry*, 197, 509–515.

Rahn, A. K. K., & Yaylayan, V. A. (2011). What do we know about the molecular mechanism of 3-MCPD ester formation? *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 323–329.

Saba A., Mazzini F., Raffaelli A., Mattei A., Salvadori P. (2005). Identification of 9(E),11(E)-18:2 fatty acid methyl ester at trace level in thermal stressed olive oils by GC coupled to acetonitrile CI-MS and CI-MS/MS, a possible marker for adulteration by addition of deodorized olive oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 53(12), 4867-4872.

Schilter, B., Scholz, G., & Seefelder, W. (2011). Fatty acid esters of chloropropanols and related compounds in food: Toxicological aspects. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 309–313.

Seefelder, W., Varga, N., Studer, A., Williamson, G., Scanlan, F. P., Stadler, R. H. (2008). Esters of 3-chloro-1,2-propanediol (3-MCPD) in vegetable oils: significance in the formation of 3-MCPD. *Food Additives & Contaminants: Part A.*, 25(4), 391–400.

Seefelder, W., Scholz, G., & Schilter, B. (2011). Structural diversity of dietary fatty esters of chloropropanols and related substances. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 319–322.

Silva, F. A. M., Borges, M. F. M., & Ferreira, M. A. (1999). Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, 22(1), 94–103.

Šmidrkal, J., Tesařová, M., Hrádková, I., Berčíková, M., Adamčíková, A., & Filip, V. (2016). Mechanism of formation of 3-chloropropan-1,2-diol (3-MCPD) esters under conditions of the vegetable oil refining. *Food Chemistry*, 211, 124–129.

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

Svejkovská, B., Novotný, O., Divinová, V., Réblová, Z., Dolezal, M., & Velíšek, J. (2004). Esters of 3-Chloropropane-1,2-Diol in Foodstuffs. *Czech Journal of Food Science*, 22(5), 190–196.

Tfouni, S. A. V.; Reis, R. M.; Amaro, N. P. L.; Pascoal, C. R.; Camargo, M. C. R.; Baggio, S. R.; Rauen-Miguel, A. M. O.; Furlani, R. P. Z. (2017). Adulteration and presence of polycyclic aromatic hydrocarbons in extra virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 94, 1351-1359.

Van Durme, J., & Vandamme, J. (2016). Non-thermal plasma as preparative technique to evaluate olive oil adulteration. *Food Chemistry*, 208, 185–191.

Velíšek, J., Davídek, J., Hajslová, J., Kubelka, V., Janíček, G., Mánková, B. (1978). Chlorohydrins in protein hydrolysates. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung Und -Forschung*, 167(4), 241-244.

Wabaidur, S. M., AlAmmari, A., Aqel, A., AL-Tamarah, S. A., Alothman, Z. A. AYBadjah, Ahmed, H. (2016). Determination of free fatty acids in olive oils by UPHLC-MS. *Journal of Chromatography B*, 1031, 109-115.

Weißhaar, R., & Perz, R. (2010). Fatty acid esters of glycidol in refined fats and oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112(2), 158–165.

Wenzl, T., Samaras, V., Giri, A., Buttinger, G., Karasek, L., Zelinkova, Z. (2015). Development and validation of analytical methods for the analysis of 3-MCPD (both in free and ester form) and glycidyl esters in various food matrices and performance of an ad-hoc survey on specific food groups in support to a scientific opinion on comprehensive risk assessment on the presence of 3-MCPD and glycidyl esters in food. European Food Safety Authority, EFSA supporting publication, 12(3):EN-779, p. 78.

Workshop de Azeite de Oliva, 1, 2017, Campinas. Produção de Oliveiras Aspectos Agronômicos. Campinas: UNICAMP, 2017.

Workshop de Óleos Vegetais – Aspectos técnicos e legais aplicados ao setor de azeite de oliva, temperos e óleos compostos, 1, 2017, São Paulo. Ações do MAPA na fiscalização e regulação de azeite de oliva: resultados da Operação Ísis. São Paulo: FIESP, 2017.

Zelinková, Z., Svejková, B., Velíšek, J., & Doležal, M. (2006). Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. *Food Additives and Contaminants*, 23(12), 1290–1298.

## **CAPÍTULO 2 - OCCURRENCE OF 3-MCPD, 2-MCPD AND GLYCIDYL ESTERS IN EXTRA VIRGIN OLIVE OILS, OLIVE OILS AND OIL BLENDS AND CORRELATION WITH IDENTITY AND QUALITY PARAMETERS**

O artigo foi submetido à revista Food Control

Kamille Kamikata<sup>a</sup>; Eduardo Vicente<sup>a</sup>; Adriana Pavesi Arisseto-Bragotto<sup>b</sup>, Ana Maria Rauen de Oliveira Miguel<sup>a</sup>, Raquel Fernanda Milani<sup>a</sup>; Silvia Amelia Verdiani Tfouni<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos, Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL). Av. Brasil, 2880, Campinas, SP, 13070-178, Brazil.

<sup>b</sup>Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Rua Monteiro Lobato, 80, Campinas, SP, 13083-862, Brazil

\*tfouni@ital.sp.gov.br

### **ABSTRACT**

3-MCPDE (3-monochloropropane-1,2-diol esters), 2-MCPDE (2-monochloropropane-1,3-diol esters) and GE (glycidyl esters) are heat-induced contaminants that are formed during the refining of vegetable oils under high temperatures, mainly during the deodorization step. Samples commercialized on the Brazilian market as extra virgin olive oils (EVOO), olive oils and oil blends (n = 76) were analysed for 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE. A possible correlation with the identity and quality parameters established for olive oils was also evaluated. Concentrations of 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE ranged from not detected to 1.16 mg/kg, not detected to 0.58 mg/kg and not detected to 1.98 mg/kg in EVOO, respectively. The samples commercialized as olive oil presented concentrations ranging from 0.28 to 3.77 mg/kg for 3-MCPDE, from 0.17 to 1.91 mg/kg for 2-MCPDE

and from not detected to 1.88 mg/kg for GE. For oil blends, 3-MCPDE levels were from 0.18 to 0.61 mg/kg, 2-MCPDE levels were from not detected to 0.25 mg/kg and GE ranged from 0.31 to 1.84 mg/kg. As the processing of EVOO does not require the use of high temperatures, these esters were not expected at quantifiable levels in these products, indicating that they were probably adulterated with the addition of some type of refined oil. According to this study, analysis of 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE can also be used as a complementary indicator of adulteration of EVOO.

**Keywords:** 3-MCPD esters, 2-MCPD esters, glycidyl esters, extra virgin olive oil, oil blend.

## 1. INTRODUCTION

3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) and 2-monochloropropane-1,3-diol (2-MCPD) are chemical contaminants belonging to the group of chloropropanols. Glycidol is an organic compound related to the formation and decomposition of 3-MCPD and 2-MCPD, and is constituted by a molecule of glycerol containing the functional groups epoxide and alcohol. These contaminants may be present in food in their free form but also, in higher amounts, in their esterified form (EFSA, 2016; Schilter, Scholz, & Seefelder, 2011; Seefelder, Scholz, & Schilter, 2011). 3-MCPDE (3-monochloropropane-1,2-diol esters), 2-MCPDE (2-monochloropropane-1,3-diol esters) and GE (glycidyl esters) are heat-induced contaminants that may be formed during the processing of vegetable oils under high temperatures, mainly during the deodorization step of the refining process. These contaminants can also be present in other types of food, being formed by industrial or domestic processing of bread,

bakery products, infant formula, margarine and similar, fish, cheese and meat, among others (EFSA, 2016; Stadler, 2015).

In 2012, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified 3-MCPD in the category 2B as a "possible human carcinogen" (IARC, 2012). Glycidol in its free form was shown to present carcinogenic and genotoxic properties and has been classified by IARC, in 2000, in the category 2A as a "probable human carcinogen" (IARC, 2000). Some studies show that the free forms of these compounds may be released from their esterified forms during digestion (EFSA, 2016; Schilter et al., 2011; Seefelder et al., 2011).

The European Food Safety Authority (EFSA) evaluated MCPDs and their esters in 2013 and 2016 and reported that the available studies indicate that the toxic effects caused by 3-MCPDE are the same of its free form (EFSA, 2013; 2016). In 2017, EFSA CONTAM Panel established a tolerable daily intake (TDI) of 2.0 µg/kg body weight (bw) for 3-MCPD and its esters (EFSA, 2018). In 2016, during its 83<sup>rd</sup> meeting, the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) established a group PMTDI (provisional maximum tolerable daily intake) of 4.0 µg/kg bw for 3-MCPD and 3-MCPD esters, singly or in combination, expressed as 3-MCPD equivalents (JECFA, 2016).

In addition to the processing conditions, the presence of some precursors promotes the formation of these contaminants. As refined palm oil (*Elaeis guineensis*) is obtained from fruits, this oil may present significantly higher levels of MCPDE and GE than oils obtained from seeds. Olive oil presents the same characteristic of being obtained from fruits and so is also susceptible to the formation of MCPDE and GE when thermally processed (Šmidrkal et al., 2016; Stadler, 2015).

Among vegetable oils commercialized worldwide, olive oil (*Olea europaea*) is one of the oldest and plays an important role in the Mediterranean diet. It is widely consumed due to its organoleptic properties, high nutritional value, high content of monounsaturated fatty acids and antioxidant properties (Goodacre, 1993; Van Durme & Vandamme 2016).

Virgin olive oils (which include extra virgin olive oils (EVOO)) are obtained from the fruit solely by mechanical or physical means. As the process does not require the use of high temperatures, the presence of MCPD and glycidyl esters is not expected in these products, unless they suffer adulteration with the addition of a refined oil (Hrncirik & van Duijn, 2011). Virgin and extra virgin olive oils are products with high added value and a relatively small world production, which makes these products subject to different types of adulteration and fraud. The most common one is the addition of a vegetable oil of lower cost, such as an olive oil of lower quality (lampante, refined olive oil and pomace olive oil) or seed oils, e.g., sunflower, soybean, corn, rapeseed, hazelnut and peanut oil (Aued-Pimentel, Takemoto, Kumagai, & Cano, 2008; Meira et al., 2014; Tfouni et al., 2017). As extra virgin olive oil is an expensive product, in Brazil many consumers tend to substitute it with a cheaper alternative, such as oil blends and olive oils. Oil blends are a mixture of olive oil with another vegetable oil, usually soybean oil, while products commercialized as olive oil consist of a blend of refined olive oil with virgin olive oil (Brasil, 2012; IOC, 2016).

In order to prevent adulteration or erroneous labelling, MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brazilian Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply) established, in 2012, a regulation setting official standards of identity, quality and classification for olive oil and olive pomace oil (MAPA, 2012).



The regulation was based on International Olive Council (IOC) standards and presents the same parameters defined in COI/T.15/NC No.3/ Rev. 11 (COI, 2016). The evaluation of the authenticity of an EVOO comprises analysis of different parameters, such as free fatty acids, fatty acid composition, peroxide value, stigmastadienes, specific extinction, sterols, wax, erythrodiol and uvaol content, which may, together, provide information about the presence of refined olive or seed oils.

The objective of the present study was to validate a method and determine the levels of 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE in EVOO, olive oils and oil blends commercialized in Brazil and evaluate their possible correlation with some identity and quality parameters established for olive oils.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1. Samples**

A total of 76 samples commercialized as EVOO, olive oils and oil blends were purchased at supermarkets in the state of São Paulo, Brazil. The following samples were acquired: 13 samples of different brands of olive oils; 17 samples of different brands of oil blends; and 46 samples from 34 brands of EVOO (2 batches of 12 different brands and 1 batch from 22 brands).

### **2.2. Standards**

Analytical standards rac 1,2-Bis-palmitoyl-3-chloropropanediol (PP-3-MCPD, purity 98%), rac 1,2-Bis-palmitoyl-3-chloropropanediol-d5 (PP-3-MCPD-d5, 98%), 1,3-Dipalmitoyl-2-chloropropanediol (PP-2-MCPD, purity 98%), glycidyl palmitate (P-Gly, purity 98%), glycidyl palmitate-d5 (P-Gly-d5, chemical purity: 97% and isotopic

purity: 97.6%) were purchased from Toronto Research Chemicals Inc. Cholesta-3,5-diene (purity 92.6%) was supplied by Sigma Aldrich Chemical Co.

### **2.3. Solvents and reagents**

Tetrahydrofuran (THF, anhydrous, purity  $\geq$  99.99%, inhibitor-free), heptane (purity  $\geq$  99%), toluene (purity 99.9%), sodium bromide (NaBr, purity  $\geq$  99.5%), sodium bicarbonate, acetone, phenylboronic acid (PBA, purity  $\geq$  97%) were purchased from Sigma-Aldrich. Sulphuric acid (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), sodium sulfate, silica gel 60 (70-230 mesh ASTM), potassium hydrogen phthalate (purity 99.97%) and sodium thiosulphate from Merck. Methanol and cyclohexane were supplied by J. T. Baker and n-Hexane (purity 96%) by Scharlau. All other reagents, ethanol, phenolphthalein, sodium hydroxide, isooctane, acetic acid, potassium iodide, soluble starch, sodium lauryl sulphate, potassium dichromate, sulfuric acid, sodium chloride, ammonium chloride, sodium sulphate anhydrous were purchased from Synth. Water was obtained from a Millipore Milli-Q purification system.

### **2.4. Method for 3-MCPD, 2-MCPD and glycidyl esters determination**

For the determination of 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE, the analytical method was performed according to the official AOCS method Cd 29a-13 with some modifications (AOCS, 2014a). In the last step the residue was dissolved in 300  $\mu$ L of heptane instead of 400  $\mu$ L and it was filtered through defatted cotton.

#### **2.4.1. Sample preparation**

Samples were weighed (100-110 mg) into glass tubes with the addition of 50  $\mu$ L of the combined solution of internal standards (PP-3-MCPD-d<sub>5</sub>, 40  $\mu$ g/mL and P-

Gly-d5, 50 µg/mL) and dissolved in 2 mL of THF. A volume of 30 µL of acid aqueous solution of NaBr (3mg/mL, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5% v/v) was added to the sample for the conversion of glycidyl esters to 3-monobromo-1,2-propanediol (3-MBPD) esters. The mixture was homogenized and incubated at 50°C for 15 min. The reaction was stopped by the addition of 3 mL of aqueous solution of sodium hydrogen carbonate (0.6%, w/v) and then 2 mL of n-heptane was added and mixed. The upper layer was transferred to an empty glass tube and evaporated to dryness under a nitrogen stream (max 15-20 min at 35-40°C). The residue was dissolved in 1 mL of THF. Then a transesterification reaction was performed to obtain 3-MCPD, 2-MCPD and 3-MBPD in their free forms, with the addition of 1.8 mL of sulfuric acid in methanol (1.8%, v/v) and incubated in a water bath at 40°C for 16 h. The reaction was stopped by the addition of 0.5 mL of sodium hydrogen carbonate saturated solution and the organic solvents were evaporated under a nitrogen stream. For separation of fatty acid methyl esters from the sample, 2 mL of sodium sulphate solution (20%, w/v) was added, followed by liquid–liquid extraction with two portions of 2 mL of heptane. Free 3-MCPD, 2-MCPD and 3-MBPD were then derivatised with 250 µL of PBA saturated solution (25%, w/v in acetone:water, 19:1, v/v) and incubated for 5 min in an ultrasonic bath (room temperature). The derivatives were extracted with two portions of 1 mL of heptane and evaporated to dryness under a nitrogen stream. The residue was dissolved in 300 µL of heptane, filtered through defatted cotton and transferred to a vial. The compounds were then analysed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

### **2.4.2. GC-MS**

GC-MS analysis was conducted on an HP 7890A gas chromatograph coupled to a MSD 5975C mass spectrometer (Agilent Technologies). An aliquot of 2.0  $\mu\text{L}$  of the extract was injected at 250°C in pulsed splitless mode. GC was performed using a HP-1ms capillary column (30 m x 0.25 mm, 1  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies). The carrier gas was helium at a constant flow rate of 0.8 mL/min. Oven temperature was programmed at: 80°C (1 min), from 80°C to 170°C at 10°C/min, from 170°C to 200°C at 3°C/min, from 200°C to 300°C at 15°C/min, 15 min at 300°C. Transfer line temperature was at 300°C, ion source and quadrupole temperature were 230°C and 150°C, respectively. Detection was performed by selected ion monitoring (SIM) after positive electron impact ionization (70 eV). The following ions were monitored: m/z 147 (quantifier ion), 196 and 198 (qualifier ions) for 3-MCPD derivative, m/z 150 (quantifier ions), 201 and 203 (qualifier ions) for the internal standard 3-MCPD-d5 derivative, m/z 196 (quantifier ion) and 198 (qualifier ion) for 2-MCPD derivative, m/z 147 (quantifier ion) and 240 (qualifier ion) for 3-MBPD derivative, and m/z 150 (quantifier ion) and 245 (qualifier ion) for the internal standard 3-MBPD-d5 derivative.

### **2.4.3. Method validation**

Method was validated according to INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) guidelines, comprising the following parameters: linearity, precision (reproducibility and repeatability), trueness (recovery), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) (INMETRO, 2016).

Linearity was evaluated in both solvent (heptane) and matrix matched calibration curves, which were constructed using eleven calibration points in the

range of 0 to 8.8 mg/kg for 3-MCPDE, 0 to 9.1 mg/kg for 2-MCPDE and 0 to 20.9 mg/kg for GE. Solvent calibration curves were constructed with the addition of different concentrations of analytical standards to reagent blank analyses. For matrix matched calibration points a sample of EVOO, in which the presence of the three esters was not detected, was used as a blank sample that was spiked with standards in different concentrations. Matrix effect was determined using the slopes of the calibration curves in both solvent and matrix extracts (EC, 2015). Precision and recovery of the method were performed using a quality control material (vegetable oil T2649QC) provided by FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme). The QC material was analysed in replicates in six different days and seven replicates in the same day to determine 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE reproducibility and repeatability, respectively. Recovery was evaluated by comparing the mean results obtained with the assigned values of QC material, and precision was evaluated through the relative standard deviation (RSD) of the seven replicates analysed. LOD and LOQ were calculated as 3 and 10 times the standard deviation of seven independent analyses of the blank sample spiked at the lower level of the analytical calibration curves, with concentrations of 0.1 mg/kg for 3-MCPDE, 0.1 mg/kg for 2-MCPDE and 0.4 mg/kg for GE.

## ***2.5. Free Fatty Acids, Peroxide Value, Specific Extinction, Fatty Acids Composition and Stigmastadienes***

AOCS official analytical methods were used for the determination of free fatty acids, peroxide value, specific extinction, fatty acids composition and stigmastadienes.

For free fatty acids determination, the sample was dissolved in hot neutralized alcohol and phenolphthalein was used as an indicator. Sample was titrated with standard sodium hydroxide according to AOCS method Ca 5a-40 (AOCS, 2014b).

AOCS Cd 8b-90 method was used for peroxide value analysis. A mixture of acetic acid-isooctane was added to the sample. After a 1 minute reaction with a saturated potassium iodide solution the reaction mixture was titrated with a sodium thiosulfate solution (AOCS, 2014c).

Specific extinction (method Ch 5-91) was determined by dissolving 0.25 g of oil sample in cyclohexane and analysing with a spectrophotometer (Varian Cary 50) at 232 and 270 nm (AOCS, 2014d).

For fatty acids composition, AOCS method Ce 1h-05 was used. Sample transmethylation was carried out using ammonium chloride solution and sulfuric acid in methanol as the esterifying agent and analysed by gas chromatography with flame ionization detection (GC-FID, Agilent 7890A) (AOCS, 2014e).

AOCS Cd 26-96 method was used for stigmastadienes determination. The method consisted of saponification of the oil sample in the presence of internal standard (cholesta-3,5-diene), followed by clean up of the unsaponifiable matter by open-column chromatography with silica gel. Identification and quantification of stigmasta-3,5-diene and its isomer was by GC-FID (GC-17A, Shimadzu) (AOCS, 2014f). When stigmasta-3,5-diene was at concentrations higher than 4.0 mg/kg, official method Cd 27-96 was used. The procedure was the same as that mentioned above though without the unsaponifiable matter preparation. Oil sample and internal standard were transferred directly to column chromatography on silica gel (AOCS, 2014g).

## **2.6. Statistical Analysis**

Data was processed by one-way analysis of variance (ANOVA) with means comparison (Tukey test) with 95% confidence ( $p < 0.05$ ) using XLSTAT program.

A chemiometric method was applied to assist results interpretation. Principal Component Analysis (PCA) was carried out with software Pirouette (InfoMetrix, Woodinville, WA, USA) version 2.01.

## **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### **3.1. 3-MCPD, 2-MCPD and glycidyl esters**

Determination coefficients ( $R^2$ ) obtained showed that both solvent and matrix matched calibrations curves were linear for all compounds analysed. Matrix effect was below 20% or above -20% for 2-MCPDE and GE (9.7% and -10.6%, respectively) while for 3-MCPDE matrix effect observed was above 20% (21.6%) (EC, 2015), thus matrix matched calibration was used for quantification of all three compounds. Table 1 presents results obtained for the validation parameters studied. Determination coefficients ( $R^2$ ) for matrix matched calibrations curves were 0.993 for 3-MCPDE, 0.996 for 2-MCPDE and 0.998 for GE. LOD and LOQ were, respectively, 0.01 and 0.03 mg/kg for 3-MCPDE and 0.02 and 0.08 mg/kg for 2-MCPDE and GE. Recoveries obtained using QC material were from 92 to 104% when comparing mean values obtained to the assigned values. Precision (RSD) varied from 4 to 9% for reproducibility and 3 to 6% for repeatability. Results obtained are in accordance with INMETRO guidelines, where the maximum limit for RSD is 11% for the concentration range studied. Recoveries were within the acceptance criteria of 80 to

110% (INMETRO, 2016), indicating that the method is appropriate for the analysis of these three esters (Table 1).

**Table 1.** Linearity, Recovery (R), precision (RSD), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for analysis of 3-MCPDE, 2-MCPDE and glycidyl esters (GE)

Analyte	Linear range	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	R (%) <sup>ab</sup>	Assigned Value <sup>c</sup> (mg/kg)	Precision (%) <sup>a</sup>	
						Reproducibility	Repeatability
3-MCPDE	0 – 8.8 mg/kg R <sup>2</sup> = 0.993	0.01	0.03	92	1.61	4	4
2-MCPDE	0 – 9.1 mg/kg R <sup>2</sup> = 0.996	0.02	0.08	101	0.71	4	3
GE	0 – 20.9 mg/kg R <sup>2</sup> = 0.998	0.02	0.08	104	0.32	9	6

R<sup>2</sup>: Determination coefficients

R: Recovery

<sup>a</sup> mean of seven replicates

<sup>b</sup> recovery using the assigned values for QC material T2649QC

<sup>c</sup> assigned values for QC material T2649QC

Table 2 presents 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE levels in samples commercialized as EVOO, olive oil and oil blend. In samples labelled as EVOO, levels of 3-MCPDE ranged from not detected to 1.16 mg/kg, 2-MCPDE varied between not detected and 0.58 mg/kg and GE ranged from not detected to 1.98 mg/kg. The samples commercialized as olive oil presented concentrations ranging from 0.28 to 3.77 mg/kg for 3-MCPDE, from 0.17 to 1.91 mg/kg for 2-MCPDE and from not detected to 1.88 mg/kg for GE. As for oil blends, 3-MCPDE levels were from 0.18 to 0.61 mg/kg, 2-MCPDE levels were from not detected to 0.25 mg/kg and GE ranged from 0.31 to 1.84 mg/kg. The levels of 3-MCPDE and 2-MCPDE in EVOO and olive oils detected in this study are comparable to levels of occurrence in palm oil, which is the vegetable oil that shows the highest levels of these esters (EFSA, 2016). According to EFSA (2016), palm oils present average 3-MCPDE and 2-MCPDE levels of 2.91 mg/kg and 1.56 mg/kg, respectively.



**Table 2.** 3-MCPD esters (3-MCPDE), 2-MCPD esters (2-MCPDE) and glycidyl esters (GE) levels in extra virgin olive oils (EVOO), olive oils and oil blends

Samples	3-MCPDE	2-MCPDE	GE
	(mg/kg) Mean (n=3) (range)	(mg/kg) Mean (n=3) (range)	(mg/kg) Mean (n=3) (range)
A1	nd	nd	nd
A2	nd	nd	nd
A3	nd	nd	nd
A4	<LOQ	nd	nd
A5	0.47 (0.46 - 0.49)	0.24 (0.21 - 0.27)	1.53 (1.40 - 1.69)
A6	0.3 (0.30 - 0.31)	0.15 (0.12 - 0.16)	1.98 (1.82 - 2.16)
A7	0.15 (0.14 - 0.16)	<LOQ	0.40 (0.37 - 0.41)
A8	0.78 (0.76 - 0.80)	0.29 (0.28 - 0.31)	0.66 (0.64 - 0.70)
A9	0.28 (0.27 - 0.29)	0.09 (0.07 - 0.10)	0.77 (0.75 - 0.80)
A10	nd	nd	nd
A11	nd	nd	nd
A12	nd	nd	nd
A13	nd	nd	nd
A14	1.16 (1.07 - 1.24)	0.58 (0.51 - 0.66)	0.82 (0.75 - 0.92)
A15	0.26 (0.25 - 0.27)	0.13 (0.12 - 0.14)	1.26 (1.24 - 1.28)
A16	0.17 (0.16 - 0.18)	0.07 (0.07 - 0.08)	1.02 (1.01 - 1.04)
A17	0.24 (0.22 - 0.25)	0.11 (0.10 - 0.12)	0.53 (0.52 - 0.54)
A18	0.58 (0.56 - 0.59)	0.30 (0.27 - 0.34)	0.95 (0.93 - 0.98)
A19	0.27 (0.25 - 0.29)	0.17 (0.16 - 0.18)	1.29 (1.27 - 1.31)
A20	<LOQ	nd	nd
A21	0.41 (0.40 - 0.42)	0.19 (0.18 - 0.21)	1.27 (1.14 - 1.37)
A22	nd	nd	nd
A23	<LOQ	nd	nd
A24	nd	nd	nd
A25	nd	nd	nd
A26	nd	nd	nd
A27	0.13 (0.13 - 0.14)	nd	0.27 (0.26 - 0.28)
A28	<LOQ	nd	nd
A29	0.30 (0.30 - 0.30)	0.20 (0.19 - 0.20)	0.52 (0.50 - 0.53)
A30	<LOQ	nd	nd
A31	<LOQ	nd	nd
A32	<LOQ	nd	<LOQ
A33	nd	nd	nd
A34	nd	nd	nd
A35	0.26 (0.25 - 0.28)	0.20 (0.18 - 0.23)	0.67 (0.64 - 0.68)
A36	<LOQ	nd	nd
A37	0.35 (0.32 - 0.37)	0.19 (0.19 - 0.19)	0.93 (0.90 - 0.97)
A38	<LOQ	nd	nd
A39	<LOQ	nd	nd
A40	<LOQ	nd	<LOQ
A41	<LOQ	nd	nd
A42	<LOQ	nd	nd

A43	<LOQ	nd	nd
A44	<LOQ	nd	nd
A45	<LOQ	nd	nd
A46	<LOQ	nd	<LOQ
B1	0.87 (0.83 - 0.90)	0.21 (0.19 - 0.25)	0.45 (0.42 - 0.49)
B2	0.71 (0.67 - 0.78)	0.41 (0.39 - 0.43)	nd
B3	0.92 (0.80 - 1.00)	0.52 (0.49 - 0.57)	0.40 (0.38 - 0.44)
B4	0.65 (0.62 - 0.68)	0.34 (0.32 - 0.35)	0.24 (0.23 - 0.26)
B5	0.97 (0.88 - 1.07)	0.23 (0.22 - 0.23)	0.21 (0.21 - 0.22)
B6	0.80 (0.77 - 0.85)	0.25 (0.23 - 0.29)	0.24 (0.23 - 0.25)
B7	0.42 (0.40 - 0.44)	0.18 (0.17 - 0.19)	0.22 (0.21 - 0.23)
B8	0.42 (0.38 - 0.46)	0.23 (0.22 - 0.25)	0.61 (0.55 - 0.66)
B9	0.56 (0.50 - 0.62)	0.26 (0.25 - 0.27)	0.99 (0.82 - 1.15)
B10	3.77 (3.60 - 3.90)	1.91 (1.77 - 2.01)	1.60 (1.58 - 1.63)
B11	0.89 (0.87 - 0.90)	0.40 (0.37 - 0.41)	0.65 (0.62 - 0.66)
B12	0.28 (0.26 - 0.30)	0.17 (0.16 - 0.18)	0.87 (0.86 - 0.88)
B13	0.46 (0.45 - 0.46)	0.28 (0.26 - 0.29)	1.88 (1.86 - 1.91)
C1	0.42 (0.39 - 0.46)	0.18 (0.17 - 0.18)	0.50 (0.49 - 0.50)
C2	0.24 (0.19 - 0.27)	0.12 (0.11 - 0.12)	0.39 (0.38 - 0.41)
C3	0.22 (0.20 - 0.23)	0.10 (0.09 - 0.11)	0.31 (0.29 - 0.32)
C4	0.27 (0.26 - 0.29)	0.13 (0.12 - 0.13)	0.35 (0.33 - 0.37)
C5	0.45 (0.44 - 0.46)	0.18 (0.17 - 0.18)	1.09 (0.99 - 1.20)
C6	0.19 (0.18 - 0.20)	0.11 (0.10 - 0.12)	0.47 (0.46 - 0.50)
C7	0.23 (0.20 - 0.25)	0.13 (0.11 - 0.15)	0.86 (0.84 - 0.87)
C8	0.49 (0.46 - 0.51)	0.25 (0.24 - 0.28)	1.76 (1.73 - 1.77)
C9	0.22 (0.21 - 0.24)	nd	0.48 (0.48 - 0.49)
C10	0.39 (0.38 - 0.40)	0.19 (0.17 - 0.21)	1.72 (1.67 - 1.80)
C11	0.24 (0.23 - 0.26)	<LOQ	0.57 (0.56 - 0.59)
C12	0.27 (0.25 - 0.29)	0.15 (0.13 - 0.17)	1.84 (1.83 - 1.84)
C13	0.35 (0.34 - 0.36)	0.16 (0.16 - 0.17)	1.68 (1.63 - 1.72)
C14	0.18 (0.18 - 0.19)	0.13 (0.13 - 0.13)	0.37 (0.35 - 0.38)
C15	0.21 (0.19 - 0.24)	nd	0.70 (0.68 - 0.74)
C16	0.61 (0.58 - 0.62)	0.21 (0.20 - 0.22)	0.42 (0.33 - 0.47)
C17	0.18 (0.16 - 0.21)	nd	0.52 (0.51 - 0.52)

nd = not detected (below LOD = 0.01 mg/kg for 3-MCPDE and 0.02 mg/kg for 2-MCPDE and GE)

<LOQ: below LOQ = 0.03 mg/kg for 3-MCPDE and 0.08 mg/kg for 2-MCPDE and GE

Samples A35 to A46 are from the second batch of some brands from samples A1 to A34

A: EVOO; B: olive oils and C: oil blends

Becalski, Feng, Lau, & Zhao (2015) analysed samples of olive oil purchased in Canada and reported levels from 0.58 to 1.56 mg/kg for 3-MCPDE, 0.28 to 0.61 mg/kg for 2-MCPDE and 0.29 to 0.93 mg/kg for GE. Hung et al. (2017) evaluated 22

refined olive oil samples and reported levels of 3-MCPDE ranging from 0.97 to 7.61 mg/kg.

According to Table 2, all oil blend samples and olive oil samples showed the presence of the analysed compounds, which was expected as this type of products have refined oil in their composition, since oil blends are a mixture of olive oil with another vegetable oil such as soybean, canola, sunflower or even refined olive oil or olive pomace oil; and olive oils are a mixture of olive oil with refined olive oil or olive pomace oil. Of the 46 samples of EVOO analysed, 16 showed the presence of MCPDE and GE, which represents 35% of the samples. As the processing of EVOO does not require the use of high temperatures, MCPDE and GE should not be present in these products, indicating a possible adulteration with the addition of some type of refined oil.

### ***3.2. Identity and quality parameters for olive oils***

Table 3 presents the results obtained for free fatty acids analysis, peroxide value, specific extinction, fatty acids composition and stigmastadienes, as well as the tolerance limits established by MAPA for EVOO and olive oils. There are no limits set for oil blends.

Free fatty acids (free acidity) levels are an indicator of the quality of the product, where a low free fatty acids level indicates a product of high quality. All samples of EVOO and olive oil analysed were within the limits set by MAPA for free fatty acids. Peroxide value indicates early stages of oxidation. A high value indicates that the olive was possibly handled inadequately. Results obtained for peroxide value show that two samples of EVOO, A31 (23.76 mEq/kg) and A40 (24.50 mEq/kg),

exceeded the limit of 20.00 mEq/kg. All olive oils analyses were below the limit established and therefore comply with MAPA regulation.

When considering the possibility of EVOO and olive oils adulteration, free fatty acids and peroxide value do not provide much information, since the addition of a refined vegetable oil generates products with low acidity and peroxide, as during the refining process hydroperoxides and free fatty acids are eliminated.

Specific extinction is a quality parameter that provides information about the oxidative state of oils and can also aid in the detection of fraud. Of the 46 samples commercialized as EVOO, 26% presented values above the limits established for K232, K270 and  $\Delta K$ . These results can be an indicative of adulteration and low quality of the samples since high values for K232 indicate the presence of conjugated hydroperoxides. Virgin olive oils with good quality and properly stored have few oxidation products that absorb at 232 nm. High K270 values are related to conjugated dienes and trienes, which are by-products formed during the refining process and are therefore related to the presence of substances formed from oxidation or oil refining (Aued-Pimentel et al. 2008; Miguel & Sakazaki, 2012).

Table 3 presents the results for the most important fatty acids used to verify EVOO adulteration. Of the 46 samples labelled as EVOO, 33% were outside the limits established by the Brazilian regulation for C18:1, C18:2, C18:3 and for the *trans* isomers C18:2 $t$  + C18:3 $t$ , while 9% were not in accordance with the acceptable limits for the *trans* isomers C18:1 $t$ . Each vegetable oil presents a specific fatty acid composition which assists identifying a possible adulteration of EVOO by addition of vegetable oil from other sources, thus these results indicate that 33% of the EVOO samples could be adulterated. However, adulterations with hazelnut, pecan nut and almond oil, for example, are difficult to detect due to similarity of the fatty acids

composition with that of olive oil, since oleic acid is the predominant fatty acid in these oils (Jee, 2002).

As for olive oil, 15% of the samples were outside the limits for the *trans* isomers C18:1*t* and 31% were discordant for the following fatty acids: C18:1, C18:2, C18:3 and *trans* isomers C18:2*t* + C18:3*t*, indicating that 31% of the samples contained oils not obtained from olives. There are no limits set for oil blends in the Brazilian regulation. However, as expected, results indicate the presence of oils from other origins in all samples. High levels of linoleic acid (C18:2) indicates the presence of soybean, sunflower and corn oils, while linolenic acid (C18:3) indicates the addition of vegetable oils such as soybean, canola and walnut, for example (Christopoulou, Lazaraki, Komaitis, & Kaselimis, 2004). C18:1*t* was detected in samples from all types of oils analysed. The presence of *trans* fatty acids indicates heat treatment, for example in the refining process of the oil or hot drying of seeds or pomace. The presence of C18:1*t* is higher in refined olive oils since C18:1 (oleic acid) is the fatty acid present in greater abundance in olive oils (Boskou, 2006).

Stigmastadienes content is an important indicative of the presence of refined oils, since they are hydrocarbons with a steroidal structure that are not naturally present in virgin olive oils. Stigmastadienes are formed in the refining process through the dehydration of  $\beta$ -sitosterol due to the use of high temperatures (García-González, Aparicio-Ruiz, & Aparicio, 2008). So as expected, in all olive oil and oil blend samples, which are known to contain refined oil, stigmasta-3,5-diene was detected. The compound was also detected in 18 out of 46 samples labelled as EVOO, indicating the presence of refined oils in these samples and therefore a possible adulteration.

**Table 3.** Parameters analyzed for extra virgin olive oils (EVOO), olive oil and oil blend (n = 76)

Parameters	EVOO (n = 46)		Olive Oil (n = 13)		Oil Blend (n = 17)
	Range detected	Tolerance limits <sup>a</sup>	Range detected	Tolerance limits <sup>a</sup>	Range detected
Free fatty acids (%)	0.10 – 0.73	≤ 0.80	0.08 – 0.83	≤ 1.00	0.10 – 0.48
Peroxide value (mEq/Kg)	1.50 – 24.50	≤ 20.00	1.18 – 8.22	≤ 15.00	1.66 – 4.93
Specific extinction					
K232	1.82 – 6.86	≤ 2.50	2.04 – 6.54	-	1.99 – 6.14
K270	0.11 – 3.26	≤ 0.22	0.24 – 3.08	≤ 0.90	0.47 – 2.71
ΔK	0.00 – 0.38	≤ 0.01	0.00 – 0.37	≤ 0.15	0 – 0.32
Fatty acids composition (%)					
C18:1 (oleic acid)	24.40 – 75.40	55.00 – 83.00	25.40 – 74.34	55.00 – 83.00	24.62 – 30.94
C18:2 (linoleic acid)	4.23 – 49.42	3.50 – 21.00	5.04 – 47.80	3.50 – 21.00	43.13 – 48.75
C18:3 (linolenic acid)	0.57 – 5.76	≤ 1.00	0.76 – 5.11	≤ 1.00	3.90 – 5.97
C18:1 <i>t</i>	nd – 0.14	≤ 0.05	nd – 0.54	≤ 0.20	nd – 0.54
C18:2 <i>t</i> + C18:3 <i>t</i>	nd – 1.72	≤ 0.05	nd – 1.55	≤ 0.30	0.11 – 1.12
Stigmasta-3,5-dienes (mg/Kg)	nd – 13.09	≤ 0.15	3.57 – 136.09	-	2.57 – 26.39

<sup>a</sup>(BRASIL, 2012)

nd = not detected

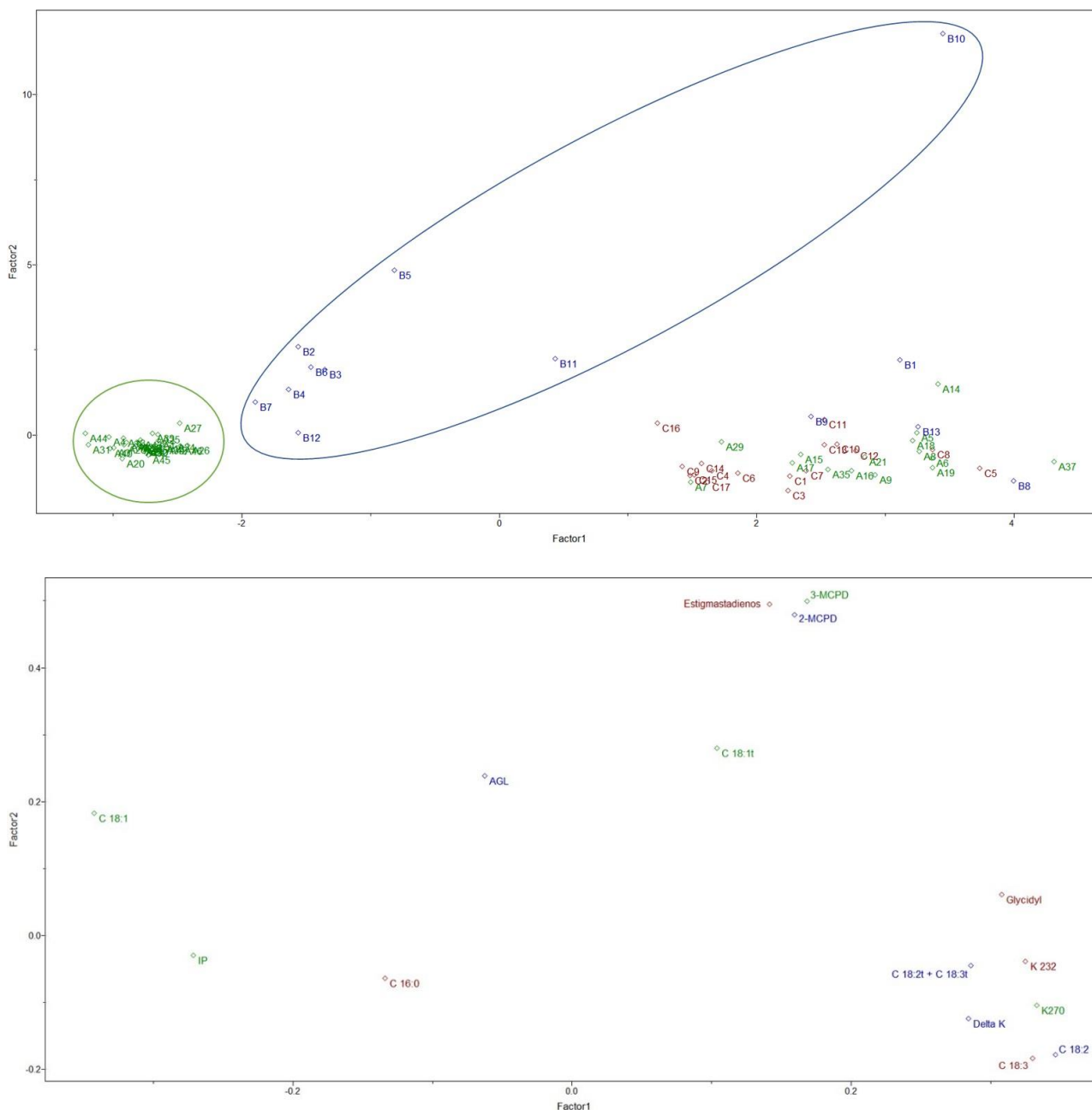
Despite labelling information, samples may be separated in three groups according to results for specific extinction, fatty acid composition and stigmastadiene presented in Table 3: A) EVOO possibly not adulterated, composed by 28 samples; B) samples with the presence of refined oil (9 samples) and C) samples with the presence of refined oil from other origin (49 samples).

When evaluating 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE levels according to the new sample grouping it can be observed that in samples from group A these compounds were not detected. Samples from group B presented higher average concentrations ( $p < 0.05$ ) of 3-MCPDE (1.05 mg/kg) and 2-MCPDE (0.49 mg/kg) than the ones from group C. This fact could be explained by the presence of higher concentration of chlorinated precursors in olives, which promote the formation of MCPDs in the refining process. On the other hand, levels of GE did not differ significantly ( $p < 0.05$ )

between groups B and C since these contaminants do not depend on chlorinated precursors, but mainly on diacylglycerols and temperature (Craft, Nagy, Seefelder, Dubois, & Destailats, 2012; Šmidrkal et al., 2016; Stadler, 2015). Similar results were obtained in previous studies, where levels of 3-MCPDE in refined olive oil and pomace oil were higher when compared to other refined vegetable oils (Yan, Oey, van Leeuwen, & van Ruth, 2018).

Groups B and C also presented a significant difference ( $p < 0.05$ ) in stigma-3,5-dienes concentrations, with group B showing higher levels (median of 34.35 mg/kg) than group C (median of 11.33 mg/kg). This can be explained by the fact that sterols (for example  $\beta$ -sitosterol, campesterol and stigmasterol) compose a large part of the unsaponifiable matter of almost all fats and oils, and EVOO have higher levels of  $\beta$ -sitosterol in their composition when compared to other oils (Aparicio & Aparicio-Ruiz, 2000). Thus, as olive oil presents higher levels of the precursors for the formation of stigmastadienes ( $\beta$ -sitosterols), it is expected a higher formation of stigmastadienes in refined olive oils than in other refined oils.

With the objective of better visualize the results, PCA was applied to the matrix of data composed of 76 total samples and 15 variables analysed (free fatty acids, peroxide value, specific extinction (K232, K270 and  $\Delta K$ ), fatty acids (C16:0, C18:1, C18:2, C18:3, C18:1*t*, C18:2*t* + 18:3*t*), stigmastadienes, 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE). During pre-processing, data was autoscaled, so all variables have the same significance. After pre-processing, Pirouette software calculated the data scores and *loadings*. Figure 1 shows PCA score plot with the first principal component (PC1) versus PC2, which describes 47.0% and 19.7% of the total variance, respectively. PCA allowed distinguishing samples into three sets.



**Figure 1.** PCA (loadings above and scores below) for the 76 samples and 15 variables analysed (free fatty acids, peroxide value, specific extinction (K232, K270 and  $\Delta K$ ), fatty acids (C16:0, C18:1, C18:2, C18:3, C18:1*t*, C18:2*t* + 18:3*t*), stigmastadienes, 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE)  
 IP: peroxide value; AGL: free fatty acids; Delta K:  $\Delta K$

The first set is mainly related to the parameters C18:1 and peroxide value, and have a strong negative correlation with the variables of C18:1*t*, stigmastadienes, 3-MCPDE and 2-MCPDE that are on the right side of the loading graph. Samples from the first set presented more negative scores in PC1 and PC2. The second set is related especially to the parameters of free fatty acids and C18:1*t*. The third set



presents highly positive scores on PC1 and negative on PC2, and they are strongly related mainly to the variables C18:2, C18:3, C18:2 $\dagger$ C18:3 $\dagger$ , K232, K270,  $\Delta$ K and GE.

The projection of the samples onto a plane defined by PC1 x PC2 presented in Figure 1 corroborates the previous discussion, with sets being formed by previous groups A (first set - EVOO possibly not adulterated), B (second set - samples with the presence of refined oil) and C (third set - samples with the presence of refined oil from other origin). Scores graph show that 4 out of 13 samples labelled as olive oil and 18 out of 46 samples (40%) labelled as EVOO were rearranged and set in group C. In previous studies conducted in Brazil in 2002 and 2017, products labelled as EVOO were shown to be adulterated with the addition of a vegetable oil of lower commercial value in 16.5% and 27% of the cases, respectively (Aued-Pimentel et al., 2002; Tfouni et al., 2017). These results show that this practice is still a cause of concern, as apparently there was no reduction in the frequency of adulteration.

According to Figure 1 and Tables 2 and 3, samples from groups B (samples with the presence of refined oil) and C (samples with the presence of refined oil from other origin) present higher levels of stigmastadiene, C18:1 $\dagger$ ,  $\Delta$ K, 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE; which presence is related to the refining process of vegetable oils. Therefore results indicate that 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE could be used as an additional parameter to indicate the presence of refined oils in olive oils.

#### **4. CONCLUSIONS**

The levels of 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE in the analysed products varied and ranged from not detected to 3.77 mg/kg for 3-MCPDE, not detected to 1.91 mg/kg for 2-MCPDE and not detected to 1.98 mg/kg for GE.

The presence of 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE in vegetable oils was shown to be an indicative of the presence of a refined vegetable oil. The presence of these esters in samples commercialized as EVOO indicates the addition of refined oils that were not declared on the label; therefore, the analysis of 3-MCPDE, 2-MCPDE and GE may also be used as a complementary indicator of adulteration of virgin oils with refined oils. However, the use of a wider group of analysis is still necessary to establish the purity of an EVOO sample.

Considering the toxicity of the contaminants and that some samples are contaminated with levels as high as the ones found in refined palm oil, the implementation of a monitoring program is suggested for all types of olive oil and blends containing olive oil as, besides the fact that adulteration of these products may deceive the consumers, it may also represent a potential health risk.

### **Acknowledgements**

K.K. thanks CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) for masters degree student fellowship.

### **5. REFERENCES**

AOCS. (2014a) Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 6th ed., 3rd printing, Urbana: AOCS, 2014. Met. Cd 29a-13 “2- and 3-MCPD Fatty Acid Esters and Glycidyl Fatty Acid Esters in Edible Oils and Fats Based on Acid Transesterification”.

AOCS. (2014b) Official methods and recommended practices of the American Oil

Chemists Society. 6th ed., 3rd printing, Urbana: AOCS, 2014. Met. Ca 5a-40 "Free Fatty Acids".

AOCS. (2014c) Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 6th ed., 3rd printing, Urbana: AOCS, 2014. Met. Cd 8b-90 "Peroxide Value Acetic Acid-Isooctane Method".

AOCS. (2014d) Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 6th ed., 3rd printing, Urbana: AOCS, 2014. Met. Ch 5-91 "Determination of Specific Extinction of Oils and Fats, Ultraviolet Absorption".

AOCS. (2014e) Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 6th ed., 3rd printing, Urbana: AOCS, 2014, Met. Ce 1h-05 "Determination of cis-, tran, Saturated, Monounsaturated and Polyunsaturated Fatty Acids in Vegetable or Non-ruminant Animal Oils and Fats by Capillary GLC".

AOCS. (2014f) Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. 6th ed., 3rd printing, Urbana: AOCS, 2014. Met. Cd 26-96 "Stigmastadienes in Vegetable Oils".

AOCS. (2014g) Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists Society. 6th ed., 3rd printing, Urbana: AOCS, 2014. Met. Cd 27-96 "Steroidal Hydrocarbons in Vegetable Oils".

Aparicio, R., & Aparicio-Ruiz, R. (2000). Authentication of vegetable oils by

chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, 881, 93–104.

Aued-Pimentel, S., Takemoto, E., Kumagai, E.E., & Cano, C.B. (2008). Determinação da diferença entre o valor real e o teórico do triglicerídeo ECN 42 para a detecção de adulteração em azeites de oliva comercializados no Brasil. *Química Nova*, 31(1), 31–34.

Becalski, A., Feng, S., Lau, B.P.Y., & Zhao, T. (2015). A pilot survey of 2- and 3-monochloropropanediol and glycidol fatty acid esters in foods on the Canadian market 2011-2013. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, 58–66.

Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). Olive oil composition. In: Boskou, D. Olive oil: Chemistry and Technology. 2nd Edition, Thessaloniki: *American Oil Chemists' Society*, 4, 41-72

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2012). Instrução Normativa nº1, de 30 de janeiro de 2012. Regulamento Técnico do Azeite de Oliva e do Óleo de Bagaço de Oliva. Diário Oficial da União, Brasília.

Christopoulou, E., Lazaraki, M., Komaitis, M., & Kaselimis, K. (2004). Effectiveness of determinations of fatty acids and triglycerides for the detection of adulteration of olive oils with vegetable oils. *Food Chemistry*, 84, 463–474.

Craft, B.D., Nagy, K., Seefelder, W., Dubois, M., & Destailats, F. (2012). Glycidyl esters in refined palm (*Elaeis guineensis*) oil and related fractions. Part II: Practical

recommendations for effective mitigation. *Food Chemistry*, 132(1), 73–79.

EC - European Commission, Directorate-General for Health and Food Safety. (2015). Document No. SANTE/11945/2015; *Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed*.

EFSA. (2016). Risks for human health related to the presence of 3- and 2-monochloropropanediol (MCPD), and their fatty acid esters, and glycidyl fatty acid esters in food EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). *EFSA Journal*, 14(4426), 159. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4426>

EFSA. (2017). Update of the risk assessment on 3-monochloropropane diol and its fatty acid esters. *EFSA Journal*, 16(1), 5083. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5083>

Ermacora, A., & Hrncirik, K. (2013). A novel method for simultaneous monitoring of 2-MCPD, 3-MCPD and glycidyl esters in oils and fats. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 90(1), 1–8.

García-González, D. L., Aparicio-Ruiz, R., & Aparicio, R. (2008). Virgin olive oil - Chemical implications on quality and health. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(7), 602–607.

Goodacre, R.; Kel, D. B.; Bianchi, G. (1993). Rapid assessment of the adulteration of virgin olive oils by other seed oils using pyrolysis mass spectrometry and artificial

neural networks. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 63(3), 297–307.

Hrcirik, K., & van Duijn, G. (2011). An initial study on the formation of 3-MCPD esters during oil refining. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 374–379.

IARC. (2000). *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Glycidol*, 469–486.

IARC. (2012). *A review of human carcinogens. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 100F.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. (2016). *Orientação Sobre Validação de Métodos Analíticos. DOQ-CGCRE-008. Rev: 05.*

IOC - International Olive Council. (2016). *Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils. COI/T.15/NC No3/Rev. 11.*

JECFA. (2016). Evaluations of contaminants. *JECFA 83rd Meeting Summary*, (23).

MAPA. (2017). *Inspeção do Ministério da Agricultura identifica 45 marcas de azeite fraudados. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapa-identifica-45-marcas-de-azeite-fraudados>>. (Accessed 28 December 2017).*

Meira, M., Quintella, C.M., Ribeiro, E.M.D.O., Santos, M.A, Luna, S., Lopes, A., & Cid, D. (2014). Identification of Adulteration of Olive Oil with Other Edible Oils by LED-induced Fluorescence and Multivariate Calibration. *International Journal of Chemistry*, 6(4), 31–37.

Schilter, B., Scholz, G., & Seefelder, W. (2011). Fatty acid esters of chloropropanols and related compounds in food: Toxicological aspects. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 309–313.

Seefelder, W., Scholz, G., & Schilter, B. (2011). Structural diversity of dietary fatty esters of chloropropanols and related substances. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(3), 319–322.

Šmidrkal, J., Tesařová, M., Hrádková, I., Berčíková, M., Adamčíková, A., & Filip, V. (2016). Mechanism of formation of 3-chloropropan-1,2-diol (3-MCPD) esters under conditions of the vegetable oil refining. *Food Chemistry*, 211, 124–129.

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

Tfouni, S.A.V., Reis, R.M., Amaro, N.P.L., Pascoal, C.R., Camargo, M.C.R., Baggio, S.R., Furlani, R.P.Z. (2017). Adulteration and Presence of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Extra Virgin Olive Oil Sold on the Brazilian Market. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 94(11), 1351–1359.

Van Durme, J., & Vandamme, J. (2016). Non-thermal plasma as preparative technique to evaluate olive oil adulteration. *Food Chemistry*, 208, 185–191.

Yan, J., Oey, S.B., van Leeuwen, S.P.J., & van Ruth, S.M. (2017). Discrimination of processing grades of olive oil and other vegetable oils by monochloropropanediol esters and glycidyl esters. *Food Chemistry*, 248, 93–100

Zelinková, Z., Svejková, B., Velíšek, J., & Dolezal, M. (2006). Fatty acid esters of 3-chloropropane-1,2-diol in edible oils. *Food Additives and Contaminants*, 23(12), 1290–1298.



## CONCLUSÕES

A presença de 3-MCPDE, 2-MCPDE e GE foi constatada nos óleos vegetais comercializados como óleo composto, azeite de oliva tipo único e em parte dos identificados como azeite de oliva extra virgem (EVOO).

A adição de óleos vegetais refinados aos azeites comercializados como EVOO acrescentam compostos tóxicos a um produto onde não era esperado encontrá-los, causando uma divergência dos benefícios associados à saúde buscados pelos consumidores.

Em vista da toxicidade associada a estes contaminantes, existe potencial risco para a saúde dos consumidores, sendo recomendada a inclusão de produtos comercializados como EVOO em futuros estudos de ingestão.

A presença de 3-MCPDE, 2-MCPDE e GE em óleos vegetais mostrou ser um indicativo da presença de um óleo vegetal refinado. Portanto, a presença desses ésteres em amostras comercializadas como EVOO indica a adição de óleos refinados que não foram declarados no rótulo. No entanto, um grupo mais amplo de análises é necessário para estabelecer a pureza de uma amostra de EVOO.

Assim, de acordo com este estudo, a determinação de 3-MCPDE, 2-MCPDE e GE também pode ser utilizada como um indicador complementar de adulteração de EVOO.

## **ANEXO 1**

### **Trabalhos apresentados em congressos**

KAMIKATA, K.; VICENTE, E.; TFOUNI, S. A. V. 3-MCPD, 2-MCPD and glycidyl esters in extra virgin olive oils. In: 8<sup>th</sup> International Symposium on Recent Advances in Food Analysis – RAFA 2017, 2017, Praga.

BRUNHEROTO, R. L.; OLIVEIRA, T. D.; KAMIKATA, K.; VICENTE, E.; TFOUNI, S. A. V. Contaminação de óleo composto com ésteres de 2-MCPD, 3-MCPD e glicidol. In: 11<sup>o</sup> Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017, 2017, Campinas.

## ANEXO 2

### RESULTADOS DOS PARÂMETROS DE IDENTIDADE E QUALIDADE

**Tabela 1.** Parâmetros analisados de índice de peróxido e ácidos graxos livres para amostras comercializadas como azeite de oliva extra virgem (n = 46)

<b>Amostra</b>	<b>Índice de peróxido (mEq/kg)</b>	<b>Ácidos graxos livres (g/100g)</b>
A1	6.94 ± 0.01	0.32 ± 0.01
A2	8.83 ± 0.34	0.26 ± 0.01
A3	12.09 ± 0.11	0.37 ± 0.01
A4	11.19 ± 0.45	0.38 ± 0.01
A5	1.87 ± 0.16	0.10 ± 0.00
A6	2.54 ± 0.14	0.20 ± 0.00
A7	2.65 ± 0.27	0.27 ± 0.01
A8	1.50 ± 0.15	0.20 ± 0.01
A9	5.85 ± 0.91	0.27 ± 0.01
A10	7.84 ± 0.24	0.32 ± 0.00
A11	5.76 ± 0.15	0.35 ± 0.00
A12	6.55 ± 0.17	0.23 ± 0.00
A13	12.99 ± 0.18	0.35 ± 0.00
A14	3.45 ± 0.04	0.24 ± 0.01
A15	3.61 ± 0.09	0.44 ± 0.00
A16	2.64 ± 0.12	0.36 ± 0.01
A17	3.23 ± 0.17	0.33 ± 0.01
A18	3.57 ± 0.24	0.19 ± 0.00
A19	4.52 ± 0.45	0.21 ± 0.00
A20	11.71 ± 0.36	0.33 ± 0.00
A21	3.20 ± 0.12	0.10 ± 0.00
A22	8.09 ± 0.02	0.46 ± 0.01
A23	8.72 ± 0.16	0.47 ± 0.00
A24	10.05 ± 0.02	0.31 ± 0.00
A25	5.89 ± 0.13	0.37 ± 0.01
A26	3.44 ± 0.14	0.17 ± 0.00
A27	7.68 ± 0.14	0.57 ± 0.01
A28	13.01 ± 0.18	0.29 ± 0.00
A29	3.93 ± 0.06	0.73 ± 0.00
A30	8.52 ± 0.12	0.20 ± 0.00
A31	23.76 ± 1.75	0.40 ± 0.00
A32	9.74 ± 0.20	0.22 ± 0.00
A33	7.69 ± 0.40	0.40 ± 0.00
A34	6.45 ± 0.12	0.22 ± 0.00
A35	3.54 ± 0.06	0.31 ± 0.01

A36	11.31 ± 0.20	0.27 ± 0.01
A37	3.51 ± 0.14	0.45 ± 0.00
A38	11.19 ± 0.12	0.30 ± 0.00
A39	8.43 ± 0.15	0.18 ± 0.00
A40	24.50 ± 0.27	0.22 ± 0.00
A41	11.75 ± 0.16	0.43 ± 0.00
A42	6.78 ± 0.34	0.22 ± 0.00
A43	10.15 ± 0.27	0.35 ± 0.00
A44	18.20 ± 0.37	0.50 ± 0.01
A45	6.56 ± 0.19	0.15 ± 0.00
A46	6.91 ± 0.13	0.15 ± 0.01

**Tabela 2.** Parâmetros analisados de índice de peróxido e ácidos graxos livres para amostras comercializadas azeite de oliva (n = 13)

<b>Amostra</b>	<b>Índice de peróxido (mEq/kg)</b>	<b>Ácidos graxos livres (g/100g)</b>
B1	1.18 ± 0.06	0.17 ± 0.00
B1	1.18 ± 0.06	0.17 ± 0.00
B2	6.30 ± 0.17	0.26 ± 0.01
B3	4.74 ± 0.32	0.20 ± 0.00
B4	5.65 ± 0.07	0.34 ± 0.00
B5	3.61 ± 0.19	0.83 ± 0.00
B6	4.64 ± 0.32	0.36 ± 0.01
B7	5.86 ± 0.06	0.35 ± 0.00
B8	3.94 ± 0.06	0.08 ± 0.00
B9	3.52 ± 0.06	0.26 ± 0.00
B10	3.27 ± 0.19	0.64 ± 0.01
B11	5.13 ± 0.42	0.22 ± 0.00
B12	8.22 ± 0.10	0.13 ± 0.00
B13	1.47 ± 0.20	0.24 ± 0.00

**Tabela 3.** Parâmetros analisados de índice de peróxido e ácidos graxos livres para amostras comercializadas óleo composto (n = 17)

<b>Amostra</b>	<b>Índice de peróxido (mEq/kg)</b>	<b>Ácidos graxos livres (g/100g)</b>
C1	3.26 ± 0.13	0.17 ± 0.00
C2	2.04 ± 0.06	0.13 ± 0.00
C3	2.00 ± 0.00	0.10 ± 0.00
C4	4.93 ± 0.33	0.24 ± 0.00
C5	3.18 ± 0.01	0.21 ± 0.00
C6	3.27 ± 0.39	0.28 ± 0.00
C7	1.95 ± 0.06	0.11 ± 0.00
C8	3.54 ± 0.25	0.16 ± 0.00
C9	2.36 ± 0.13	0.35 ± 0.00
C10	1.87 ± 0.06	0.19 ± 0.00

C11	2.40 ± 0.32	0.38 ± 0.00
C12	3.86 ± 0.06	0.46 ± 0.01
C13	3.31 ± 0.25	0.42 ± 0.01
C14	3.36 ± 0.20	0.48 ± 0.00
C15	2.51 ± 0.07	0.30 ± 0.00
C16	4.65 ± 0.00	0.21 ± 0.00
C17	1.66 ± 0.06	0.23 ± 0.00

**Tabela 4.** Parâmetros analisados de extinção específica para amostras comercializadas como azeite de oliva extra virgem (n = 46)

Amostra	Extinção específica		
	K 232	K270	ΔK
A1	2.07 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0
A2	2.03 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0
A3	2.34 ± 0.00	0.17 ± 0.01	0
A4	1.94 ± 0.05	0.20 ± 0.01	0
A5	6.53 ± 0.13	0.87 ± 0.03	0
A6	6.00 ± 0.02	2.07 ± 0.06	0.17 ± 0.00
A7	3.64 ± 0.04	1.39 ± 0.04	0.13 ± 0.00
A8	4.01 ± 0.05	2.68 ± 0.03	0.35 ± 0.00
A9	5.11 ± 0.05	2.42 ± 0.04	0.27 ± 0.00
A10	2.38 ± 0.01	0.19 ± 0.00	0
A11	1.94 ± 0.05	0.14 ± 0.00	0
A12	2.03 ± 0.03	0.20 ± 0.01	0
A13	2.38 ± 0.03	0.24 ± 0.00	0
A14	6.86 ± 0.03	0.87 ± 0.03	0
A15	4.58 ± 0.06	1.60 ± 0.02	0.15 ± 0.00
A16	4.77 ± 0.04	2.20 ± 0.04	0.23 ± 0.00
A17	4.19 ± 0.04	2.00 ± 0.02	0.24 ± 0.00
A18	6.45 ± 0.05	2.25 ± 0.03	0.21 ± 0.00
A19	3.78 ± 0.06	2.15 ± 0.02	0.26 ± 0.00
A20	2.63 ± 0.09	0.22 ± 0.00	0
A21	6.44 ± 0.15	0.96 ± 0.01	0
A22	2.14 ± 0.07	0.16 ± 0.00	0
A23	2.26 ± 0.06	0.13 ± 0.00	0
A24	2.46 ± 0.04	0.22 ± 0.01	0.01 ± 0.00
A25	1.88 ± 0.01	0.13 ± 0.00	0
A26	1.88 ± 0.01	0.14 ± 0.00	-0.01
A27	1.90 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.01 ± 0.00
A28	2.51 ± 0.07	0.21 ± 0.00	0
A29	4.44 ± 0.04	1.70 ± 0.02	0.15 ± 0.00
A30	1.87 ± 0.01	0.13 ± 0.00	0
A31	3.90 ± 0.05	0.32 ± 0.00	0.01 ± 0.00

A32	2.19 ± 0.04	0.18 ± 0.01	0
A33	2.05 ± 0.02	0.18 ± 0.00	0
A34	2.16 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0
A35	4.39 ± 0.03	2.27 ± 0.01	0.28 ± 0.01
A36	2.3 ± 0.04	0.18 ± 0.00	0
A37	6.85 ± 0.10	3.26 ± 0.05	0.38 ± 0.01
A38	2.39 ± 0.07	0.15 ± 0.00	0
A39	2.10 ± 0.01	0.17 ± 0.00	0
A40	3.84 ± 0.02	0.18 ± 0.00	0
A41	2.49 ± 0.04	0.18 ± 0.01	0
A42	2.00 ± 0.01	0.15 ± 0.00	0
A43	2.26 ± 0.07	0.17 ± 0.00	0
A44	2.78 ± 0.01	0.22 ± 0.00	0
A45	1.82 ± 0.02	0.11 ± 0.00	0
A46	1.91 ± 0.06	0.16 ± 0.00	0

**Tabela 5.** Parâmetros analisados de extinção específica para amostras comercializadas como azeite de oliva (n = 13)

Amostra	Extinção específica		
	K 232	K270	ΔK
B1	4.95 ± 0.09	0.82 ± 0.01	0
B2	2.24 ± 0.04	0.24 ± 0.01	0.01 ± 0.00
B3	2.23 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.02 ± 0.00
B4	2.29 ± 0.05	0.52 ± 0.01	0.04 ± 0.00
B5	2.52 ± 0.01	0.58 ± 0.00	0.04 ± 0.00
B6	2.04 ± 0.03	0.47 ± 0.00	0.04 ± 0.00
B7	2.30 ± 0.02	0.40 ± 0.00	0.02 ± 0.00
B8	6.54 ± 0.15	3.08 ± 0.02	0.37 ± 0.01
B9	5.41 ± 0.13	1.33 ± 0.05	0.01 ± 0.00
B10	4.32 ± 0.02	1.28 ± 0.00	0.10 ± 0.00
B11	3.09 ± 0.00	1.26 ± 0.02	0.19 ± 0.00
B12	2.60 ± 0.03	0.49 ± 0.00	0.04 ± 0.00
B13	3.98 ± 0.08	1.58 ± 0.02	0.21 ± 0.01

**Tabela 6.** Parâmetros analisados de extinção específica para amostras comercializadas como óleo composto (n = 17)

Amostra	Extinção específica		
	K 232	K270	ΔK
C2	1.99 ± 0.02	0.94 ± 0.01	0.32 ± 0.01
C3	4.05 ± 0.00	2.29 ± 0.01	0.25 ± 0.00
C4	3.78 ± 0.00	2.10 ± 0.01	0.22 ± 0.00
C5	6.14 ± 0.02	2.71 ± 0.02	0.29 ± 0.01
C6	4.20 ± 0.01	1.76 ± 0.03	0.14 ± 0.00
C7	3.91 ± 0.11	1.58 ± 0.04	0.15 ± 0.00

C8	5.53 ± 0.02	1.92 ± 0.01	0.15 ± 0.00
C9	3.92 ± 0.01	0.97 ± 0.02	0.06 ± 0.00
C10	4.31 ± 0.06	1.11 ± 0.03	0.07 ± 0.00
C11	3.93 ± 0.02	1.78 ± 0.03	0.20 ± 0.00
C12	4.54 ± 0.06	1.79 ± 0.04	0.18 ± 0.00
C13	4.54 ± 0.07	1.40 ± 0.03	0.12 ± 0.00
C14	4.73 ± 0.04	1.55 ± 0.02	0.11 ± 0.00
C15	3.38 ± 0.02	1.17 ± 0.01	0.11 ± 0.00
C16	3.52 ± 0.01	0.47 ± 0.00	0
C17	3.65 ± 0.11	1.09 ± 0.04	0.09 ± 0.00

**Tabela 7.** Parâmetros analisados de estigmastadienos para amostras comercializadas como azeite de oliva extra virgem (n = 13)

Amostras	Estigmastadienos (mg/kg)	Amostras	Estigmastadienos (mg/kg)
A1	n.d.	A24	n.d.
A2	n.d.	A25	n.d.
A3	n.d.	A26	n.d.
A4	n.d.	A27	1.41 ± 0.02
A5	13.01 ± 0.33	A28	n.d.
A6	5.87 ± 0.17	A29	2.48 ± 0.01
A7	4.68 ± 0.84	A30	n.d.
A8	9.04 ± 0.24	A31	n.d.
A9	10.73 ± 0.55	A32	n.d.
A10	n.d.	A33	n.d.
A11	n.d.	A34	n.d.
A12	n.d.	A35	7.41 ± 0.32
A13	n.d.	A36	n.d.
A14	13.09 ± 0.45	A37	13.09 ± 0.31
A15	6.33 ± 0.27	A38	n.d.
A16	7.28 ± 0.50	A39	n.d.
A17	6.80 ± 0.33	A40	n.d.
A18	5.85 ± 0.07	A41	n.d.
A19	10.12 ± 0.32	A42	n.d.
A20	n.d.	A43	n.d.
A21	12.13 ± 0.12	A44	n.d.
A22	0.12 ± 0.00	A45	n.d.
A23	0.09 ± 0.00	A46	n.d.

**Tabela 8.** Parâmetros analisados de estigmastadienos para amostras comercializadas como azeite de oliva (n = 13)

<b>Amostras</b>	<b>Estigmastadienos (mg/kg)</b>
B1	38.77
B2	44.67
B3	11.01
B4	7.77
B5	97.27
B6	25.86
B7	11.75
B8	10.69
B9	39.84
B10	136.09
B11	34.35
B12	3.57
B13	39.71

nd = não detectado

**Tabela 9.** Parâmetros analisados de estigmastadienos para amostras comercializadas como óleo composto (n = 17)

<b>Amostras</b>	<b>Estigmastadienos (mg/kg)</b>
C1	2.57
C2	11.37
C3	5.61
C4	11.46
C5	8.19
C6	8.47
C7	11.59
C8	18.58
C9	12.45
C10	23.92
C11	6.64
C12	11.33
C13	13.21
C14	2.94
C15	8.14
C16	26.39
C17	6.05

nd = não detectado



**Tabela 10.** Parâmetros analisados de composição em ácidos graxos para amostras comercializadas como azeite de oliva extra virgem (n = 46)

Composição em ácidos graxos (g/100g)															
Amostras	C 14:0	C 16:0	C 16:1	C 17:0	C 17:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0	C 20:1	C 22:0	C 24:0	C 18:1t	C 18:2t + C 18:3t
A1	0	10.98	0.87	0.07	0.12	2.58	71.87	7.30	0.58	0.34	0.24	0.10	0	0	0
A2	0	11.89	0.94	0.06	0.10	3.08	69.41	8.40	0.63	0.41	0.25	0.11	0	0	0
A3	0	14.12	1.30	0.08	0.16	1.95	63.92	12.21	0.75	0.37	0.30	0.11	0.06	0	0
A4	0	11.31	0.75	0	0.08	2.49	73.77	5.31	0.69	0.43	0.30	0.14	0	0	0
A5	0.08	10.42	0.11	0.08	0	3.66	27.01	46.24	3.85	0.37	0.65	0.46	0.16	0	1.38
A6	0.09	10.80	0.13	0.09	0	3.63	29.32	44.78	4.28	0.40	0	0.52	0.20	0.07	0.54
A7	0.07	10.44	0.12	0.08	0	3.56	26.76	47.32	5.73	0.37	0	0.45	0.16	0	0.22
A8	0.07	10.30	0.11	0.08	0	3.12	26.52	48.64	5.36	0.33	0	0.46	0.17	0	0.19
A9	0.07	10.32	0.11	0.09	0	3.86	24.40	49.42	5.29	0.38	0	0.45	0.16	0	0.48
A10	0	13.48	1.37	0	0.11	2.73	66.38	9.71	0.63	0.40	0.23	0.11	0	0	0
A11	0	14.36	1.29	0.11	0.21	1.79	64.51	11.54	0.61	0.12	0.28	0.12	0	0	0
A12	0	10.51	0.83	0	0.10	3.34	73.90	5.11	0.58	0.38	0.23	0.11	0	0	0
A13	0	10.27	0.76	0	0.10	2.80	72.94	5.56	0.57	0.38	0.24	0.12	0.06	0	0
A14	0.08	10.76	0.13	0.08	0	3.59	26.13	46.45	3.99	0.37	0	0.46	0.16	0.14	1.61
A15	0.09	10.75	0.20	0.08	0	3.58	27.86	45.86	4.86	0.38	0	0.42	0.15	0	0.59
A16	0.07	10.39	0.12	0.09	0	3.86	27.99	45.90	4.75	0.39	0	0.48	0.16	0	0.60
A17	0.07	10.44	0.15	0.08	0	3.59	28.16	46.08	5.19	0.37	0	0.44	0.16	0.10	0.32
A18	0.08	10.68	0.12	0.09	0	3.59	29.84	44.75	4.14	0.40	0	0.51	0.20	0.11	0.50
A19	0.07	10.54	0.16	0.09	0	3.81	29.88	43.92	4.19	0.48	0	0.50	0.19	0	1.72
A20	0	16.97	2.03	0	0.07	2.35	55.93	16.30	0.89	0.41	0	0.12	0	0	0
A21	0.08	10.35	0.11	0.08	0	3.65	27.02	46.39	4.11	0.37	0	0.46	0.16	0	1.32
A22	0	14.22	1.31	0.07	0.11	2.18	62.82	12.96	0.96	0.37	0	0.11	0.06	0	0
A23	0	14.21	1.30	0.07	0.11	2.20	62.86	12.93	0.96	0.37	0	0.11	0.06	0	0
A24	0	12.72	1.20	0.10	0.17	2.19	68.98	8.49	0.80	0.34	0	0.11	0	0	0
A25	0	10.09	0.77	0	0.08	3.98	74.36	4.28	0.77	0.38	0	0.10	0	0	0
A26	0	10.06	0.73	0	0.10	3.14	74.91	4.72	0.87	0.37	0	0.10	0	0	0
A27	0	11.24	0.88	0.08	0.12	2.93	69.17	9.04	0.99	0.38	0	0.12	0.06	0	0

Amostras	C 14:0	C 16:0	C 16:1	C 17:0	C 17:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0	C 20:1	C 22:0	C 24:0	C 18:1t	C 18:2t + C 18:3t
A28	0	11.45	0.79	0.10	0.14	3.22	71.93	5.82	0.91	0.42	0	0.11	0.06	0	0
A29	0	11.29	0.31	0.10	0	4.01	27.55	44.69	5.76	0.36	0	0.33	0.11	0	0.34
A30	0	10.94	0.86	0.08	0.12	3.31	72.70	5.61	0.91	0.39	0	0.11	0	0	0
A31	0	11.85	0.98	0	0.10	2.78	69.48	7.91	0.91	0.43	0	0.12	0.07	0	0
A32	0	11.49	0.94	0.09	0.13	3.15	71.34	6.19	0.88	0.41	0	0.11	0.06	0	0
A33	0	9.98	0.76	0	0.09	3.28	74.47	4.34	0.87	0.36	0	0.10	0	0	0
A34	0	9.74	0.69	0	0.08	3.55	75.40	4.23	0.78	0.37	0	0.10	0	0	0
A35	0.07	10.54	0.13	0.08	0	3.69	27.79	46.31	5.23	0.39	0	0.47	0.16	0	0.32
A36	0	11.14	0.85	0.07	0.10	3.06	70.84	7.51	0.86	0.40	0	0.11	0	0	0
A37	0.07	10.43	0.13	0.09	0	3.79	28.83	44.60	3.70	0.40	0	0.49	0.19	0	1.41
A38	0	11.24	0.93	0.06	0.11	3.34	70.79	7.16	0.88	0.38	0	0.11	0	0	0
A39	0	9.84	0.72	0.06	0.10	3.48	74.74	4.82	0.80	0.35	0	0.10	0	0	0
A40	0	8.86	0.54	0.14	0.20	3.21	73.51	7.10	0.90	0.42	0	0.11	0	0	0
A41	0	13.25	1.14	0.07	0.15	1.75	66.31	10.89	1.03	0.35	0	0.11	0.06	0	0
A42	0	10.83	0.79	0.07	0.11	3.19	72.45	6.19	0.86	0.39	0	0.11	0	0	0
A43	0	11.13	0.85	0.08	0.13	3.07	71.10	7.08	0.81	0.38	0	0.11	0	0	0
A44	0	11.07	0.76	0.06	0.09	2.65	72.62	6.19	0.94	0.44	0	0.14	0.06	0	0
A45	0	13.28	1.23	0.08	0.17	1.96	68.19	8.69	0.91	0.37	0	0.11	0.06	0	0
A46	0	9.27	0.63	0.09	0.13	3.09	75.28	4.97	0.96	0.38	0	0.11	0	0	0

**Tabela 11.** Parâmetros analisados de composição em ácidos graxos para amostras comercializadas como azeite de oliva (n = 13)

Composição em ácidos graxos (g/100g)															
Amostras	C 14:0	C 16:0	C 16:1	C 17:0	C 17:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0	C 20:1	C 22:0	C 24:0	C 18:1t	C 18:2t + C 18:3t
B1	0.06	10.19	0.12	0.09	0	3.79	31.69	42.21	4.43	0	0.22	0	0.17	0.54	1.55
B2	0	9.93	0.73	0	0.09	3.63	74.34	5.04	0.80	0.38	0	0.11	0	0.07	0
B3	0	10.14	0.73	0.06	0.09	3.73	74.22	5.07	0.76	0.39	0	0.11	0	0	0
B4	0	10.70	0.76	0.08	0.11	3.58	72.03	6.68	0.80	0.41	0	0.11	0	0	0
B5	0	10.06	0.70	0.07	0.11	3.34	72.46	6.69	0.84	0.41	0	0.15	0.07	0.14	0
B6	0	10.40	0.72	0.07	0.10	3.46	72.62	6.43	0.82	0.41	0	0.12	0	0.06	0
B7	0	10.23	0.72	0.06	0.10	3.60	72.99	6.21	0.78	0.41	0	0.12	0	0.00	0
B8	0.07	10.18	0.09	0.09	0	3.86	27.00	46.83	4.41	0.39	0.49	0.51	0.20	0.00	0.87
B9	0.09	10.86	0.16	0.08	0	3.69	27.51	46.25	4.30	0.39	0.46	0.44	0.15	0.00	0.76
B10	0	11.13	0.79	0.07	0.11	2.81	68.32	10.06	0.98	0.41	0	0.18	0.08	0.28	0.14
B11	0	7.29	0.37	0	0.06	2.57	70.86	12.10	0.86	0.32	0	0.51	0.20	0.09	0.12
B12	0	12.34	1.16	0	0.09	3.27	67.65	9.45	0.76	0.40	0	0.11	0	0.00	0.08
B13	0.11	11.17	0.11	0.08	0	3.68	25.40	47.80	5.11	0.38	0.35	0.45	0.15	0.00	0.46

**Tabela 12.** Parâmetros analisados de composição em ácidos graxos para amostras comercializadas como óleo composto (n = 17)

Composição em ácidos graxos (g/100g)															
Amostras	C 14:0	C 16:0	C 16:1	C 17:0	C 17:1	C 18:0	C 18:1	C 18:2	C 18:3	C 20:0	C 20:1	C 22:0	C 24:0	C 18:1t	C 18:2t + C 18:3t
C1	0.06	11.03	0.29	0.08	0	3.53	30.94	43.13	4.86	0.36	0.22	0.39	0.16	0	0.26
C2	0.07	10.94	0.27	0.08	0	3.48	29.22	44.84	4.67	0.39	0.33	0.43	0.16	0	0.39
C3	0.07	10.68	0.22	0.08	0	3.21	27.72	46.91	5.19	0.34	0.18	0.41	0.16	0	0.23
C4	0.07	11.27	0.38	0.07	0.06	2.92	30.22	44.39	5.01	0.34	0.09	0.43	0.16	0	0.11
C5	0.07	10.31	0.12	0.09	0	3.80	30.50	43.45	3.90	0.39	0.49	0.48	0.19	0	1.12
C6	0.07	10.66	0.12	0.09	0	3.96	26.86	46.61	5.41	0.41	0.22	0.46	0.16	0	0.32
C7	0.08	10.30	0.08	0.09	0	4.07	24.77	48.75	5.54	0.39	0.23	0.46	0.17	0.06	0.37
C8	0.09	10.73	0.09	0.08	0	3.66	25.57	48.15	4.87	0.39	0.33	0.49	0.18	0	0.60
C9	0.07	10.56	0.16	0.09	0	3.74	26.09	47.14	5.67	0.38	0.33	0.44	0.14	0	0.42
C10	0.07	10.41	0.11	0.09	0	3.77	25.77	47.86	5.42	0.39	0.32	0.44	0.16	0	0.44
C11	0.14	10.85	0.13	0.09	0	4.23	27.57	44.80	5.08	0.40	0.32	0.47	0.16	0.54	0.46
C12	0.07	10.46	0.12	0.08	0	0.08	27.19	46.56	5.16	0.38	0.34	0.46	0.16	0	0.41
C13	0.07	10.65	0.18	0.08	0	3.63	27.50	46.21	4.86	0.38	0.43	0.45	0.14	0	0.59
C14	0.07	10.88	0.20	0.08	0	3.59	27.45	46.34	5.16	0.39	0	0.45	0.16	0	0.33
C15	0.07	10.37	0.11	0.08	0	3.51	26.25	47.91	5.97	0.34	0	0.42	0.15	0	0.17
C16	0.07	10.14	0.11	0.09	0	3.48	28.81	45.54	5.33	0.36	0.29	0.43	0.14	0.06	0.41
C17	0.07	10.35	0.11	0.09	0	3.85	24.62	48.58	5.95	0.38	0	0.45	0.15	0	0.36