

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E
BIOTECNOLÓGICOS

JAQUELINE ALICE LORSCHIEDER

**PREPARAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS A PARTIR DO
ÓLEO DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum* L.) E AVALIAÇÃO DE SUA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA**

DISSERTAÇÃO

TOLEDO

2017

JAQUELINE ALICE LORSCHIEDER

**PREPARAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS A PARTIR DO
ÓLEO DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum* L.) E AVALIAÇÃO DE SUA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do título de “Mestre em Processos químicos e biotecnológicos” - Área de concentração: Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Clayton Antunes Martin

TOLEDO

2017

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E
BIOTECNOLÓGICOS

**PREPARAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS A PARTIR DO
ÓLEO DE LINHAÇA (*Linum usitatissimum* L.) E AVALIAÇÃO DE SUA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA**

por

Jaqueline Alice Lorscheider

Orientador: Prof. Dr. Clayton Antunes Martin (UTFPR)

Esta dissertação foi apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos – Área de Concentração: Biotecnologia, do Programa de Pós-Graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos – PPGQB – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, às 14h do dia 29 de setembro de 2017. O trabalho foi aprovado pela Banca Examinadora, composta pelos professores doutores:

Prof. Dr. Clayton Antunes Martin
(Presidente – UTFPR)

Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara
(UTFPR)

Prof. Dra. Maria Cristina Milinsk
(UFPR)

Visto da coordenação:

Prof. Dr. Gilberto Gonçalves da Cunha
(Coordenador do PPGQB)

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao meu orientador, Professor Dr. Clayton Antunes Martin, pela disponibilidade, dedicação e paciência em guiar-me na realização deste trabalho mesmo com todas as dificuldades que tive. À Professora Dra. Tatiana Tiومان que me auxiliou com as questões de microbiologia. Vocês sempre serão referências de postura profissional para minha vida.

Ao mesmo esposo, Cid, por todo amor, companheirismo e força que recebi durante esta etapa.

Aos meus pais, Lino e Elisabete, por sempre me apoiarem e me amarem.

Agradeço aos professores Alex Torquato e Paulo Bitencourt, da UTFPR Medianeira, por disponibilizarem seu tempo e equipamentos para análises cromatográficas e espectroscópicas deste trabalho.

Agradeço aos técnicos dos laboratórios, Carol, Dani, Bruna, Rafael, que sempre me ajudaram.

Aos amigos que conheci no mestrado, em especial à Daieni, Indiara, Claudia, Patricia e Érica, que sempre me apoiaram e incentivaram.

Aos professores deste Programa de Mestrado.

RESUMO

LORSCHIEDER, Jaqueline A. **Preparação de ácidos graxos conjugados a partir do óleo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e avaliação de sua atividade antioxidante e antimicrobiana**, 2017. Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2017.

A linhaça é a semente da planta do linho (*Linum usitatissimum* L.), oleaginosa pertencente à família das Lináceas, fonte de ácidos graxos poli-insaturados, ácido alfa-linolênico e ácido linoleico. Estes ácidos graxos podem passar por etapas de isomerização para produção de ácidos graxos conjugados, formando respectivamente ácido alfa-linolênico conjugado (CLNA) e ácido linoleico conjugado (CLA). O objetivo deste estudo foi otimizar a produção de CLNA por meio da isomerização alcalina do óleo de linhaça e avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* das misturas formadas de CLA e CLNA. A isomerização alcalina é um método eficaz para produção de CLNA. A partir do óleo de linhaça, preparou-se ésteres etílicos que posteriormente passaram pela etapa de isomerização, realizada por meio de um planejamento experimental composto de 4 pontos fatoriais, 4 repetições do ponto central e 4 pontos axiais. Os ensaios foram realizados de forma aleatória. Obtiveram-se ésteres metílicos para análise por cromatografia gasosa. A quantificação dos ácidos graxos foi realizada utilizando o heptadecanoato de metila (17:0) como padrão interno. Determinou-se o grau de isomerização (GI) por meio do da razão do teor de ácido graxo isomerizado pelo teor inicial do ácido graxo no óleo de linhaça não isomerizado. A confirmação da isomerização dos ácidos linoleico e alfa-linolênico do óleo de linhaça foi efetuada por meio de análises espectroscópicas nas regiões do ultravioleta e do infravermelho. A atividade antioxidante foi verificada pelo método ABTS. A atividade antimicrobiana foi testada contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Salmonella typhi* (ATCC 06539) e *Escherichia coli* (ATCC 10536), pelo método de microdiluição seriada, para determinar-se a concentração inibitória mínima e bactericida. Os resultados da espectroscopia no infravermelho apresentaram diversas bandas características de ligações duplas conjugadas. A comparação dos espectros UV entre amostras isomerizadas e óleo de linhaça comprovou que houve a formação de ácidos graxos conjugados. As misturas de isômeros formados apresentaram atividade antioxidante, sendo o maior resultado obtido por um ponto axial, com equivalente trolox de 10,33 μmol por grama de amostra. Em relação à atividade bactericida, algumas amostras apresentaram atividade, principalmente para as gram-positivas. A isomerização do óleo de linhaça representa uma alternativa para a preparação de misturas de isômeros conjugados dos ácidos linoleico e alfa-linolênico, pois utiliza um sistema reacional e uma metodologia de isomerização que são relativamente simples e de baixo custo.

Palavras-chave: Ácidos graxos conjugados. CLA. CLNA. Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

LORSCHIEDER, Jaqueline A. **Preparation of conjugated fatty acids from linseed oil (*Linum usitatissimum* L.) and evaluation of its antioxidant and antimicrobial activity.** 2017. Mestrado em Processos Químicos e Biotecnológicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, 2017.

Flaxseed is the seed of the *Linum usitatissimum* L., an oleaginous plant belonging to the *Linaceae* family, a source of polyunsaturated fatty acids, alpha-linolenic acid and linoleic acid. These fatty acids can pass through stages of isomerization to produce conjugated fatty acids, forming respectively conjugated alpha-linolenic acid (CLNA) and conjugated linoleic acid (CLA). The objective of this study was to optimize CLNA production through the alkaline isomerization of linseed oil and to evaluate the antioxidant and antimicrobial activity in vitro of mixtures formed of CLA and CLNA. Alkaline isomerization is an effective method for CLNA production. From the flax oil, ethyl esters were prepared and subsequently passed through the isomerization stage, using an experimental design composed of 4 factorial points, 4 repetitions of the central point and 4 axial points. The assays were performed at random. Methyl esters were obtained for analysis by gas chromatography. Fatty acid quantification was performed using methyl heptadecanoate (17:0) as an internal standard. The degree of isomerization (GI) was determined by the ratio of the fatty acid content isomerized by the initial fatty acid content in non-isomerized linseed oil. The confirmation of the isomerization of linoleic and alpha-linolenic acids of linseed oil was carried out by means of spectroscopic analyzes in the ultraviolet and infrared regions. The antioxidant activity was verified by the ABTS method. The antimicrobial activity was tested against *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Salmonella typhi* (ATCC 06539) and *Escherichia coli* (ATCC 10536) by the serial microdilution method to determine the minimum inhibitory and bactericidal concentration. The results of infrared spectroscopy showed several bands characteristic of conjugated double bonds. Comparison of the UV spectra between isomerized and flaxseed samples confirmed the formation of conjugated fatty acids. The mixtures of isomers formed showed antioxidant activity, the highest result being obtained by an axial point, with a trolox equivalent of 10.33 μmol per gram of sample. In relation to the bactericidal activity, some samples presented activity, mainly for the gram-positive ones. The isomerization of linseed oil represents an alternative for the preparation of mixtures of conjugated isomers of linoleic and alpha-linolenic acids, since it uses a reaction system and a methodology of isomerization that are relatively simple and inexpensive.

Keywords: Conjugated fatty acids. CLA. CLNA. Antioxidant activity. Antimicrobial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química de um ácido graxo saturado (1) e de um poli-insaturado (2).	17
Figura 2 – Estrutura de um triglicerídeo.	18
Figura 3 – Estrutura química de um CLA (18:3-9c,11t) (1) e de um CLNA (18:3-9c,11t,13c) (2).	19
Figura 4 – Esquema de formação de dois isômeros CLA por isomerização alcalina do ácido linoleico.....	22
Figura 5 – Reação de esterificação do ácido carboxílico	23
Figura 6 – Mecanismo da reação de esterificação de ácidos graxos por catálise ácida	23
Figura 7 - Fluxograma dos métodos realizados	29
Figura 8 – Espectros UV-Vis dos EMAG de óleo de linhaça isomerizado (-1, -1) e não isomerizado.	42
Figura 9 – Espectros no infravermelho para ésteres metílicos: a) óleo de linhaça; b) óleo de linhaça isomerizado (-1, -1); c) óleo de linhaça isomerizado (-1, 1); d) óleo de linhaça isomerizado (0,0); e) óleo de linhaça isomerizado (1, -1); f) óleo de linhaça isomerizado (1, 1).	43
Figura 10 – Espectros no infravermelho para ésteres metílicos do óleo de linhaça: a) não isomerizado; i) isomerizado (0, -1,414); j) isomerizado (-1,414, 0); k) isomerizado (1,414, 0); l) isomerizado (0, 1,414).	45
Figura 11 – Cromatograma de ésteres metílicos óleo de linhaça isomerizado a 135 °C com 15 % de catalisador (-1, -1); (1) 16:0; (2) 17:0 (padrão interno); (3) 18:0; (4) 18:1n-9; (5) 18:1n-7; (6) 18:2n-6; (7) 18:3 n-3; (8) 18:2 9c, 11t; (9) 18:2 10t, 12c; (10) X1 (não identificado).	47
Figura 12 – Cromatograma de ésteres metílicos óleo de linhaça isomerizado a 160 °C com 20 % de catalisador - (0, 0); (1) 16:0; (2) 17:0 (padrão interno); (3) 18:0; (4) 18:1n-9; (5) 18:1n-7; (6) 18:2n-6; (7) 18:2 9c,11t; (8) 18:2 10t,12c; (9) X2 (não identificado); (10) X1 (não identificado); (11) (não identificado); (12) X3 (não identificado).	48
Figura 13 – Cromatograma de ésteres metílicos óleo de linhaça isomerizado a 160 °C com 20 % de catalisador (0, 0) após fracionamento com ureia – fração dos cristais: (1) 16:0; (2) 17:0 (padrão interno); (3) 18:0; (4) 18:1n-9; (5) 18:1n-7; (6) 18:2n-6; (7) 18:3 n-3; (8) 18:2 9c,11t; (9) 18:2 10t,12c; (10) X1(não identificado); (11) (não identificado); (12) X3 (não identificado).	50
Figura 14 – Cromatograma de ésteres metílicos óleo de linhaça isomerizado a 160 °C com 20 % de catalisador - (0, 0) após fracionamento com ureia – fração líquida(1) 16:0; (2) 17:0 (padrão interno);(3) 18:0; (4) 18:1n-9; (5) 18:1n-7;(6) 18:2n-6; (7) 18:3 n-3;(8) 18:2 9c,11t; (9) 18:2 10t,12c; (10) X2 (não identificado); (11) X1 (não identificado); (12) não identificado; (13) X3 (não identificado).....	50
Figura 15 – Superfície de resposta para grau de isomerização do ácido 18:2n-6.....	53
Figura 16 – Superfície de resposta para grau de isomerização 18:3n-3.	55

Figura 17 – Superfície de resposta para concentração total de CLA (mg g^{-1}).....	56
Figura 18 – Superfície de resposta para concentração do isômero X1 em mg g^{-1}	57
Figura 19 – Superfície de resposta para concentração do isômero X2 em mg g^{-1}	59
Figura 20 – Superfície de resposta para concentração do isômero X3 em mg g^{-1}	60
Figura 21 – Curva de calibração em termos de equivalente trolox utilizada na determinação da atividade antioxidante.	61
Figura 22 – Superfície de resposta para atividade antioxidante ($\mu\text{mol g}^{-1}$).	64
Figura 23 – Confirmação de atividade inibitória com corante CTT	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Distribuição de ácidos graxos em alguns óleos vegetais	18
Tabela 2 – Teor de CLA em alguns alimentos	20
Tabela 3 – Planejamento fatorial utilizado no experimento	31
Tabela 4 – Graus de isomerização dos ácidos 18:2n-6 e 18:3n-3	46
Tabela 5 – Concentração dos principais ácidos graxos do óleo de linhaça isomerizado (0, 0) e após o seu fracionamento com ureia.....	49
Tabela 6 – Efeitos para grau de isomerização do ácido linoleico.....	53
Tabela 7 – Efeitos para grau de isomerização 18:3n-3.....	54
Tabela 8 – Efeitos para formação de CLA	56
Tabela 9 – Efeitos para formação do isômero X1	57
Tabela 10 – Efeitos para formação do isômero X2	58
Tabela 11 – Efeitos para formação do isômero X3	59
Tabela 12 – Atividade antioxidante pelo método ABTS para o óleo de linhaça isomerizado e não isomerizado.....	62
Tabela 13 – Efeitos para atividade antioxidante.....	63
Tabela 14 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em mg mL ⁻¹	65

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AAL: ácido alfa-linolênico
ABTS: 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
AG: ácidos graxos
AGL: ácidos graxos livres
BaSO₄: sulfato de bário
BHA: hidroxí anisol butilado
BHT: hidroxí tolueno butilado
c: cis
cm: centímetro
CBM: Concentração Bactericida Mínima
CIM: Concentração Inibitória Mínima
CLA: ácido linoleico conjugado
CLNA: ácido alfa-linolênico conjugado
CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute
CPT: carnitina palmitoil-transferase
CTT: cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio
DMSO: dimetilsulfoxido
DPPH: 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EEAG: ésteres etílicos de ácidos graxos
EMAG: ésteres metílicos de ácidos graxos
g: gramas
GI: grau de isomerização
HCl: ácido clorídrico
KOH: hidróxido de potássio
L: litro
LHS: lipase hormônio-sensível
m: massa
mg: miligrama
MH: Mueller Hinton
min: minutos
mL: mililitro
NaOH: hidróxido de sódio

NaOCH₃: metóxido de sódio

nm: nanômetros

s: segundos

t: trans

TBHQ: hidroquinona de terc-butilo

UFC: Unidades Formadoras de Colônia

UV-Vis: ultravioleta-visível

v: volume

μ: micro

°C: graus Celsius

n-3: ômega 3

n-6: ômega 6

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 ÁCIDOS GRAXOS.....	17
3.2 ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS.....	18
3.3 OBTENÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS	20
3.4 ASPECTOS ANALÍTICOS DE ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS	22
3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS	25
3.6 EFEITOS FISIOLÓGICOS DOS ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 MATERIAIS	29
4.2 MÉTODOS	29
4.2.1. Preparação de ésteres etílicos a partir do óleo de linhaça	30
4.2.2 Isomerização dos ésteres etílicos de ácidos graxos obtidos a partir do óleo de linhaça.....	30
4.2.3 Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos para análises cromatográficas.....	32
4.2.4. Identificação e quantificação dos isômeros dos ácidos linoleico e alfa- linolênico	32
4.2.5 Determinação do grau de isomerização	33
4.2.6 Confirmação da isomerização	34
4.2.6.1 Espectroscopia no ultravioleta.....	34
4.2.6.2 Espectroscopia no infravermelho	34
4.2.7 Hidrólise dos triacilgliceróis do óleo de linhaça	35
4.2.8 Fracionamento de ácidos graxos pela formação de adutos com ureia	35
4.2.9. Avaliação da atividade antioxidante	36
4.2.10. Avaliação da atividade antimicrobiana	37
4.2.10.1 Padrão de turbidez para a preparação dos inóculos	37
4.2.10.2 Preparo e padronização dos microrganismos	38
4.2.10.3 Preparo dos ácidos graxos para análises antimicrobianas.....	38
4.2.10.4 Preparo do Controle positivo	39
4.2.10.5 Preparo do Controle do DMSO	39
4.2.10.6 Teste da Concentração Inibitória Mínima	39
4.2.10.7. Teste de Concentração Bactericida Mínima.....	40
4.2.11. Análise Estatística	41

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA.....	42
5.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO.....	43
5.3 GRAU DE ISOMERIZAÇÃO	46
5.3.1 Grau de isomerização do ácido linoleico	52
5.3.2 Grau de isomerização do ácido alfa-linolênico	54
5.3.3 Formação de CLA	55
5.3.4 Formação do isômero X1	57
5.3.5 Formação do isômero X2	58
5.3.6 Formação do isômero X3	59
5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	60
5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	64
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
APÊNDICE A – CROMATOGRAMA DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÓLEO DE LINHAÇA ISOMERIZADO COM 20 % DE CATALISADOR A 125 °C (0, -1,41).....	69
APÊNDICE B – CROMATOGRAMA DE ÉSTERES METÍLICOS DE ÓLEO DE LINHAÇA ISOMERIZADO COM 13 % DE CATALISADOR A 160 °C (-1,41, 0);	70
APÊNDICE C – TABELA DE CONCENTRAÇÕES DOS ISÔMEROS FORMADOS: CLA, X1, X2 E X3	71
REFERÊNCIAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

Ácidos graxos conjugados são misturas de isômeros posicionais e geométricos que contém duplas ligações conjugadas, podendo ser obtidos a partir de ácidos graxos poli-insaturados. (NAGAO; YANAGITA, 2003). Pesquisas têm despertado o interesse na utilização de isômeros conjugados de ácidos graxos poli-insaturados, devido aos seus efeitos fisiológicos sobre diversas doenças, como câncer, diabetes, obesidade e alergias (PATIÑO et al., 2013). Dentre estes incluem-se os isômeros do ácido linoleico conjugado (CLA) e do ácido linolênico conjugado (CLNA) (FONSECA; YOSHIDA, 2009).

A linhaça é a semente da planta do linho (*Linum usitatissimum* L.), oleaginosa pertencente à família das Lináceas (COSMO et al., 2014), é considerada um alimento funcional pelo fato de ser uma fonte natural de fitoquímicos e por conter o ácido graxo alfa-linolênico (C18:3 n-3) em proporção elevada, aproximadamente 60% da composição do óleo desta semente (CUPERSMID et al., 2012).

Existem dois tipos de linhaça, marrom e dourada, sendo que tal característica é determinada pela quantidade de pigmentos no revestimento externo da semente, o que é determinado de acordo com fatores ambientais e genéticos. A linhaça marrom é cultivada em regiões de clima úmido e quente como o Brasil, e a dourada geralmente em regiões frias, como o Canadá e o norte dos Estados Unidos (BARROSO et al., 2014).

É uma importante fonte de ácidos graxos poli-insaturados. Estes são representados pelas séries n-3 (ácido alfa-linolênico) e n-6 (ácido linoleico). Os ácidos linoleico e alfa-linolênico são denominados essenciais pois o organismo humano é incapaz de sintetizá-los, portanto devem ser obtidos através da alimentação (PERINI et al., 2010).

Do ponto de vista técnico, existem diversos sistemas para nomenclatura de ácidos graxos. O sistema n, também conhecido como sistema ômega, faz referência à posição da dupla ligação do ácido graxo que esteja mais próxima do grupo metil terminal, tais como n-9, n-6 e n-3. Esse sistema é aplicável somente a ácidos graxos insaturados com dupla ligação na configuração *cis* e a ácidos graxos poli-insaturados com dupla ligação na configuração *cis* separadas por um grupo metileno (FAO, 2010).

Devido o óleo de linhaça apresentar uma proporção elevada do ácido alfa-linolênico, o CLNA pode ser obtido sinteticamente por meio da isomerização deste óleo (FONSECA; YOSHIDA, 2009).

Este trabalho apresenta uma revisão sobre ácidos graxos conjugados, desde obtenção, análise e estudo de atividades antioxidante e antimicrobiana. A parte experimental envolveu a produção de CLA e CLNA a partir do óleo de linhaça por isomerização alcalina. Visto a necessidade de informações sobre o tema e sua importância nutricional, realizaram-se análises para verificação da capacidade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* das frações obtidas de isômeros conjugados.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Produzir ácidos graxos conjugados por meio da isomerização alcalina de ésteres etílicos dos ácidos graxos do óleo de linhaça e avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* das misturas obtidas contendo ácidos linoleico e linolênico conjugado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar os ácidos linoleico e linolênico conjugado a partir do óleo de linhaça e avaliar o efeito da temperatura da reação e do teor de catalisador sobre a formação de isômeros conjugados do ácido linoleico e alfa-linolênico.

- Confirmar a isomerização dos ácidos linoleico e alfa-linolênico do óleo de linhaça por meio de análises espectroscópicas na região do ultravioleta e do infravermelho;

- Quantificar o CLA e o CLNA por cromatografia em fase gasosa e determinar o grau de isomerização dos ácidos linoleico e alfa-linolênico.

- Determinar as condições para produção com melhor rendimento das misturas de CLA e CLNA a partir do óleo de linhaça.

-Avaliara atividade antioxidante *in vitro* das misturas de CLA e CLNA por meio do ensaio ABTS.

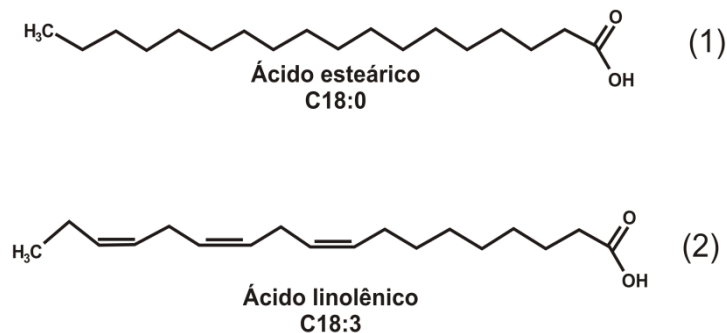
- Realizar ensaios antibacterianos *in vitro* com as misturas de CLA e CLNA e compará-los com droga de referência.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ÁCIDOS GRAXOS

Ácidos graxos são compostos orgânicos formados por uma cadeia de hidrocarbonetos de comprimento entre 4 e 36 átomos de carbono e com um grupo ácido carboxílico. Em alguns ácidos graxos, a cadeia de carbonos é totalmente saturada, em outros a cadeia contém uma ou mais duplas ligações (Figura 1), sendo que estas geralmente não são conjugadas, mas são separadas por um grupo metileno. Em quase todos os ácidos graxos insaturados que ocorrem na natureza, as duplas ligações estão na configuração *cis* (LEHNINGER; NELSON, 2006).

Figura 1 – Estrutura química de um ácido graxo saturado (1) e de um poli-insaturado (2).



Fonte: Lehninger, Nelson (2006).

Os lipídios mais simples, constituídos a partir de ácidos graxos são os triacilgliceróis, ou triglicerídeos. Os óleos e gorduras derivados de animais e vegetais consistem principalmente de moléculas de triacilgliceróis, sendo composto de três ácidos graxos, cada um em ligação éster com a mesma molécula de glicerol (MILINSK, 2007). A Figura 2 demonstra a estrutura química de um triglicerídeo insaturado com radicais carboxílicos diferentes, na qual na extremidade esquerda encontra-se a molécula de glicerol, e na porção à direita de cima para baixo estão representados respectivamente os ácidos graxos palmítico, oleico e alfa-linolênico.

Figura 2 – Estrutura de um triglicerídeo.



Fonte: Lehninger, Nelson (2006).

A distribuição dos ácidos graxos nos óleos vegetais varia de forma considerável, sendo que os mais comuns apresentam cadeias contendo entre 12 a 18 átomos de carbono (LÓPEZ et al., 2005). Na Tabela 1 estão descritas as distribuições de ácidos graxos em alguns óleos vegetais.

Tabela 1 – Distribuição de ácidos graxos em alguns óleos vegetais

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

Fonte: Rinaldi et al., 2007.

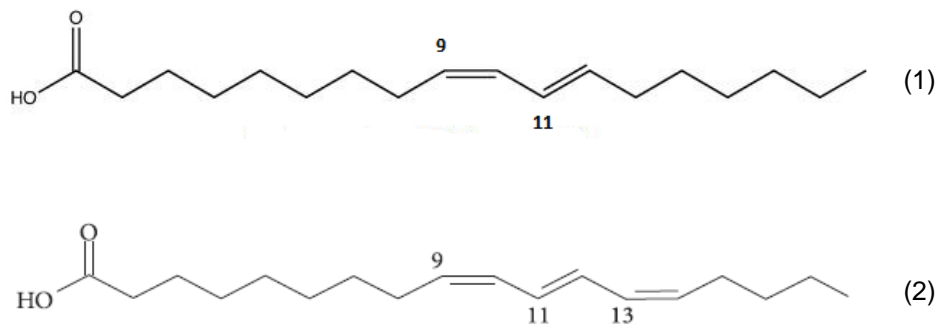
O óleo da semente de linhaça é composto de triacilgliceróis formados pelos seguintes ácidos graxos: palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6) e alfa-linolênico (18:3n-3). Outros compostos lipossolúveis presentes neste óleo incluem monoacilgliceróis e diacilgliceróis, esteróis como o estigmasterol, fosfolipídios, ácidos graxos livres, carotenoides e clorofila (SHIM et al., 2014).

3.2 ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS

O termo geral “ácidos graxos conjugados” refere-se a um grupo de isômeros posicionais e geométricos dos ácidos graxos poli-insaturados que contém duplas ligações conjugadas, ou seja, as ligações duplas são separadas por uma ligação simples carbono-carbono (MIRANDA et al., 2014), podendo ser formados dienos,

trienos e tetraenos, estruturas com respectivamente duas, três e quatro ligações duplas conjugadas (YUAN et al., 2014). Na Figura 3 estão representados respectivamente um CLA, com duas ligações duplas conjugadas, e um CLNA com três ligações duplas conjugadas.

Figura 3 – Estrutura química de um CLA (18:3-9c,11t) (1) e de um CLNA (18:3-9c,11t,13c) (2).



Fonte: Carvalho et al., (2010).

Substâncias que possuem composição e massa molecular idênticas, mas estruturas diferentes por apresentarem organização atômica posicional e geométrica distintas são denominados de isômeros (PARIZA et al., 2001). Os representantes dos ácidos graxos essenciais são o CLA e o CLNA, provenientes dos ácidos linoleico e alfa-linolênico respectivamente (YANG et al., 2004).

Os isômeros de CLA são os mais estudados até o momento, sendo que os mais abundantes são o C18:2 9c, 11t e o C18:2 10t, 12c (MIRANDA et al., 2014). Como a posição das duplas ligações pode variar, estudos já demonstraram 28 isômeros geométricos e posicionais possíveis (BANNI, 2002).

Quanto às fontes dos ácidos graxos conjugados, é possível observar na Tabela 2 que o CLA pode estar presente em carnes e produtos lácteos de ruminantes, em decorrência da ação de enzimas isomerases de *Butyrivibrio fibrisolvens*, microrganismo anaeróbio que coloniza o rúmen e que realiza bio-hidrogenação de ácidos graxos poli-insaturados, gerando principalmente o isômero 18:2 9c, 11t. Estes alimentos não representam uma fonte de CLA em quantidades significativas, sendo que neste caso o baixo rendimento é um fator limitante. Como alternativa pode ser obtido industrialmente por isomerização alcalina do ácido linoleico (KOKA, YANAGITA, 2013).

Tabela 2 – Teor de CLA em alguns alimentos

Alimento	CLA (mg g⁻¹ de lipídios)	9c, 11t (%)
Carne bovina	4,3	85,0
Carne de carneiro	5,6	92,0
Leite de vaca	5,5	92,0
Manteiga	4,7	88,0
Azeite de oliva	0,2	47,0
Óleo de canola	0,5	44,0
Óleo de cártamo	0,7	44,0

Fonte: Koba, Yanagita (2013).

Da mesma maneira, Bialek et al., (2017), descrevem que CLNA pode ser obtido pelo mecanismo de bio-hidrogenação, sendo necessária a suplementação da alimentação animal com fontes de ácido alfa-linolênico, para ocorrer formação de seus isômeros conjugados.

Por outro lado, CLNA pode ser encontrado naturalmente em alguns lipídios vegetais, como no óleo de romã (ácido punícico: C18:3 9c, 11t, 13c), calêndula (ácido calêndico: C18:3 8t, 10t, 12c) e tungue (ácido alfa-eleosteárico: C18:3 9c, 11t, 13t) de modo que cada planta possui uma enzima conjugase específica, que converte ácido alfa-linolênico (AAL) em um isômero CLNA (CARVALHO et al., 2010; BIALEK et al., 2017).

O óleo de linhaça bruto pode apresentar em sua composição cerca de 85% de ácidos graxos insaturados, correspondendo em média a 58% de ácido alfa-linolênico e 23% de linoleico. Da mesma forma que o CLA, é possível produzir sinteticamente CLNA por isomerização alcalina do AAL a partir do óleo de linhaça (RINALDI et al., 2007).

3.3 OBTENÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS

É possível obter ácidos graxos conjugados por meio da extração de óleo de alguns vegetais, por exemplo, o óleo de semente de romã, calêndula, tungue, jacarandá, tem naturalmente isômeros CLNA em sua composição. Porém podem ocorrer consideráveis diferenças nos rendimentos de óleo e de isômeros de acordo com a região e condições de cultivo de cada espécie (ARUNA et al., 2016).

Outra via para obtenção é por meio da suplementação alimentar de ruminantes, com fontes de ácidos graxos poli-insaturados, sendo que neste caso a síntese de CLA e CLNA ocorre no trato digestivo destes animais através da isomerização enzimática dos ácidos graxos por ação de bactérias presentes no rúmen destes animais, sendo que neste caso, CLA e CLNA estarão presentes na carne, leite e derivados (GORISSEN et al., 2015).

A isomerização alcalina é um método eficaz para produção de CLNA em massa, porém a identificação dos perfis obtidos é difícil devido à produção de muitos isômeros diferentes (KOBA et al., 2007). Yang e Liu (2004), descreveram um método de obtenção de ácidos graxos conjugados por meio de isomerização alcalina do óleo de soja, no qual utilizaram sob aquecimento controlado etilenoglicol, KOH, metanol, HCl. A extração dos ácidos graxos da mistura obtida foi realizada com solvente hexano.

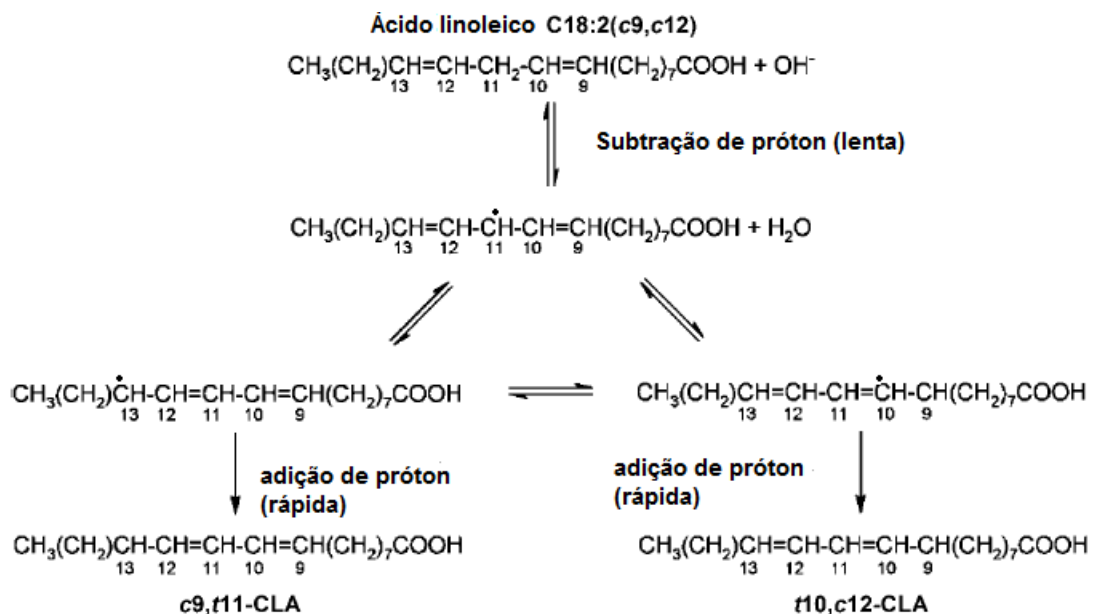
Vishal e Proctor (2006), estudaram uma maneira fotocatalítica de obter óleo de soja rico em CLA. Neste método, após 144 horas de exposição a radiação visível e ultravioleta, em temperatura controlada entre 22 e 25°C e utilizando-se iodo como catalisador, obteve-se um rendimento de 24% de isômeros conjugados.

Para contornar as variações das fontes naturais de isômeros, bem como obter lotes mais padronizados, pode-se utilizar a síntese orgânica para produção de isômeros CLA e CLNA por meio de isomerização alcalina e foto isomerização de óleos ricos em ácido linoleico e alfa-linolênico, respectivamente. Os fatores limitantes para a utilização comercial da maior parte destes métodos são: etapas de purificação extensivas e dificuldade na separação dos isômeros (DEMIR; TALPUR, 2010).

No processo de isomerização alcalina, um óleo rico em ácidos graxos poli-insaturados é tratado com altas temperaturas, entre 200 e 250 °C em condições alcalinas e atmosfera inerte de nitrogênio. Bases fortes tais como NaOH ou KOH dissolvidas em água são utilizadas para saponificar os triglicerídeos e isomerizar os ácidos graxos livres. Em seguida, a fase aquosa alcalina, que contém glicerol, é separada dos sabões de ácidos graxos, que são adicionalmente tratados com um ácido, para convertê-los em um conjunto de ácidos graxos livres ricos em CLA (REMMEIREIT, 2000).

No caso específico de óleos ricos em ácido linoleico, a via alcalina produz seletivamente quantidades quase equimolares de isômeros CLA 9*c*, 11*t* e 10*t*, 12*c*. Outros isômeros são formados em pequenas quantidades. A preferência por formação de 9*c*, 11*t* e 10*t*, 12*c* é explicada pelo mecanismo de reação apresentado na Figura 4. Após a subtração dos prótons alílicos (cuja acidez é maior) com base forte em uma reação lenta, dois carbânions conjugados são formados como resultado de rearranjos alílicos. A adição rápida de prótons, em última instância, fornece dois isômeros CLA: 9*c*, 11*t* e 10*t*, 12*c* (PHILIPPAERTS et al., 2011).

Figura 4 – Esquema de formação de dois isômeros CLA por isomerização alcalina do ácido linoleico



Fonte: Philippaerts et al., (2011).

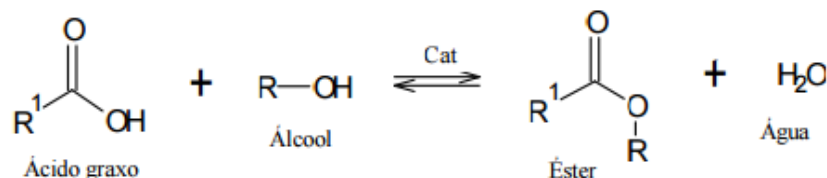
3.4 ASPECTOS ANALÍTICOS DE ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS

Na análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa é necessário realizar procedimentos de esterificação, no qual os ácidos graxos são convertidos em compostos mais voláteis, como os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) (FUENTE et al., 2006). Os métodos de esterificação normalmente são subdivididos em duas categorias: catálise ácida e catálise básica, sendo os reagentes mais utilizados na catálise ácida o ácido clorídrico e sulfúrico em metanol, e na catálise

básica, hidróxido de sódio ou potássio em metanol e metóxido de sódio em metanol (MILINSK, 2007).

A esterificação consiste na obtenção de ésteres a partir da reação representada na Figura 5, entre um ácido graxo e um álcool de cadeia curta com formação de água como subproduto (CARDOSO, 2008). É um processo reversível e o catalisador atua tanto na reação direta (esterificação) como na reação inversa (hidrólise do éster). Assim, para deslocar o equilíbrio em favor dos produtos podem-se utilizar dois métodos: remoção de um dos produtos, preferencialmente a água, ou utilizar um excesso de um dos reagentes, como o álcool (NEVES, 2008).

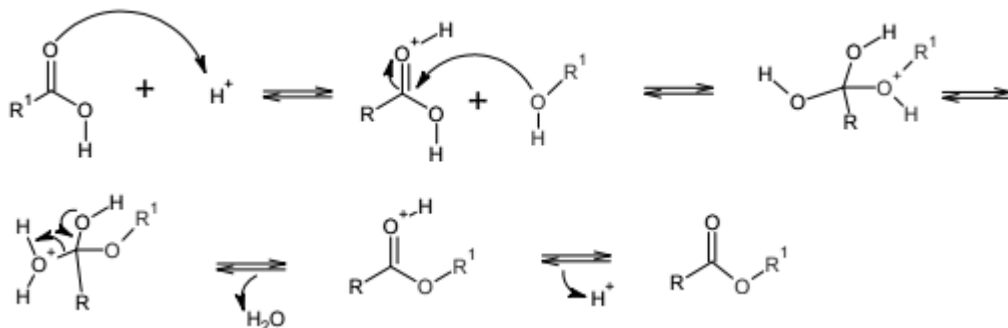
Figura 5 – Reação de esterificação do ácido carboxílico



Fonte: Neves, 2008.

Na reação por catálise ácida, no procedimento mais comum, o ácido carboxílico é protonado por um ácido, facilitando o ataque nucleofílico do álcool na carbonila, formando um intermediário tetraédrico que posteriormente sofre um rearranjo, seguido da perda de uma molécula de água, formando um éster (LEÃO, 2009), como demonstrado na Figura 6.

Figura 6 – Mecanismo da reação de esterificação de ácidos graxos por catálise ácida



Fonte: Leão, 2009.

As reações por catálise ácida apresentam bom desempenho na conversão de ácidos graxos livres e daqueles encontrados na forma de glicerídeos e

fosfolipídios. Porém há uma desvantagem, no caso dos dienos conjugados, a catálise ácida é responsável pela isomerização das ligações *cis*, *trans* à suas correspondentes *trans*, *trans* e/ou formação de derivados metoxi, o que faz dela um método inapropriado para esterificação do CLA (NUERNBERG, 2007).

A esterificação por catálise básica é um método rápido e pode ser realizado a baixas temperaturas, o que reduz o risco de decomposição dos ácidos graxos poli-insaturados e/ou isomerização das ligações *cis*, *trans*. Os reagentes mais utilizados nestas reações são soluções metanólicas de metóxido de sódio (NaOCH_3), hidróxido de potássio (KOH) e hidróxido de sódio (NaOH). Este método é o mais indicado para determinar a distribuição dos isômeros do CLA.

A análise dos isômeros do CLA tem sido aprimorada através do uso de técnicas instrumentais, tais como a cromatografia gasosa com detector de chama, utilizando colunas capilares longas e de alta polaridade ou combinada a técnicas complementares como a espectroscopia de massa (FUENTE et al., 2006).

Existem desafios em relação aos aspectos analíticos de ácidos graxos conjugados, principalmente devido às concentrações relativamente pequenas desses compostos nas amostras analisadas, falta de padrões, co-eluição frequente e baixa resolução (ALVES; BESSA, 2014). Considera-se que a tarefa mais importante na análise de ácidos graxos conjugados é estabelecer a posição de dupla ligação e sua configuração geométrica na cadeia de carbono (BIALEK et al., 2017).

A análise espectrofotométrica na região ultravioleta utiliza radiação de baixo comprimento de onda (200 a 400 nm) e alta energia, fornecendo informação sobre a qualidade de um óleo (REDA, 2004).

A espectroscopia no infravermelho utiliza radiação de frequência de maior comprimento de onda (menor energia), sendo uma técnica muito utilizada para a identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas. É um método físico de análise e possui vantagens como a redução no tempo de análise, diminuição substancial nas quantidades de amostra, ampliação da capacidade de identificar ou caracterizar estruturas complexas e não destruição da amostra, sendo amplamente utilizada nas áreas de química de produtos naturais, síntese e transformações orgânicas (LOPES; FASCIO, 2004).

3.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS

Os antioxidantes geralmente são classificados em sintéticos e naturais, e atualmente é elevado o uso destes para melhorar a estabilidade dos alimentos que são suscetíveis à deterioração oxidativa, condição que resulta em diminuição da qualidade nutricional. Sendo assim, é necessário adicionar antioxidantes para preservar o sabor, a perda de cor e evitar a destruição oxidativa dos alimentos. Os mais utilizados para a preservação de alimentos são hidroxil tolueno butilado (BHT), hidroxil anisol butilado (BHA), hidroquinona de terc-butilo (TBHQ), vitamina C e E. Entre os antioxidantes de tipo sintético, o BHT e BHA são amplamente utilizados. No entanto é recomendado diminuir o uso destes antioxidantes sintéticos devido o seu potencial cancerígeno e danos hepáticos. Sendo assim há grande interesse na busca de antioxidantes naturais que sejam mais seguros (KASOTE, 2013).

Já existem alguns estudos que identificaram atividade antioxidante em ácidos graxos conjugados. Grande parte destes geralmente testou a atividade de uma mistura de isômeros devido às diferenças estruturais serem mínimas entre isômeros dos ácidos graxos conjugados, o que torna sua separação, identificação e quantificação extremamente difíceis (CAO et al., 2006). Porém também existem estudos com isômeros isolados, como no caso de Nekooeian et al., (2014), que realizaram teste *in vivo* em ratos e concluíram que a ingestão regular por 28 dias de ácido puníco, um isômero de CLNA (18:3 9c, 11t, 13c), foi eficiente para promover a redução do estresse oxidativo.

Fagali e Catalá (2008), demonstraram que os ácidos graxos conjugados possuem propriedades antioxidantes através da verificação do sequestro de radicais livres pelo método DPPH. Neste estudo, os CLA obtiveram resultados muito superiores em comparação com o ácido linoleico, que não apresentou atividade na maior concentração testada, indicando que os CLA pode promover algum efeito protetor contra radicais livres.

Há um interesse crescente no uso de antioxidantes com o objetivo de prevenir danos causados por radicais livres. O dano oxidativo pode ser o agente causador de diversas doenças crônicas como diabetes, câncer, aterosclerose, dentre outras (VASCONCELOS et al., 2014). Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-

etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005).

Saha e Ghosh (2012), estimaram a atividade antioxidante total *in vivo* promovida pela ingestão de uma mistura contendo dois isômeros CLNA, ácido alfa-eleostearico e ácido punícico, por meio do ensaio de redução do ferro (FRAP) realizado em amostras de plasma dos animais avaliados. Os resultados mostraram que o valor de FRAP foi restaurado para o valor de controle no grupo que havia sofrido estresse oxidativo seguido de tratamento com óleo contendo a mistura de CLNA, demonstrando poder antioxidante da mistura destes isômeros.

Os isômeros CLA continuam sendo os mais amplamente estudados de todos os ácidos graxos conjugados, apesar da crescente evidência de que outros ácidos graxos conjugados naturais e sintéticos também podem possuir potentes propriedades bioativas (HENNESSY et al., 2011), tendo sido associados a diversas propriedades, dentre estas, atividade antimicrobiana (HENNESSY et al., 2016). Choi (2016), testou *in vitro*, a atividade de ácido linolênico e de três isômeros CLA contra *Mycobacterium tuberculosis*, por meio de testes de microdiluição, sendo que os resultados obtidos demonstraram que os isômeros CLA foram capazes de inibir o crescimento deste microrganismo, sugerindo mais estudos para utilização farmacológica destes ácidos graxos.

Kadidreddy et al., (2016), obtiveram CLA por meio de bio-hidrogenação de ácido linoleico por ação do microrganismo *Lactobacillus plantarum*, que compreendeu dois isômeros, 9*c*, 11*t* e 10*t*, 12*c*, na proporção 60:40. Os testes de atividade antimicrobiana desta mistura de isômeros apresentaram melhores resultados em relação aos microrganismos gram-positivos, e apresentaram atividade antioxidante, testada pelo método DPPH. Ali et al., (2012), concluíram que embora a natureza lipossolúvel dos ácidos graxos conjugados limite a aplicação de ensaios antioxidantes, foi possível verificar em testes *in vitro* que misturas de CLA apresentaram atividade antioxidante.

3.6 EFEITOS FISIOLÓGICOS DOS ÁCIDOS GRAXOS CONJUGADOS

Mourão et al., (2005), realizaram revisão de estudos sobre os prováveis efeitos da suplementação de ácidos graxos conjugados sobre o metabolismo lipídico. De acordo com estes autores, as principais adaptações metabólicas promovidas pelo CLA seriam o aumento da lipólise no tecido adiposo, maior disponibilidade de ácidos graxos livres (AGL) circulantes e elevação da oxidação de ácidos graxos (AG), em função da maior atividade da enzima lipase hormônio-sensível (LHS) e do sistema carnitina palmitoil-transferase (CPT). Os estudos realizados com humanos ainda não são conclusivos, embora alguns apontem um possível aumento da lipólise e/ou redução da lipogênese, que reflete em alterações apenas na composição corporal, especialmente no tecido adiposo abdominal, mas não na perda de massa corporal (GAULLIER et al., 2004).

Estima-se que a ingestão de cerca de 3 g de CLA por dia seja necessária para que ocorram efeitos benéficos no organismo. Entretanto, no Brasil a ingestão média de CLA é estimada em 36 mg por dia (NUNES; TORRES, 2010). A gama de propriedades funcionais atribuídas ao CLA deve-se à existência de um grande número de isômeros que, apesar da semelhança estrutural, possuem papéis biológicos distintos. Os efeitos relacionados à ingestão da grande maioria destes isômeros, bem como da interação entre eles, no entanto, ainda são desconhecidos, com exceção dos isômeros 9*c*, 11*t* e 10*t*, 12*c* (RAINER; HEISS, 2004).

De acordo com Heinze e Actis (2012), a atividade anticarcinogênica do CLA difere de acordo com o tipo de isômero. O isômero 10*t*, 12*c*, proveniente do ácido linoleico, por exemplo, tem sido mais efetivo no combate ao crescimento celular associado ao câncer de cólon *in vitro*, enquanto que o 9*c*, 11*t* demonstrou atividade antitumoral em um estudo com células do câncer de mama, provavelmente por apresentar atividade anti-estrogênica.

Outro aspecto que atrai a atenção dos pesquisadores é a capacidade do CLA de reduzir a fração lipídica corporal em animais, com destaque ao isômero 10*t*, 12*c*. Vários mecanismos foram propostos para explicar esta ação, entre eles, aumento do gasto energético, modulação do metabolismo dos adipócitos, modulação das adipocinas e citocinas e aumento da β -oxidação dos ácidos graxos (PARK; PARIZA, 2007). Devido a essa função catabólica, o CLA apresenta efeitos positivos sobre fatores de risco relacionados às doenças cardiovasculares, como

redução do colesterol plasmático, dos níveis de triacilgliceróis e aterosclerose (MOONEY et al., 2012).

Outras propriedades benéficas como atividade anti-inflamatória e promoção de melhorias no sistema imune têm sido associadas com benefícios para aqueles que apresentam asma e Alzheimer (MACREDMOND; DORSCHIED, 2011). Porém, em relação ao papel do CLA sobre diabetes do tipo II, ainda não existe um consenso entre os pesquisadores quanto ao efeito deste ácido graxo, sugerindo a necessidade de mais estudos (KOBA; YANAGITA, 2013).

A maioria das informações sobre as propriedades funcionais acima atribuídas ao CLA foi determinada em sistemas modelo *in vitro* e em animais. Em relação aos estudos em humanos, menores em proporção, os resultados obtidos ou não são consistentes ou não similares quanto à eficácia, comparado aos realizados em sistemas modelos, sugerindo a necessidade da realização de mais pesquisas com avaliações mais detalhadas da atividade fisiológica dos isômeros na saúde humana para melhores conclusões (PARK, 2009; NAGAO, YANAGITA, 2005).

Com relação aos estudos dos efeitos fisiológicos dos CLNA, estes são ainda mais limitados e escassos, contudo testes feitos *in vivo* e *in vitro* demonstraram resultados em relação a atividade do CLNA contra o câncer, obesidade e até sobre funções imunológicas (KOBA et al., 2007). Este fato sugere a realização de mais pesquisas neste campo com o objetivo de obter mais dados comprovados a respeito do CLNA.

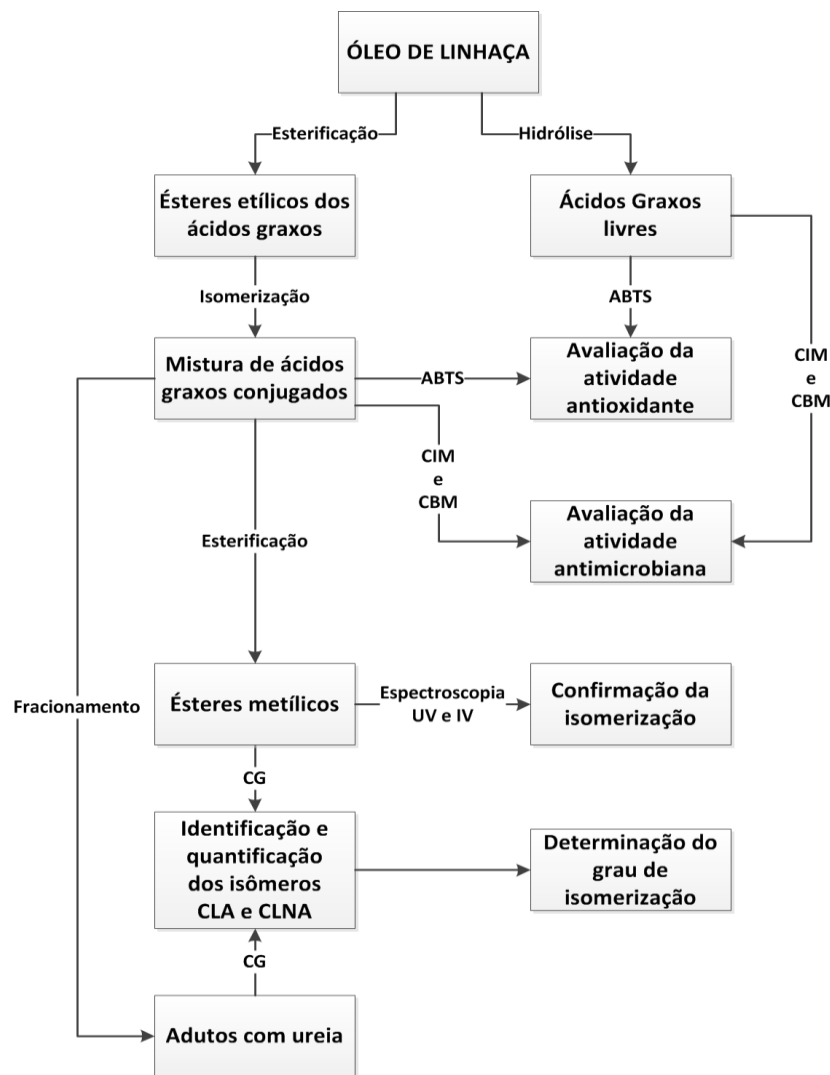
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

O óleo de linhaça marrom bruto foi obtido de uma indústria de processamento de óleos vegetais, localizada em Panambi, RS. Os reagentes e solventes utilizados neste estudo foram todos de grau analítico. Os padrões utilizados nas análises por cromatografia foram da marca Sigma-Aldrich, com grau de pureza igual ou superior a 99,0 %.

4.2 MÉTODOS

Figura 7 - Fluxograma dos métodos realizados



Fonte: autoria própria

4.2.1. Preparação de ésteres etílicos a partir do óleo de linhaça

O óleo de linhaça foi convertido em ésteres etílicos de ácidos graxos (EEAG) conforme o método descrito por Tahvildari e Mohammadi (2014). Inicialmente pré-aqueceu-se 150 g de óleo de linhaça em balão equipado com sistema de refluxo até a temperatura estabilizar em 60°C. Na sequência adicionou-se 2,25 gramas de hidróxido de potássio dissolvido em 214 mL de etanol. Esta mistura foi agitada constantemente por 1 hora, por meio de agitador magnético, mantendo-se a temperatura controlada em 60°C. Posteriormente aguardou-se o resfriamento e adicionou-se 60 mL de etanol e 4 mL de ácido sulfúrico concentrado. Foi novamente levado para aquecimento mantendo-se sob agitação a 80°C por 2,5 horas, em sistema de refluxo. Na sequência filtrou-se a mistura, adicionou-se 200 mL de água destilada e transferiu-se para funil de separação. Agitou-se e aguardou-se a separação das fases. Após 15 minutos de repouso, descartou-se a fase inferior e recolheu-se a fase orgânica superior que continha os ésteres etílicos do óleo de linhaça.

4.2.2 Isomerização dos ésteres etílicos de ácidos graxos obtidos a partir do óleo de linhaça

A isomerização dos ésteres etílicos dos ácidos linoleico e alfa-linolênico contidos no óleo de linhaça foi realizada em meio básico, utilizando etilenoglicol como solvente (BERDEAUX et al., 1998). Os experimentos de isomerização foram realizados seguindo a metodologia de planejamento fatorial, que permite verificar através de um número menor de experimentos a influência das variáveis na resposta, bem como otimizá-las. Para essa etapa foi realizado um planejamento fatorial com duas variáveis (concentração de catalisador e temperatura de reação), constituído de 4 pontos fatoriais, 4 pontos centrais e 4 pontos axiais. Os ensaios foram realizados de forma aleatorizada. O tempo de reação foi de 150 minutos para todos os ensaios de isomerização. Os teores de hidróxido de potássio foram de 13,0% (ponto axial), 15,0 % (nível baixo), 20,0 % (ponto central), 25% (nível alto) e 27% (ponto axial). Enquanto que a temperatura variou de 125 °C (ponto axial), 135 °C (nível baixo), 160 °C (ponto central), 185 °C (nível alto) e 195 °C (ponto axial). A

partir destas determinações, realizaram-se 12 ensaios de isomerização, seguindo sequência aleatória gerada no software Statistica versão 10.0, conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Planejamento fatorial utilizado no experimento

Ordem do ensaio	Variáveis não codificadas		Variáveis codificadas	
	Teor de KOH (m/m)	Temperatura (°C)	Teor de KOH (m/m)	Temperatura (°C)
1	15%	135	-1	-1
2	15%	185	-1	1
3	20%	160	0	0
4	25%	135	1	-1
5	20%	160	0	0
6	20%	160	0	0
7	20%	160	0	0
8	25%	185	1	1
9	20%	125	0	-1,414
10	20%	195	0	1,414
11	13%	160	-1,414	0
12	27%	160	1,414	0

Fonte: autoria própria

A um balão de três bocas foram adicionados 42,75g de ésteres etílicos de ácidos graxos preparados a partir do óleo de linhaça e 86,70 g de solução de KOH em etilenoglicol, cuja concentração variou de 13 a 27 % (m/m), de acordo com o planejamento fatorial.

A mistura foi mantida sob agitação constante com auxílio de um agitador mecânico, em temperatura controlada de acordo com o planejamento fatorial apresentado acima, em manta de aquecimento, mantendo-se atmosfera inerte sob fluxo de nitrogênio (10 mL min^{-1}) por 150 minutos. Após o tempo de reação de isomerização, adicionou-se 186 mL de água destilada e 26 mL de HCl 37%, para formação dos ácidos graxos livres. Transferiu-se a mistura para um funil de separação, no qual se realizou três extrações com 100 mL de n-hexano para cada extração. Após a separação das fases, descartou-se a fase inferior. Transferiu-se a fase superior para um balão de fundo redondo e realizou-se a remoção do solvente em evaporador rotativo, a temperatura de 40°C. Posteriormente a amostra contendo os isômeros dos ácidos graxos linoleico a alfa-linolênico foi mantida sob fluxo de nitrogênio por 4 minutos para que fosse eliminado o solvente remanescente.

Acondicionou-se em frasco de vidro âmbar, e manteve-se congelada a -18°C para utilização posterior.

4.2.3 Preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos para análises cromatográficas

Os ácidos graxos isomerizados foram convertidos a ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) para realização de análises cromatográficas. A preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada de acordo com o método proposto por Hartman e Lago (1973), adaptado por Maia e Rodriguez-Amaya (1993). Foram pesados em tubo de ensaio com tampa rosqueável $45,0 \pm 4,0$ mg de ácidos graxos livres e adicionados 1,500 mL de solução $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de heptadecanoato de metila 99,0%. Após a evaporação do solvente sob fluxo de nitrogênio, adicionou-se 4 mL de solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio em metanol, seguido de agitação e aquecimento em banho de água em ebulição durante cerca de 5 min. Em seguida o sistema foi resfriado em água corrente e adicionou-se 5 mL do reagente esterificante, mistura constituída de cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico na proporção de 1:30:1,5 (m/v/v) e aquecido em banho de água em ebulição por 3 min. Após resfriar o tubo em água corrente, houve adição de 5 mL de solução de cloreto de potássio 0,88 %, e de 2 mL de n-heptano, seguido de agitação vigorosa por 30 s. Após a separação das fases, retirou-se a fase superior com pipeta de Pasteur e armazenou-se em tubos *ependorf*. Os tubos foram armazenados em congelador (-18°C) para posterior análise cromatográfica.

4.2.4. Identificação e quantificação dos isômeros dos ácidos linoleico e alfa-linolênico

Os ésteres metílicos de ácidos graxos obtidos nas etapas anteriores foram analisados em um cromatógrafo a gás, modelo Clarus 680 GC (Perkin Elmer, Estados Unidos), equipado com coluna capilar de sílica fundida CP Select CB FAME (100 m x 0,25 mm x 0,25 μm de cianopropilpolisiloxano) e detector de ionização em chama. A temperatura inicial da coluna foi de 165°C por 10 min, sendo elevada a 235°C à taxa de $4^{\circ}\text{C min}^{-1}$, permanecendo nesta temperatura por 10 min. As temperaturas do injetor e detector foram respectivamente, 240 e 250°C . O volume

injetado foi de 2,0 μL , com injeção automática. As velocidades de fluxo dos gases foram de 1,1 mL min^{-1} para o gás de arraste (He); 40 e 400 mL min^{-1} para os gases da chama, hidrogênio e ar sintético, respectivamente. As áreas dos picos foram determinadas através do software TotalChrom versão 6.3.2 (Perkin Elmer).

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção com o de misturas padrão de ésteres metílicos obtidas da Sigma-Aldrich (189-19, que corresponde a uma mistura de ácidos graxos saturados e insaturados; e O5632 que é uma mistura de CLA), e pela coeluição de amostras com padrões.

A quantificação dos ácidos graxos foi realizada utilizando o heptadecanoato de metila (17:0) como padrão interno, de forma semelhante ao método proposto por Joseph e Ackman (1992). Os fatores de resposta teóricos foram calculados em relação ao heptadecanoato de metila, conforme descrito por Ackman (1972), e os cálculos da concentração dos ácidos graxos foram realizados conforme a Equação 1:

$$C (\text{mg g}^{-1}) = \frac{A_X \cdot M_{17:0} \cdot F_{RT}}{A_{17:0} \cdot M_A \cdot F_{CAG}} \quad (1)$$

Onde:

A_X = área dos ésteres metílicos ácidos graxos;

$A_{17:0}$ = área do padrão interno;

$M_{17:0}$ = massa do padrão interno adicionado a amostra (em miligramas);

M_A = massa da amostra (em gramas);

F_{RT} = fator de resposta teórico dos ésteres metílicos dos ácidos graxos 16:0 (1,0026), 18:0 (0,9910), 18:1 (0,9843), 18:2 (0,9776), 18:3 (0,9709);

F_{CAG} = fator de conversão para expressar os resultados em mg de ácidos graxos g^{-1} de lipídios totais a partir dos ésteres metílicos dos ácidos graxos 16:0 (0,9481), 18:0 (0,950), 18:1 (0,9527), 18:2 (0,9524) e 18:3 (0,9520).

4.2.5 Determinação do grau de isomerização

O grau de isomerização (GI) foi determinado por meio do quociente do teor de ácido graxo (AL ou AAL) isomerizado pelo teor inicial do ácido graxo no óleo de linhaça não isomerizado, conforme a Equação 2.

$$GI(18:n) = \frac{C_{(18:n)_i} - C_{(18:n)_f}}{C_{(18:n)_i}} \quad (2)$$

Onde:

$n = 2$ para ácido linoleico (18:2n-6) e 3 para o ácido alfa-linolênico (18:n-3);

GI (18:n) = grau de isomerização para os ácidos 18:2n-6 e 18:3n-3;

$C_{(18:n)_i}$ = concentração inicial para os ácidos 18:2n-6 e 18:3n-3;

$C_{(18:n)_f}$ = concentração após a isomerização para os ácidos 18:2n-6 e 18:3n-3.

4.2.6 Confirmação da isomerização

A confirmação da isomerização dos ácidos linoleico e alfa-linolênico do óleo de linhaça foi efetuada por meio de análises espectroscópicas nas regiões do ultravioleta e do infravermelho.

4.2.6.1 Espectroscopia no ultravioleta

As análises espectroscópicas na região UV-VIS foram realizadas em um espectrofotômetro de feixe duplo, modelo T80+ (PG Instruments). Cerca de 45 mg de ésteres metílicos de ácidos graxos foram dissolvidos em 2,5 mL de n-heptano. Para as medidas foram utilizadas cubetas de quartzo, com caminho óptico de 1 cm. Os espectros foram obtidos na região de 200 a 400 nm.

4.2.6.2 Espectroscopia no infravermelho

Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro infravermelho, com transformada de Fourier, modelo Spectrum 65 (Perkin Elmer) e módulo de refletância total atenuada universal (UATR – *universal attenuated total reflectance*). Cerca de 100 mg de ésteres metílicos de ácidos graxos foram utilizados. A faixa de 3500 a 650 cm^{-1} foi utilizada, com resolução de 4 cm^{-1} e 40 varreduras.

4.2.7 Hidrólise dos triacilgliceróis do óleo de linhaça

Foram preparados ácidos graxos livres do óleo de linhaça conforme método descrito por Christie (1982), com o propósito de comparar a atividade microbológica para as amostras de óleo de linhaça isomerizado e não isomerizado. Para a reação de hidrólise foi preparada imediatamente antes do uso a solução de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KOH em 90 % de etanol (v/v), por meio da adição de 10 mL de KOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ aquoso para 100 mL de etanol. Em seguida, foram adicionados a tubos de ensaio com tampa rosqueável, óleo de linhaça e a solução de KOH $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ previamente preparada, na proporção de 0,25 mL desta solução por miligrama de óleo. Os tubos foram tampados e aquecidos em banho-maria a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, por 3 horas.

Após o resfriamento dos tubos, foi adicionado HCl $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, na proporção 0,05 mL por mg de amostra, seguidos da adição de 3 mL de hexano, 3 mL de éter e 2 mL de água destilada. Os tubos foram fechados e vigorosamente agitados, sendo mantidos em repouso por alguns minutos até completa separação das fases. A seguir foi coletada a fase superior, a qual foi transferida para uma coluna contendo sulfato de sódio anidro, com a altura do leito de 3 cm, preparada em uma pipeta Pasteur de vidro. A eluição foi repetida com a adição de 3 mL da solução hexano-éter 1:1 (v/v).

4.2.8 Fracionamento de ácidos graxos pela formação de adutos com ureia

Cerca de 50 g de ureia foram pesadas em um béquer, seguidos da adição de 50 mL de água e 100 mL de etanol. Após a solubilização, foi adicionada mais ureia até formar uma solução saturada. A seguir, a solução foi aquecida até cerca de $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e depois da sua solubilização, resfriada em temperatura ambiente para sua cristalização. A solução foi filtrada, e os cristais de ureia foram levados à estufa, a uma temperatura de $105 \text{ }^\circ\text{C}$, permanecendo durante duas horas para a remoção da umidade (VOGUEL, 1987).

O fracionamento dos ácidos graxos pela formação de adutos com a ureia foi realizado conforme método descrito por Oliveira (2013). Foram pesados em um béquer 12 g de ureia recristalizada, seguidos da adição de 130 mL de etanol absoluto. A ureia foi solubilizada por meio de aquecimento à $50 \text{ }^\circ\text{C}$, com agitação. Pesou-se em outro béquer $3,000 \pm 0,0100 \text{ g}$ da mistura de ácidos graxos livres, a

qual foi adicionada a solução de ureia em etanol preparada previamente. A mistura foi coberta com filme de PVC, para evitar evaporação do álcool e a entrada de contaminantes, sendo mantida sobre a bancada do laboratório até alcançar 25 °C. Após atingir esta temperatura, a mistura foi colocada imediatamente em geladeira (5 °C) permanecendo por 2 h. Em seguida, o béquer foi retirado da geladeira e colocado em freezer (- 18 °C), permanecendo por 19 horas.

Os adutos de ureia foram filtrados a vácuo, sendo lavados com n-hexano. O filtrado foi transferido para um funil de separação ao qual foram adicionados 60 mL de n-hexano e 30 mL de água destilada, seguidos de agitação. A mistura foi deixada em repouso até a completa separação das fases. A fase inferior foi coletada em um béquer, sendo submetida a uma segunda extração. A fase superior contendo os ácidos graxos livres foi coletada em balão de fundo chato, sendo submetida à concentração em evaporador rotativo, a 36 °C. A mistura obtida foi submetida a fluxo de nitrogênio para a eliminação do solvente remanescente, sendo armazenada em freezer (-18 °C) até a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, conforme o item 4.2.3.

Aos cristais de ureia foram adicionados 60 mL de água destilada e 30 mL de n-hexano. A mistura foi transferida para um funil de separação, sendo agitada em seguida. Após a separação das fases, a inferior foi coletada em um béquer, sendo submetida a uma segunda extração. A fase superior foi coletada e submetida à concentração em evaporador rotativo, a 36 °C. A mistura obtida foi submetida a fluxo de nitrogênio para a eliminação do solvente remanescente, sendo armazenada em freezer (-18 °C) até a preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos, conforme o item 4.2.3.

4.2.9. Avaliação da atividade antioxidante

A partir da solução estoque do radical ABTS em meio aquoso, foi preparada uma solução contendo persulfato de potássio na concentração de 2,45 mmol L⁻¹ e ABTS 7,0 mmol L⁻¹, conforme descrito por Re et al., (1999). A solução de ABTS obtida foi diluída em etanol até se obter a absorvância de 0,70 ± 0,02 em 734 nm. As misturas de isômeros foram preparadas nas concentrações 40, 80 e 120 mg mL⁻¹ em etanol sendo adicionadas 100 µL destas soluções e 3 mL da solução de ABTS em etanol. A medida da absorvância foi feita após 6min, em 734 nm. Como padrão foi

utilizado o ácido-6-hidroxi-2,5,7-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), sendo que a curva padrão foi preparada a partir de solução estoque $2,000\text{mmol L}^{-1}$ em etanol, com as concentrações de 100, 500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Utilizou-se álcool etílico como branco para calibrar o espectrofotômetro.

A partir de leitura das absorvâncias, determinaram-se os valores de equivalente Trolox de cada amostra.

4.2.10. Avaliação da atividade antimicrobiana

Testou-se a atividade inibitória das oito amostras anteriormente preparadas de isômeros de ácidos linoleico e linolênico conjugados, e de uma amostra de ácido graxo livre não isomerizado sobre o crescimento dos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458); *Bacillus cereus* (ATCC 11778); *Salmonella typhi* (ATCC 06539) e *Escherichia coli* (ATCC 10536), por meio do teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima, em microplaca com 96 poços, de acordo com as normas do CLSI (2003), (Clinical & Laboratory Standards Institute).

4.2.10.1 Padrão de turbidez para a preparação dos inóculos

Para padronizar a densidade dos inóculos, utilizou-se um controle de turbidez de sulfato de bário (BaSO_4), equivalente a uma solução padrão McFarland de 0,5. A solução padrão McFarland de 0,5 de BaSO_4 foi preparada acrescentando-se uma alíquota de 0,5mL de BaCl_2 de $0,048\text{ mol L}^{-1}$ (1,175% (p/v) $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) a 99,5 mL de H_2SO_4 de $0,18\text{ mol L}^{-1}$ (1% v/v), mexendo constantemente para manter a suspensão.

A densidade correta do controle de turbidez foi verificada usando um espectrofotômetro com fonte de luz de 1cm e cubetas apropriadas para determinar a absorvância. A absorvância em 625 nm deve variar de 0,08 a 0,10 para a solução padrão McFarland de 0,5.

A suspensão de sulfato de bário foi transferida, em alíquotas de 4 a 6 mL, para tubos com tampas de rosca do mesmo tamanho usado para cultivar e diluir o inóculo bacteriano.

Esses tubos permaneceram armazenados em local escuro, a temperatura ambiente. O controle de turbidez de sulfato de bário foi agitado vigorosamente num misturador mecânico tipo vortex antes de cada uso, verificando-se se estava uniformemente túrbido. No caso de partículas maiores, o controle deveria ser substituído.

4.2.10.2 Preparo e padronização dos microrganismos

Para cada um dos microrganismos testados, foram selecionados em placa de ágar Mueller Hinton (MH) de três a cinco colônias isoladas, do mesmo tipo morfológico de cultura, tocando-se o topo de cada colônia com uma alça e transferindo-se os microrganismos para tubos distintos, previamente identificados com o nome do microrganismo contendo 4 mL de caldo Mueller Hinton. Na sequência incubou-se por 24 horas a 35°C.

Ajustou-se a turbidez das culturas em caldo em crescimento ativo com solução salina estéril, de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão McFarland de 0,5. Isso resultou numa suspensão contendo aproximadamente de $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹. Para realizar essa operação empregou-se luz ambiente suficiente para comparar o tubo com salina mais inóculo e a solução padrão McFarland de 0,5.

As culturas padronizadas anteriormente foram diluídas na proporção de 1:20 em caldo Mueller Hinton (transferindo-se 50 µL da cultura padronizada para tubo eppendorf estéril e adicionando 950 µL do caldo). Estas culturas diluídas 1:20 foram inoculadas nas microplacas.

4.2.10.3 Preparo dos ácidos graxos para análises antimicrobianas

Pesou-se separadamente 40 mg de cada amostra de ácidos graxos em tubos *eppendorfs* previamente esterilizados. Para a solubilização ideal dos ácidos graxos no caldo MH, utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO). Pipetou-se em cada tubo *eppendorf* 30 µL de DMSO 100%. Agitou-se em vortex até completa solubilização. Completou-se o volume para 1000 µL com caldo MH.

4.2.10.4 Preparo do Controle positivo

Pesou-se em eppendorf estéril 1mg do antimicrobiano ampicilina. Solubilizou-se em 30 μL de DMSO. Completou-se volume para 1000 μL com caldo MH (970 μL). Posteriormente esta solução foi diluída na proporção 1:4, para ser utilizada na microplaca: em tubo *eppendorf* estéril pipetou-se 300 μL de caldo MH e 100 μL da solução de ampicilina.

4.2.10.5 Preparo do Controle do DMSO

Pipetou-se 30 μL de DMSO em tubo *eppendorf* estéril e acrescentou-se 970 μL de caldo MH, agitou-se em vortex. Pipetou-se 100 μL nas cavidades da primeira linha da microplaca de teste de DMSO, realizou-se a diluição seriada e posteriormente adicionaram-se os inóculos bacterianos, para avaliar se a presença de DMSO no meio seria capaz de inibir ou não o crescimento microbiano.

4.2.10.6 Teste da Concentração Inibitória Mínima

Para realização do teste de Concentração Inibitória Mínima por meio de microdiluição em caldo, utilizou-se microplacas estéreis de 96 cavidades. Dispensou-se em cada cavidade, com auxílio de micropipeta multicanal, 100 μL de caldo MH. Posteriormente, na primeira linha da microplaca, pipetou-se separadamente e em cavidades distintas e identificadas, 100 μL das soluções previamente preparadas das amostras isomerizadas, e uma amostra não isomerizada, todas na concentração inicial de 40 mg mL^{-1} . Realizou-se diluição em série, com auxílio de micropipeta multicanal, homogeneizou-se simultaneamente as cavidades da primeira linha da microplaca, por meio de repetições de aspiração e devolução da mistura na cavidade. Pipetou-se 100 μL de cada cavidade da primeira linha e transferiu-se para as cavidades correspondentes da segunda linha. Homogeneizou-se e repetiu-se o mesmo procedimento até a penúltima linha da microplaca, sendo que nesta, após homogeneizar, pipetou-se os 100 μL e descartou-se, uma vez que a última linha de cada microplaca foi utilizada como controle de crescimento do microrganismo, por conter apenas caldo MH e o inóculo que posteriormente foi distribuído.

Ao finalizar a diluição seriada, distribuiu-se os inóculos anteriormente diluídos (1:20), sendo pipetado 10µL para cada cavidade, previamente definida, de maneira que foram testadas as atividades inibitórias das amostras isomerizadas sobre o crescimento das bactérias citadas, e uma amostra de ácido graxo livre não isomerizado de óleo de linhaça. Após a distribuição, as microplacas foram acondicionadas em pote plástico com tampa, contendo um chumaço de algodão umedecido, com o objetivo de evitar o ressecamento das cavidades durante o período de incubação que foi de 24 horas a 35°C. Os testes foram realizados em triplicata.

Após o período de incubação, verificou-se visualmente se houve inibição do crescimento microbiano ou não. O crescimento foi constatado pela turvação do meio de cultura. E confirmado posteriormente com adição do corante CTT (cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio) a 2%.

4.2.10.7. Teste de Concentração Bactericida Mínima

Para determinar a Concentração Bactericida Mínima utilizaram-se as amostras de ácidos graxos que resultaram na inibição do crescimento microbiano. De maneira asséptica, foram transferidas de cada uma das cavidades em que não foi observado crescimento uma alçada para placa contendo Ágar Mueller Hinton, sendo inoculadas por meio de estrias na superfície do ágar. Cada estria foi devidamente identificada, com o objetivo de verificar posteriormente se tal concentração teria atividade bactericida, pela ausência de crescimento, ou apenas inibitória, quando houvesse crescimento sobre a estria. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Após este período, procedeu-se a leitura. O surgimento de colônia de bactéria indicou que essa não foi capaz de matar 99,9% ou mais do inóculo bacteriano utilizado. Os ensaios foram realizados em triplicata.

4.2.10.8 Confirmação da Atividade Inibitória

Após transferir-se uma alçada de cada uma das cavidades em que não houve crescimento, realizou-se a confirmação da atividade inibitória nas cavidades inoculadas, pela adição de 10 µL de cloreto de 2,3,5-trifenil-tetrazólio (CTT) a 2% a

cada poço para a detecção da mudança de cor do CTT (incolor) para vermelho, que reflete o metabolismo bacteriano ativo. A CIM foi definida como a concentração mais baixa do ácido graxo que visivelmente inibiu o crescimento bacteriano.

4.2.11. Análise Estatística

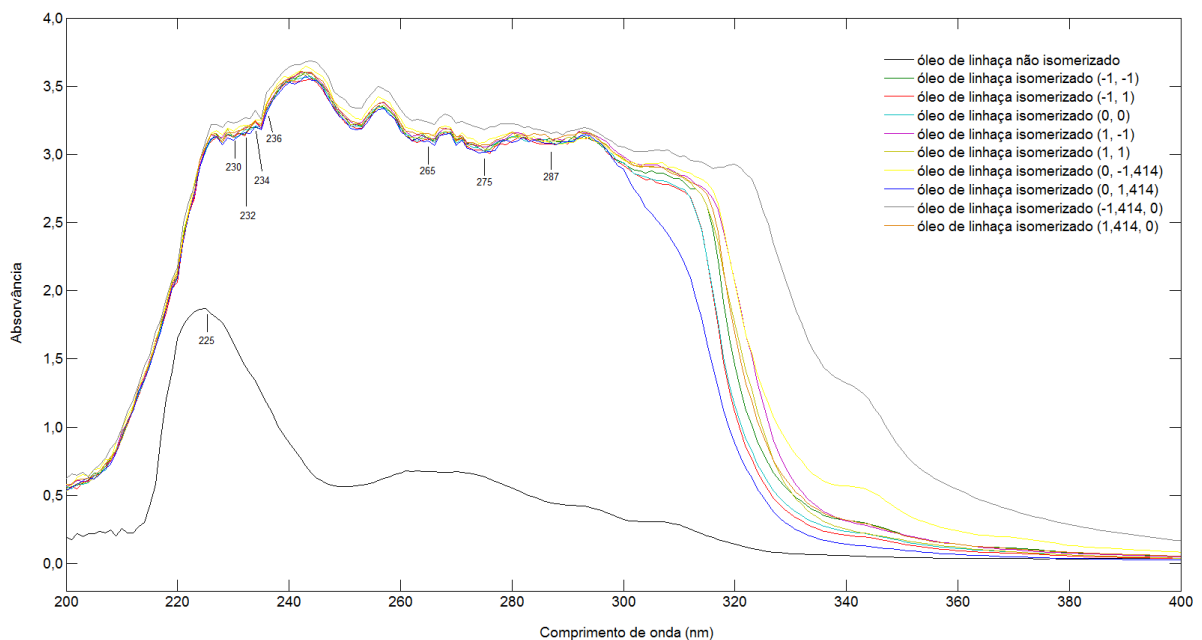
A modelagem e a construção das linhas de contorno foram realizadas através do software Statistica, versão 10.0 (2011). Em todas as análises foi utilizado o nível de significância de 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESPECTROSCOPIA NO ULTRAVIOLETA

A comparação dos espectros obtidos na região UV-VIS é utilizada para detectar ou confirmar a presença de ácidos graxos contendo duplas ligações conjugadas em óleos naturais (CHRISTIE, 1989). No presente estudo compararam-se os espectros para os EMAG isomerizados e não isomerizados, sendo possível verificar que o espectro modificou após a isomerização (Figura 8). Houve aumento da absorção na região de 248 a 318 nm, sendo observado um deslocamento do comprimento de onda máximo, em relação ao espectro dos EMAG não isomerizados, cuja absorção máxima ocorreu em 225 nm.

Figura 8 – Espectros UV-Vis dos EMAG de óleo de linhaça isomerizado (-1, -1) e não isomerizado.



Fonte: autoria própria

Absorções características de ácidos graxos conjugados com duas duplas ligações conjugadas ocorrem em 232 e 236 nm para o CLA 9c, 11t, e em 230 e 234 nm para o CLA 9t, 11t. Para trienos conjugados as absorções ocorrem em 265, 275 e 287 nm para o CLNA 9c, 11t, 13c e em 262, 273 e 284 nm para o CLNA 9c, 11t, 13t e em 259, 268 e 279 nm para o CLNA 9t, 11t, 13t (HUSAIN; DEVI, 1993).

Buchade et al., (2016), realizaram o isolamento do ácido puníco (18:3 9c, 11t, 13c) e verificaram que houve absorção na região do espectro de 265, 275 e 287

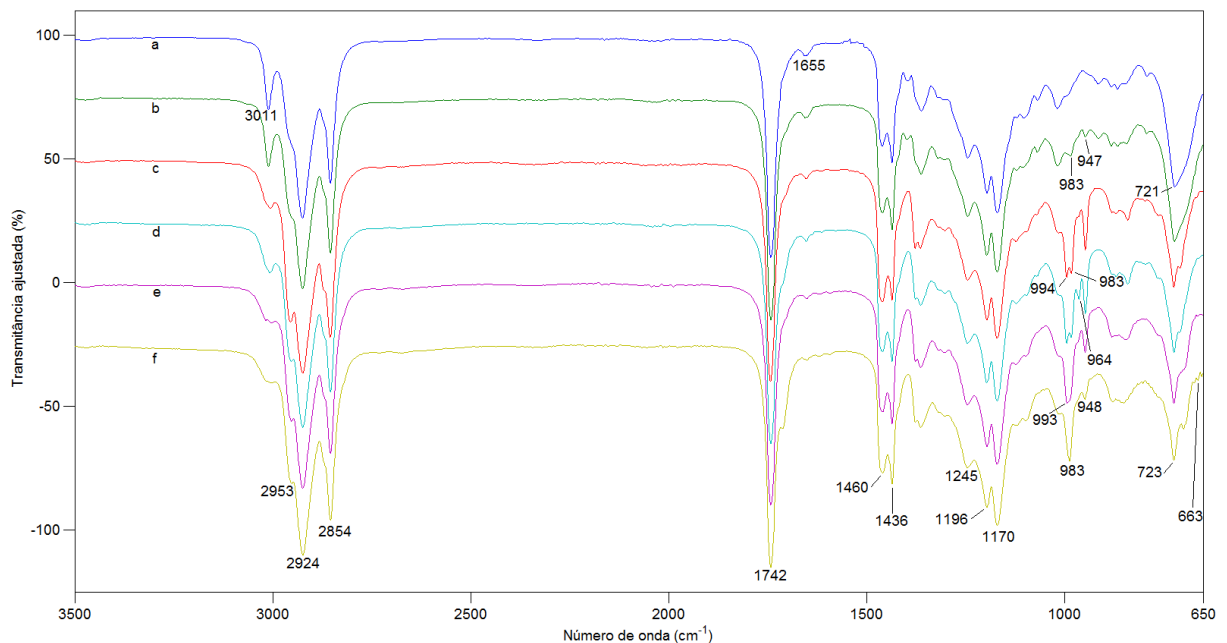
nm. Lakshmlnarayana et al., (1988), realizando testes com ácido puníco também obtiveram os mesmos resultados de absorção do espectro UV.

Dessa forma, os resultados obtidos indicam a formação de duplas ligações conjugadas na reação de isomerização.

5.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO

Em relação aos espectros no infravermelho obtidos nas condições dos pontos fatoriais (Figura 9), foi possível observar diversas bandas características, como em 1742 cm^{-1} , que foi a mais intensa para os espectros no infravermelho dos ésteres metílicos do óleo de linhaça isomerizado e não isomerizado. Esta banda está associada ao estiramento $\text{C}=\text{O}$, de carbonila de éster.

Figura 9 – Espectros no infravermelho para ésteres metílicos: a) óleo de linhaça; b) óleo de linhaça isomerizado (-1, -1); c) óleo de linhaça isomerizado (-1, 1); d) óleo de linhaça isomerizado (0,0); e) óleo de linhaça isomerizado (1, -1); f) óleo de linhaça isomerizado (1, 1).



Fonte: autoria própria

Na região de $3011\text{ a }2854\text{ cm}^{-1}$ foram observadas bandas bastante intensas. As bandas em $2924\text{ e }2854\text{ cm}^{-1}$ estão relacionadas, respectivamente, com os estiramentos assimétrico e simétrico dos grupos metilênicos (C-H). Em 2956 cm^{-1} ocorre o estiramento assimétrico dos grupos metila (C-H), e em 3011 cm^{-1} o estiramento $=\text{C-H}$ de duplas ligações *cis* (GUILLÉN; CABO, 1998). Houve a diminuição da intensidade da banda em 3011 cm^{-1} para as condições mais vigorosas

da reação de isomerização, este comportamento indica a diminuição do número de duplas ligações *cis*.

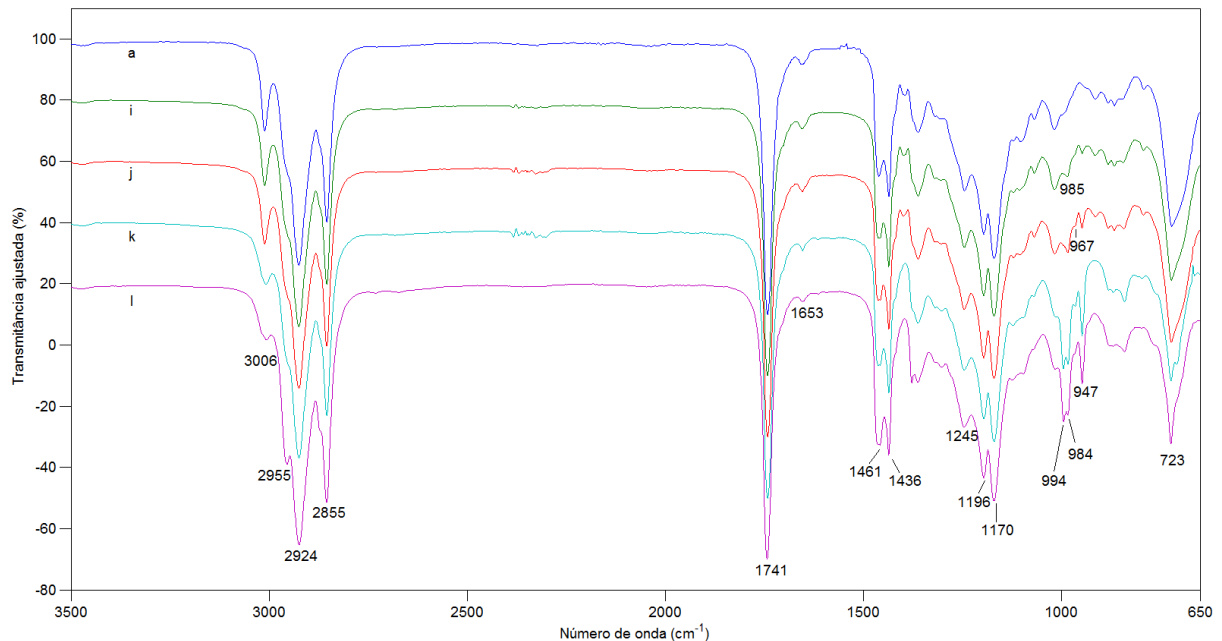
A banda fraca em 1655 cm^{-1} corresponde ao estiramento C=C de duplas ligações *cis* (de la MATA et al., 2012). Esta banda teve a sua intensidade diminuída para as condições de isomerização mais vigorosas, sendo quase imperceptível para a condição de $185\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 25 % de catalisador (Figura 8). Em 1462 cm^{-1} ocorre a banda relacionada à deformação angular simétrica de CH_2 e em 1436 cm^{-1} à deformação angular de $-\text{OCH}_3$. Esta banda indica a presença de ésteres metílicos, podendo ser utilizada para monitorar a reação de obtenção (O'DONNELLI et al., 2013).

As bandas na região de 1245 a 1100 cm^{-1} estão relacionadas com estiramentos da ligação C-O. Em 1245 e 1163 cm^{-1} ocorre a sobreposição com a banda de deformação dos grupos metilênicos (GUILLÉN; CABO, 1998). Em todas as condições utilizadas na isomerização do óleo de linhaça foram observadas bandas na região de 985 - 994 cm^{-1} e 948 cm^{-1} , com as menores intensidades de transmitância sendo observadas para as condições mais vigorosas da reação de isomerização. Nesta região ocorre a deformação fora do plano (C-H) de hidrogênios olefínicos de duplas ligações *trans* (ROACH et al., 2002). Mossoba et al., (1991), após separar isômeros conjugados do ácido linoleico com a configuração *cis-trans*, formados durante a hidrogenação parcial de óleo de soja, observaram bandas em 986 e 950 cm^{-1} . Para os isômeros conjugados com a configuração *trans-trans* foi observada somente uma banda em 990 cm^{-1} . Dessa forma, a ocorrência de bandas nessa região indica a presença de duplas ligações conjugadas com a configuração *cis-trans* e *trans-trans*.

Em 721 cm^{-1} ocorre a deformação fora do plano (C-H) dos hidrogênios olefínicos das duplas ligações *cis* (GUILLÉN; CABO, 1998). Houve um considerável aumento da transmitância dessa banda para as condições de isomerização que utilizaram as temperaturas de 160 e $185\text{ }^{\circ}\text{C}$. A banda de intensidade muito baixa em 663 cm^{-1} , está relacionada com a formação de ácidos graxos cíclicos, contendo o ciclohexeno em sua estrutura (MOSSOBA et al., 1996). A ciclização intramolecular de ácidos graxos poli-insaturados ocorre quando o óleo é submetido a altas temperaturas durante um longo período ou em outras condições abusivas (MOSSOBA et al., 1995).

Na Figura 10 são apresentados os espectros no infravermelho para os pontos axiais. É possível verificar um comportamento semelhante ao dos espectros da Figura 9.

Figura 10 – Espectros no infravermelho para ésteres metílicos do óleo de linhaça: a) não isomerizado; i) isomerizado (0, -1,414); j) isomerizado (-1,414, 0); k) isomerizado (1,414, 0); l) isomerizado (0, 1,414).



Fonte: autoria própria

Siano et al., (2016), ao estudar o óleo de romã, que contém o ácido puníico (18:3 9c, 11t, 13c) como principal ácido graxo (55,3 %), verificaram que o óleo apresentou bandas em 987 e 936 cm^{-1} . Após a transesterificação do óleo, realizada por catálise ácida (HCl 1,25 mol L^{-1} , a 90 $^{\circ}\text{C}$ por 1 h) houve o deslocamento da banda de 987 para 992 cm^{-1} . Entretanto, ao realizar a esterificação a 50 $^{\circ}\text{C}$ (HCl 1,25 mol L^{-1} , 1 h) foi verificado que não ocorreu alteração da banda em 987 cm^{-1} . A alteração observada no espectro foi atribuída pelos autores à isomerização das duplas ligações que foram convertidas a configuração *trans*, que é termodinamicamente mais estável que a configuração *cis*.

Meiorin et al., (2015), obtiveram espectros na região do infravermelho médio para o óleo de tungue, cujos teores de ácido alfa-eleosteárico (18:3 9c, 11t, 13t) variam de 77 a 82 %. Foi observado tanto para o óleo como para os ésteres metílicos, a banda intensa em 991 cm^{-1} . Os espectros também apresentaram uma banda bem próxima a esta, de baixa intensidade, com número de onda inferior a 991 cm^{-1} , que não foi identificada pelos autores. Nesse sentido, Yurawecz et al., (1993),

ao estudar o ácido alfa-eleosteárico, por cromatografia gasosa associada à espectroscopia no infravermelho, observaram a ocorrência de bandas em 995 e 968 cm^{-1} . Para o ácido beta-eleosteárico (18:3 9*t*, 11*t*, 13*t*) estes autores verificaram somente uma banda em 998 cm^{-1} .

Os resultados obtidos pela análise das amostras neste estudo confirmaram que houve formação de ácidos graxos com duplas ligações conjugadas, nas configurações *cis-trans* e *trans-trans*, indicando que as condições utilizadas promoveram a isomerização dos ácidos graxos do óleo de linhaça.

5.3 GRAU DE ISOMERIZAÇÃO

O grau de isomerização dos ácidos linoleico (18:2 n-6) e alfa-linolênico (18:3 n-3) variou de 7,2 a 99,7 % e de 24,5 a 99,9 %, respectivamente, para as condições reacionais utilizadas (Tabela 4). Nas condições em que a temperatura e a concentração do catalisador foram menores, a isomerização dos ácidos graxos conjugados 18:2 (CLA) e 18:3 (CLNA) ocorreu em uma proporção menor. Em condições mais vigorosas houve isomerização quase total destes ácidos graxos. A razão entre o grau de isomerização dos ácidos alfa-linolênico e linoleico variou de 1,0 a 3,4, indicando que nas condições reacionais que foram mais brandas, a seletividade da isomerização do ácido alfa-linolênico foi até 3,4 vezes maior em relação a isomerização do ácido linoleico.

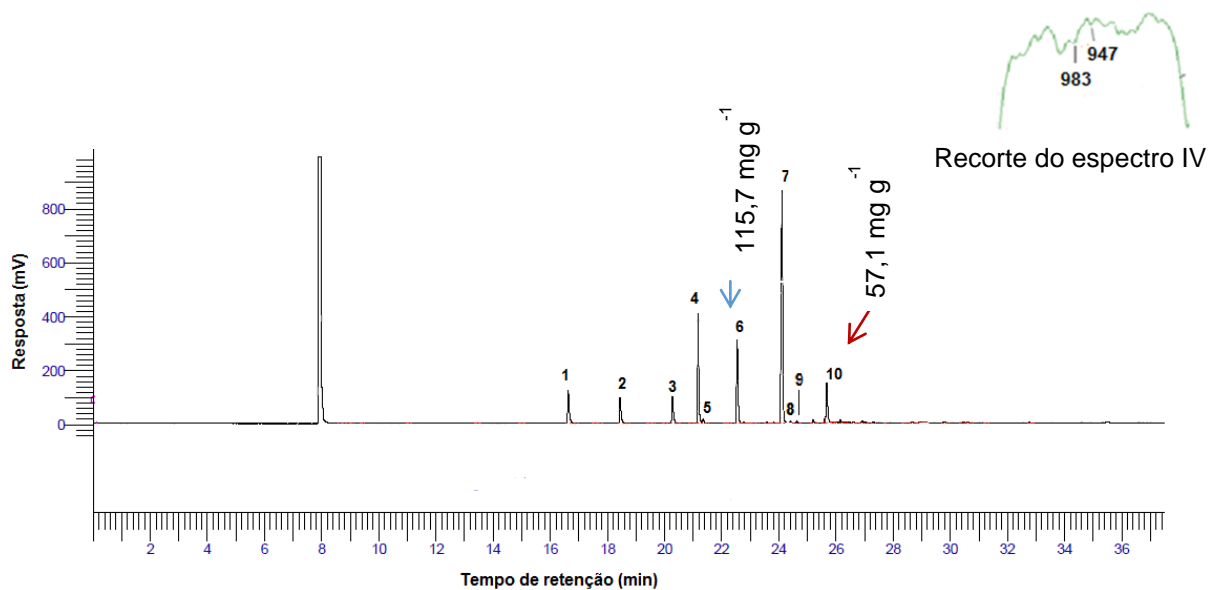
Tabela 4 – Graus de isomerização dos ácidos 18:2n-6 e 18:3n-3

Amostra	Grau de isomerização (%)		(GI 18:3n-3)/(GI 18:2n-6)
	18:2 n-6	18:3n-3	
1 (-1;-1)	12,68	28,90	2,28
2 (-1;+1)	88,61	99,77	1,13
3 (0,0)*	99,31	99,84	1,01
4 (+1;-1)	99,45	99,94	1,01
5 (+1;+1)	99,72	99,81	1,00
6 (0;-1,414)	7,16	24,47	3,42
7 (0;+1,414)	99,43	99,61	1,00
8 (-1,414; 0)	11,99	33,91	2,83
9 (+1,414; 0)	94,80	99,90	1,05

*Corresponde à média de quatro repetições do ponto central
Fonte: autoria própria

A Figura 11 apresenta o cromatograma de ésteres metílicos para a condição do ponto fatorial (-1, -1). O principal isômero formado, designado X1 por não ter sido identificado, corresponde a um produto da isomerização do ácido alfa-linolênico, uma vez que a sua concentração (57,1 mg g⁻¹ do óleo isomerizado) somada a concentração remanescente do ácido linoleico (115,70 mg g⁻¹ do óleo isomerizado) foi muito superior a concentração do ácido linoleico no óleo de linhaça (132,5 mg g⁻¹).

Figura 11 – Cromatograma de ésteres metílicos óleo de linhaça isomerizado a 135 °C com 15 % de catalisador (-1, -1); (1) 16:0; (2) 17:0 (padrão interno); (3) 18:0; (4) 18:1n-9; (5) 18:1n-7; (6) 18:2n-6; (7) 18:3 n-3; (8) 18:2 9c, 11t, (9) 18:2 10t, 12c; (10) X1 (não identificado).



Fonte: autoria própria

Além disso, os CLAs 18:2 9c, 11t e 18:2 10t, 12c eluíram antes de X1. Considerando que a análise desta mistura de ésteres metílicos pela espectroscopia no infravermelho apresentou duas bandas na região de deformação fora do plano de hidrogênios olefínicos de duplas ligações *trans* (983 e 948 cm⁻¹), foi possível inferir com base nos estudos de Mossoba et al., (1995) e Fritsche et al., (1997), que este isômero apresenta duas duplas ligações conjugadas com as configurações *cis-trans*.

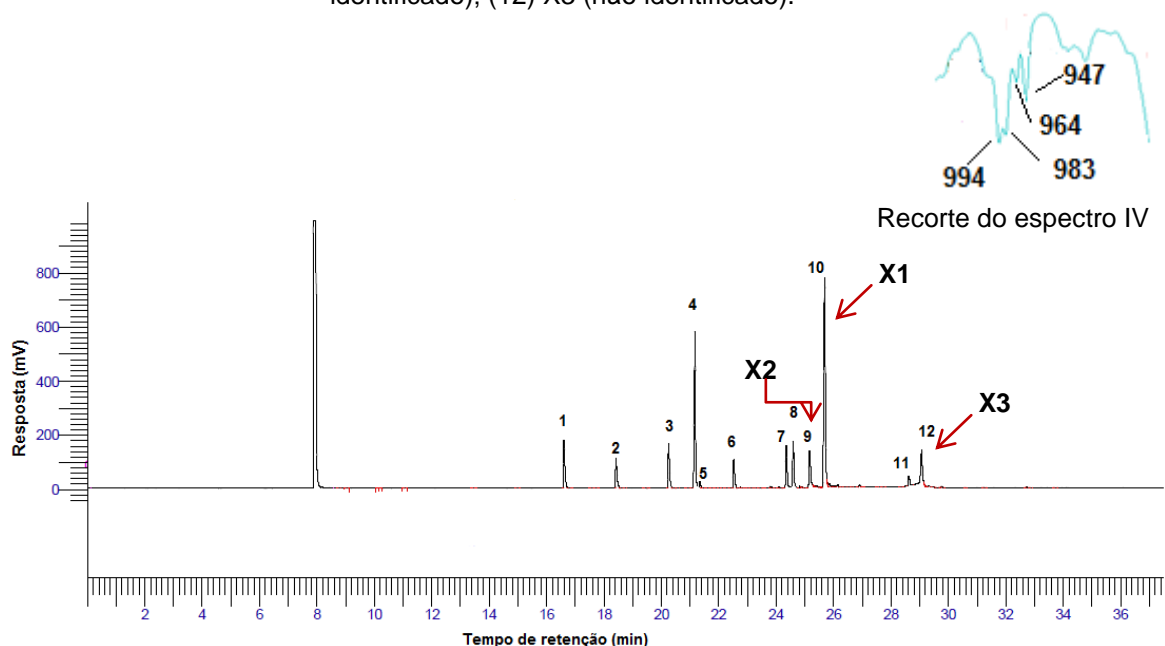
As amostras 6 (0, -1,414) e 8 (-1,414, 0) (Tabela 4) também apresentaram X1 como principal isômero formado (Apêndice A e B). Os espectros no infravermelho para estas amostras apresentaram bandas em 947 e 985 cm⁻¹, que estão relacionadas com duplas ligações conjugadas *cis-trans*.

Galvez et al., (2008), ao realizarem a isomerização do óleo de linhaça (8 - 25 %) em meio aquoso (70 - 90 %), utilizando hidróxido de potássio como

catalisador (3 - 7%) obtiveram como principais isômeros a mistura de CLNA constituída de 18:3 9*c*, 11*t*, 15*c* e 18:3 9*c*, 13*t*, 15*c*, que eluiu como um único pico. Na análise por cromatografia gasosa realizada por estes pesquisadores esta mistura eluiu depois dos CLA 18:2 9*c*, 11*t* e 18:2 10*t*, 12*c*. Com base nestas semelhanças provavelmente X1 possa ser uma mistura contendo os isômeros 18:3 9*c*, 11*t*, 15*c* e 18:3 9*c*, 13*t*, 15*c*.

A Figura 12 apresenta o cromatograma de ésteres metílicos para a condição do ponto central do planejamento fatorial (20 % de catalisador e 160 °C). O principal isômero formado foi X1, sendo observado também a formação dos isômeros X2 e X3. O espectro no infravermelho para esta condição de isomerização (Figura 8d) apresentou bandas em 947 e 983 cm^{-1} , indicando a presença de isômeros com duas duplas ligações conjugadas *cis-trans* (MOSSOBA et al., 1995). Também foram observadas as bandas em 994 cm^{-1} e 964 cm^{-1} , o que sugere a formação de um isômero com três duplas ligações conjugadas, sendo duas insaturações adjacentes com a configuração *trans* e uma *cis*, conforme descrito por Yurawecz et al., (1993), para o ácido alfa-eleosteárico (18:3 9*c*,11*t*,13*t*) e outros ácidos octadecatrienóicos conjugados com a configuração *ctt*.

Figura 12 – Cromatograma de ésteres metílicos óleo de linhaça isomerizado a 160 °C com 20 % de catalisador - (0, 0); (1) 16:0; (2) 17:0 (padrão interno); (3) 18:0; (4) 18:1n-9; (5) 18:1n-7; (6) 18:2n-6; (7) 18:2 9*c*,11*t*; (8) 18:2 10*t*,12*c*; (9) X2 (não identificado); (10) X1 (não identificado); (11) (não identificado); (12) X3 (não identificado).



Fonte: autoria própria

Com o propósito de avaliar as características de X2 e X3, foi realizado o fracionamento da amostra 3, por meio da formação de adutos com ureia, sendo determinada a concentração dos ácidos graxos nas frações sólida e líquida (Tabela 5).

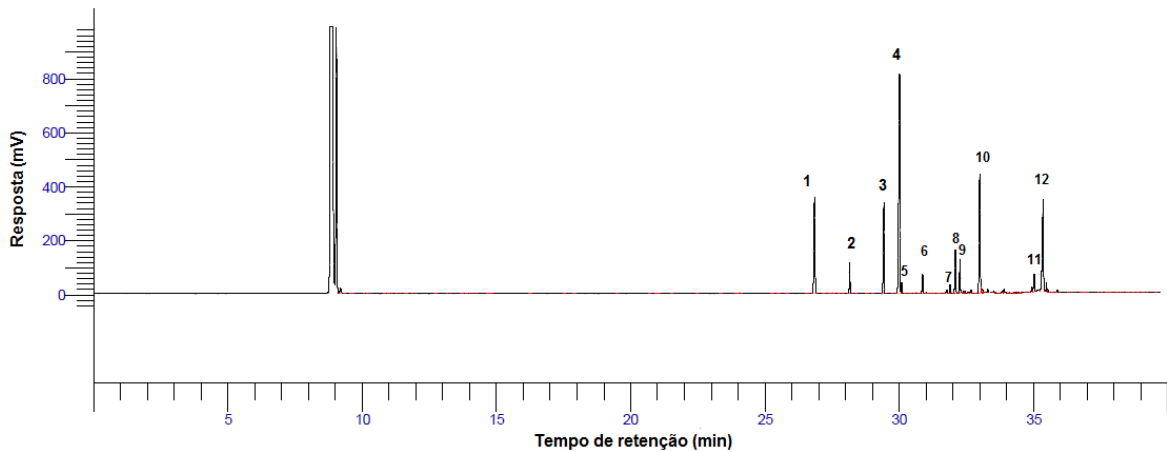
Tabela 5 – Concentração dos principais ácidos graxos do óleo de linhaça isomerizado (0, 0) e após o seu fracionamento com ureia

Ácido graxo	Concentração (mg g ⁻¹)		
	Após isomerização	Após o fracionamento com ureia	
		Adutos de ureia	Fração líquida
16:0	54,31 ± 1,76	120,73 ± 5,80	17,54 ± 3,38
18:0	46,57 ± 3,09	99,75 ± 6,90	13,91 ± 2,68
18:1n-9	177,95 ± 1,17	291,33 ± 14,70	127,01 ± 12,49
18:2n-6	32,33 ± 1,90	19,72 ± 0,90	52,08 ± 3,16
18:2 9c,11t	44,89 ± 1,04	44,89 ± 2,09	46,22 ± 2,67
18:2 10t,12c	50,06 ± 0,45	39,58 ± 1,89	58,68 ± 3,24
X1	261,77 ± 21,05	136,05 ± 6,46	317,03 ± 30,68
X2	54,37 ± 4,79	5,14 ± 0,25	79,01 ± 4,36
X3	90,52 ± 3,66	168,87 ± 7,70	34,35 ± 3,39

Fonte: autoria própria

Foi observado o aumento da concentração dos ácidos palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1n-9) e X3 cujas concentrações aumentaram 122, 114, 64 e 87 %, respectivamente, em relação à concentração na amostra isomerizada. Houve a diminuição da concentração dos ácidos linoleico, 18:2 10t, 12c e X2, cujas concentrações corresponderam 61, 79 e 9,5 %, respectivamente, das concentrações encontradas na amostra 3. O comportamento observado para X2 sugere que este ácido graxo deve ter uma estrutura diferente dos demais ácidos graxos poli-insaturados encontrados nesta mistura isomerizada (Figura 13).

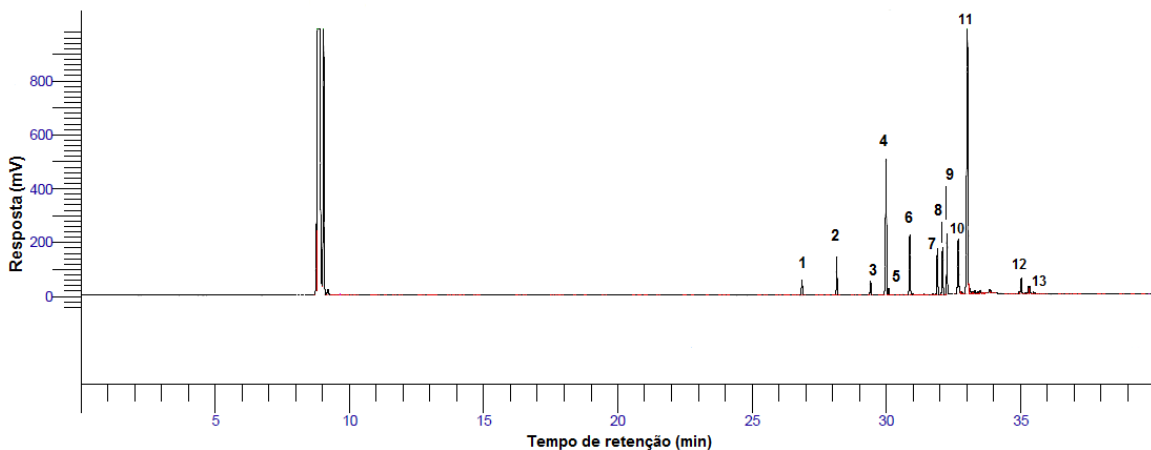
Figura 13 – Cromatograma de ésteres metílicos óleo de linhaça isomerizado a 160 °C com 20 % de catalisador (0, 0) após fracionamento com ureia – fração dos cristais: (1) 16:0; (2) 17:0 (padrão interno); (3) 18:0; (4) 18:1n-9; (5) 18:1n-7; (6) 18:2n-6; (7) 18:3 n-3; (8) 18:2 9c,11t; (9) 18:2 10t,12c; (10) X1(não identificado); (11) (não identificado); (12) X3 (não identificado).



Fonte: autoria própria

Na fração líquida houve a diminuição da concentração dos ácidos palmítico, esteárico, oleico e X3, cujos teores corresponderam a 32, 30, 71 e 38 %, respectivamente, em relação à concentração na amostra isomerizada (Tabela 5). Ocorreu o aumento das concentrações dos ácidos linoleico, 18:2 9c, 11t, 18:2 10t, 12c, X1 e X2, que corresponderam, respectivamente, a 161, 103, 117, 121 e 145 %, da concentração observada na amostra isomerizada (Figura 14).

Figura 14 – Cromatograma de ésteres metílicos óleo de linhaça isomerizado a 160 °C com 20 % de catalisador - (0, 0) após fracionamento com ureia – fração líquida(1) 16:0; (2) 17:0 (padrão interno);(3) 18:0; (4) 18:1n-9; (5) 18:1n-7;(6) 18:2n-6; (7) 18:3 n-3;(8) 18:2 9c, 11t; (9) 18:2 10t, 12c; (10) X2 (não identificado); (11) X1 (não identificado); (12) não identificado; (13) X3 (não identificado).



Fonte: autoria própria

A ureia cristaliza em uma estrutura tetragonal com canais de 5,67 Å de diâmetro (HARRIS, 1996). Na presença de moléculas de cadeia longa, a ureia cristaliza em uma estrutura hexagonal, formando canais de 8 a 12 Å de diâmetro. Os canais são suficientes para acomodar compostos de cadeia alifática com números de carbono maior do que seis. A presença de insaturações na cadeia carbônica com a configuração *cis* aumenta o volume ocupado pela molécula, diminuindo a probabilidade de inserção dos compostos nos canais dos cristais de ureia, o que permite o fracionamento de misturas de ácidos graxos (GU et al., 2009). Quando a etapa de resfriamento da mistura de ureia e ácidos graxos é mais lenta a seletividade do fracionamento é aumentada devido a menor formação de cristais tetragonais de ureia, cujos canais não contêm moléculas de ésteres metílicos de ácidos graxos (HAYES et al., 1998).

Nos resultados relatados por Galvez et al., (2008), para a isomerização do óleo de linhaça em meio aquoso, foi verificada a formação do ácido 18:2 11,13-ciclo hexadieno a partir do ácido alfa-linolênico, que eluiu logo após os isômeros conjugados 18:2 9*c*, 11*t* e 18:2 10*t*, 12*c*. Neste estudo, X2 também eluiu após os CLA 18:2 9*c*, 11*t* e 18:2 10*t*, 12*c*. Além disso, o fracionamento da amostra obtida a partir da condição de isomerização 3, mostrou um comportamento distinto para X2 na fração dos adutos de ureia, com a sua concentração diminuindo muito em relação aos demais ácidos graxos poli-insaturados, o que foi compatível com a estrutura de um ácido graxo cíclico. A análise minuciosa do espectro no infravermelho para esta amostra (Figura 9d) indica uma pequena alteração na região de 663 cm⁻¹, que está associada a formação de ácidos graxos cíclicos (MOSSOBA et al., 1995). Assim, pode-se propor que X2 seja um ácido graxo cíclico, formado a partir do ácido alfa-linolênico.

Considerando que o espectro no infravermelho para a amostra 3 (Figura 8d) indicou a presença de um ácido graxo conjugado com a configuração *ctt*, que não corresponde a X1 e X2, é possível que X3 corresponda a um isômero do ácido alfa-linolênico com três duplas ligações conjugadas. Além disso, nas condições de isomerização do óleo de linhaça empregadas por Galvez et al., (2008), foi obtido alguns isômeros conjugados 18:3 com duplas ligações nos carbonos 9, 11 e 13, que eluíram na análise por cromatografia gasosa, após a mistura dos ácidos 18:3 (9*c*, 11*t*, 15*c* e 9*c*, 13*t*, 15*c*), como ocorreu na análise da amostra 3.

Foi observado também para a fração sólida obtida da recristalização com ureia da amostra 3, que o aumento da concentração de X3 na fração sólida (87 %) foi superior ao obtido para o ácido oleico (64 %). Este comportamento foi favorecido pela presença de duplas ligações *trans*, que conferem ao ácido graxo uma estrutura mais linear, favorecendo a sua inclusão nos canais dos cristais de ureia (SMALL, 1984). Assim, o ácido graxo X3 pode apresentar três duplas ligações conjugadas sendo duas *trans* e uma *cis*.

A isomerização alcalina mostrou ser um método eficaz para produção de CLA e CLNA, porém pelo fato da mistura resultante ser composta por muitos isômeros diferentes, a identificação detalhada destes isômeros torna-se difícil (KOBA et al., 2007). O termo CLNA refere-se ao coletivo e faz referência a um grupo de isômeros do ácido octadecatrienóico (C18:3) com duplas ligações conjugadas. As três duplas ligações presentes nos CLNAs estão principalmente nas posições [9, 11, 13] e [8, 10, 12] e existem tanto na forma *cis* quanto na forma *trans* (SASSANO et al., 2009).

5.3.1 Grau de isomerização do ácido linoleico

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos para os efeitos do teor de catalisador e da temperatura para o grau de isomerização do ácido linoleico. Para o grau de isomerização do ácido linoleico, o efeito linear do teor de catalisador foi um pouco maior que o efeito linear da temperatura, sendo altamente significativos ($p < 0,01$). Os efeitos dos termos quadráticos do teor de catalisador e da temperatura apresentaram valores muito próximos, sendo ambos negativos e com menor significância em relação aos termos lineares ($p < 0,05$).

Para os termos quadráticos, os valores dos efeitos foram negativos e contribuíram para diminuir o grau de isomerização, uma vez que o aumento do teor de catalisador e da temperatura aumentaram o grau de isomerização até o limite de 100 %. O efeito de interação entre o teor de catalisador e a temperatura foi significativo ($p < 0,05$), sendo também negativo. Este efeito resulta do comportamento distinto para o grau de isomerização quando a temperatura está no seu nível baixo e o teor de catalisador passa do nível baixo para o alto, em relação a condição em que a temperatura está no nível alto e o teor de catalisador passa do nível baixo para o alto.

Tabela 6 – Efeitos para grau de isomerização do ácido linoleico

Fatores	Efeito	Erro padrão	Valor p
Teor catalisador (L)	54,25	10,56	0,002146
Teor catalisador (Q)	-35,28	11,81	0,024423
Temperatura (L)	51,17	10,56	0,002871
Temperatura (Q)	-35,38	11,81	0,024151
Teor catalisador (L) x Temperatura (L)	-36,83	14,94	0,048787

(L): linear; (Q): quadrático.

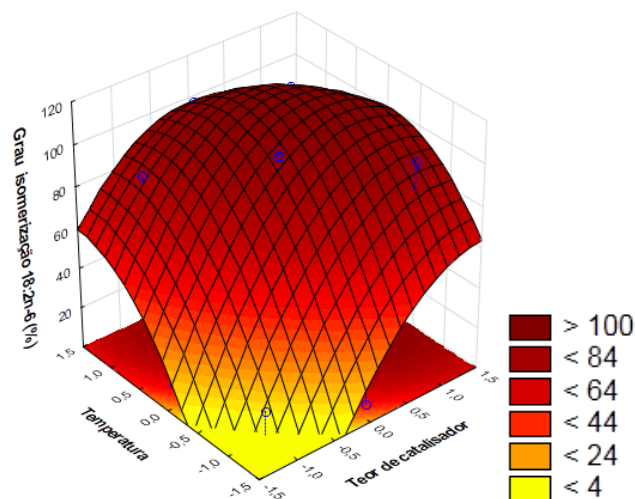
Fonte: autoria própria

O modelo de predição para o grau de isomerização do ácido linoleico foi obtido a partir da análise de regressão (Equação 3), e apresentou o valor de 0,9219 para o coeficiente de determinação (R^2).

$$Y = 99,31 + 27,12.A - 17,64.A^2 + 25,58.B - 17,69.B^2 - 18,41.A.B \quad (3)$$

Onde: Y corresponde ao grau de isomerização para o ácido linoleico; A representa o teor do catalisador; B a temperatura da reação; com a A e B em termos das variáveis codificadas.

Figura 15 – Superfície de resposta para grau de isomerização do ácido 18:2n-6.



Fonte: autoria própria

O gráfico de superfície de resposta para grau de isomerização do ácido linoleico (Figura 15), apresentou os maiores valores para a região compreendida entre 0,3 e 1,0 (21,5 a 25 %) para o catalisador, e 0 a 1,0 (160 e 185 °C) para a temperatura. À medida que se eleva a temperatura e o teor de catalisador, ocorre o

aumento do grau de isomerização, sendo este aumento mais evidente quando um dos fatores está no seu nível baixo e o outro fator passa do nível baixo para o nível intermediário.

5.3.2 Grau de isomerização do ácido alfa-linolênico

Os resultados obtidos para os efeitos do teor de catalisador e da temperatura sobre o grau de isomerização do ácido alfa-linolênico (Tabela 7), indicam que para os termos lineares o efeito da temperatura foi maior que o efeito do teor de catalisador, sendo ambos significativos ($p < 0,01$) e positivos. Os efeitos dos termos quadráticos e de interação foram negativos e menos significativos ($p < 0,05$).

Tabela 7 – Efeitos para grau de isomerização 18:3n-3

Fatores	Efeito	Erro padrão	Valor p
Teor catalisador (L)	41,10	8,37	0,002694
Teor catalisador (Q)	-24,12	9,36	0,042054
Temperatura (L)	44,25	8,37	0,001862
Temperatura (Q)	-28,99	9,36	0,021264
Teor catalisador (L) x Temperatura (L)	-35,50	11,84	0,024113

(L): linear; (Q): quadrático.

Fonte: autoria própria

O modelo para o grau de isomerização do ácido alfa-linolênico dado pela equação 4, em termos dos fatores codificados.

$$Y = 99,84 + 20,55.A - 12,06.A^2 + 22,12.B - 14,49.B^2 - 17,75.A.B \quad (4)$$

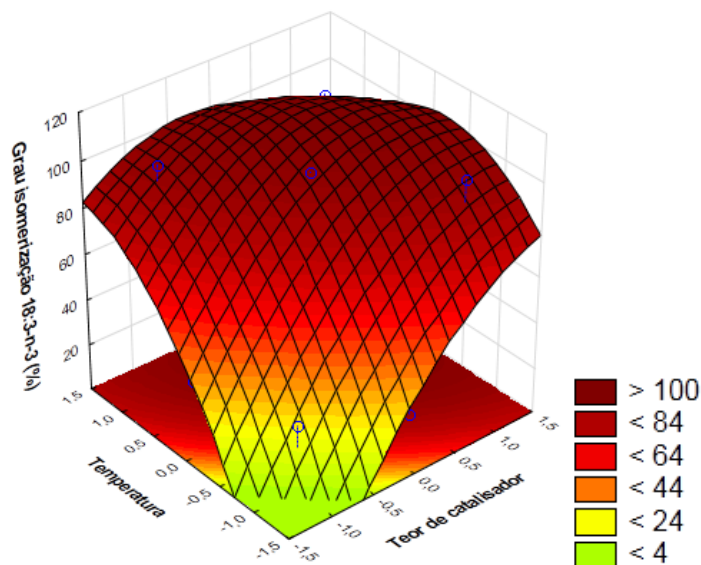
Onde: Y corresponde ao grau de isomerização para o ácido alfa-linolênico; A representa o teor do catalisador; e B a temperatura da reação.

O valor de R^2 para este modelo foi 0,9255, o que significa que 92,55 % da variação total das respostas pode ser explicado pelo modelo obtido a partir da análise de regressão, assim quanto maior o valor do coeficiente de determinação, melhor será o ajuste do modelo às respostas observadas (OLIVEIRA, 2013).

A Figura 16 apresenta a superfície de resposta para o grau de isomerização do ácido alfa-linolênico. O grau de isomerização aumenta com a elevação da temperatura e do teor de catalisador. A região em que o aumento do grau de isomerização é maior está situada entre -1 e 0, tanto para a temperatura como para

o teor de catalisador. Quando o teor de catalisador está no nível baixo, e a temperatura varia do nível baixo para o alto, o grau de isomerização predito pelo modelo passa de 12,9 para 92,6%. De forma semelhante, quando a temperatura está no nível baixo e o teor de catalisador passa do nível baixo para alto, o grau de isomerização varia de 12,9 para 89,5%, demonstrando um comportamento semelhante. Os maiores valores para o grau de isomerização foram encontrados na região compreendida entre -0,8 e 1,4 (16 a 27 %) para o catalisador, e - 0,8 a 1,4 (140 e 195 °C) para a temperatura.

Figura 16 – Superfície de resposta para grau de isomerização 18:3n-3.



Fonte: autoria própria

5.3.3 Formação de CLA

O efeito do termo linear do teor de catalisador foi mais importante que o efeito correspondente da temperatura (Tabela 8), indicando que o teor de catalisador teve uma influência maior sobre a formação de CLA (18:2 9c, 11t e 18:2 10t, 12c) que a temperatura. Os efeitos lineares foram significativos ($p < 0,01$) e tiveram maior importância que os efeitos dos termos quadráticos, que foram negativos e com uma menor significância ($p < 0,05$). O efeito de interação entre o teor de catalisador e a temperatura não foi significativo ($p < 0,05$), podendo ser levado em consideração como sendo apenas marginalmente significativo ($p < 0,10$).

Tabela 8 – Efeitos para formação de CLA

Fatores	Efeito	Erro padrão	Valor p
Teor catalisador (L)	72,88	15,60	0,003429
Teor catalisador (Q)	-46,78	17,44	0,036470
Temperatura (L)	64,30	15,60	0,006207
Temperatura (Q)	-43,99	17,44	0,045201
Teor catalisador (L) x Temperatura (L)	-48,05	22,06	0,072286

(L): linear; (Q): quadrático.

Fonte: autoria própria

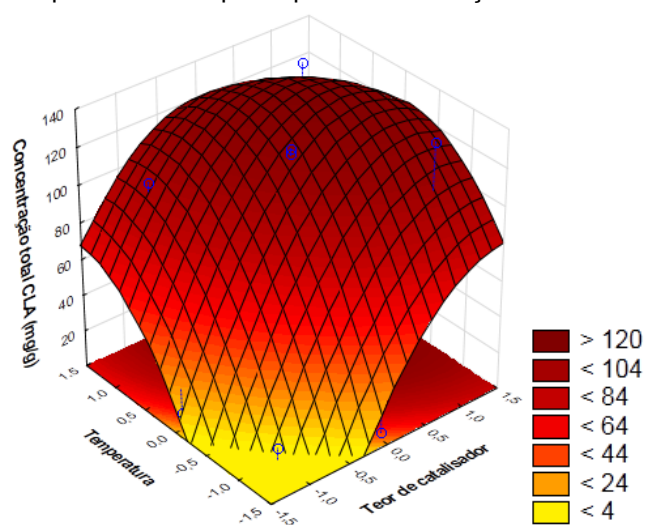
O modelo obtido para formação dos CLA foi dado pela equação 5 e apresentou coeficiente de determinação igual 0,901.

$$Y = 121,89 + 36,44.A - 23,39.A^2 + 32,15.B - 21,99.B^2 - 24,02.A.B \quad (5)$$

Onde: Y = somatório das concentrações dos isômeros 18:2 9c,11t e 18:2 10t,12c; A = teor do catalisador; B = temperatura da reação; com A e B em termos dos fatores codificados.

A superfície de resposta (Figura 17) apresentou uma região em que foi possível obter concentrações próximas do valor máximo previsto pelo modelo (138,9 mg g⁻¹; 22 % de catalisador e 174 °C) para a concentração total de CLA. Esta região está situada entre 0,4 e 0,8 (22 e 24 %) para o teor de catalisador e -0,1 e 0,8 (158 a 180 °C) para a temperatura, cujos valores da resposta variam de 130,3 a 136,7 mg g⁻¹.

Figura 17 – Superfície de resposta para concentração total de CLA (mg g⁻¹)



Fonte: autoria própria

5.3.4 Formação do isômero X1

Os resultados obtidos a partir da análise de variância para os efeitos do teor de catalisador e da temperatura sobre a formação do isômero conjugado X1, mostraram que foram significativos ($p < 0,05$) apenas o efeito do termo linear da temperatura e o efeito do termo quadrático da temperatura (Tabela 9). O efeito negativo do termo quadrático da temperatura significa que em temperaturas elevadas ocorre a diminuição da formação de X1.

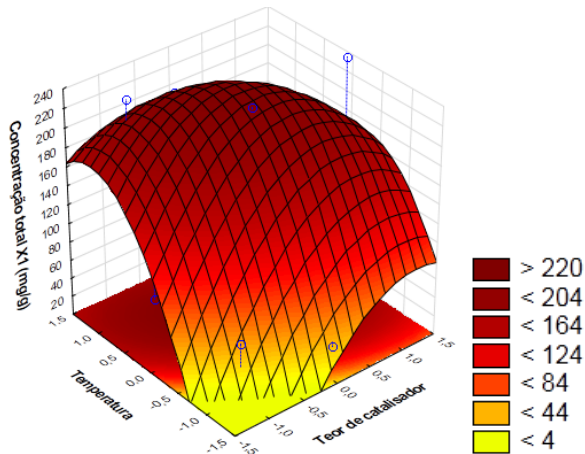
Tabela 9 – Efeitos para formação do isômero X1

Fatores	Efeito	Erro padrão	Valor p
Teor catalisador (L)	35,10	36,54	0,373772
Teor catalisador (Q)	-77,672	40,86	0,106034
Temperatura (L)	91,97	36,54	0,045469
Temperatura (Q)	-120,07	40,86	0,025997
Teor catalisador (L) x Temperatura (L)	-102,36	51,67	0,094896

(L): linear; (Q): quadrático.

Fonte: autoria própria

Figura 18 – Superfície de resposta para concentração do isômero X1 em mg g^{-1}



Fonte: autoria própria

O modelo de predição dado pela equação 6 não teve um bom ajuste aos dados experimentais ($R^2 = 0,783$) e o gráfico de superfície (Figura 18) de resposta indicou que a região do ponto central está relacionada com a formação de concentrações elevadas de X1.

$$Y = 228,29 + 17,55.A - 38,83.A^2 + 45,98.B - 60,03.B^2 - 51,18.A.B \quad (6)$$

Onde: Y = concentração do isômero X1; A = teor do catalisador; B = temperatura da reação; com A e B em termos dos fatores codificados.

5.3.5 Formação do isômero X2

A partir dos resultados da ANOVA (Tabela 10) foi verificado que os efeitos dos termos linear e quadrático para a temperatura foram significativos ($p < 0,05$) e que a interação entre o teor de catalisador e a temperatura foi marginalmente significativa ($p < 0,10$). O modelo obtido (Equação 7) apresentou o valor de 0,793 para R^2 e indicou que o ajuste do modelo aos dados experimentais resultou em uma capacidade preditiva limitada.

$$Y = 53,19 + 5,91.A - 9,81.A^2 + 13,78.B - 15,29.B^2 - 14,84.A.B \quad (7)$$

Onde: Y = concentração do isômero X2; A = teor do catalisador; B = temperatura da reação; com A e B em termos dos fatores codificados.

Tabela 10 – Efeitos para formação do isômero X2

Fatores	Efeito	Erro padrão	Valor p
Teor catalisador (L)	11,83	9,88	0,276557
Teor catalisador (Q)	-19,62	11,05	0,126242
Temperatura (L)	27,56	9,88	0,031677
Temperatura (Q)	-30,58	11,05	0,032614
Teor catalisador (L) x Temperatura (L)	-29,68	13,98	0,077986

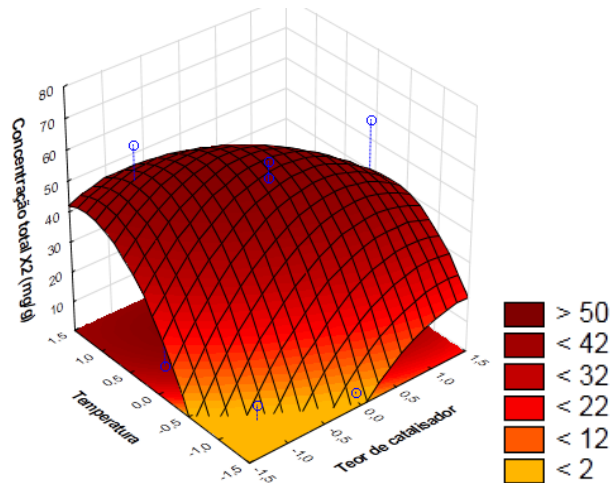
(L): linear; (Q): quadrático.

Fonte: autoria própria

Considerando que os ácidos graxos cíclicos podem ser facilmente absorvidos pelo sistema digestório e constituem uma preocupação em relação à toxicidade alimentar (MOSSOBA et al., 1995), e que X2 muito provavelmente seja um ácido graxo cíclico, torna-se adequado minimizar a sua formação na reação de isomerização. Nesse sentido, o gráfico de superfície de resposta (Figura 19) permite identificar que a menor formação de X2 ocorre na região em que o teor de

catalisador e a temperatura variam -1 a -0,8, que corresponde, respectivamente a 15-16% e 135-140 °C, em que a concentração de X2 foi inferior a 12,0 mg g⁻¹.

Figura 19 – Superfície de resposta para concentração do isômero X2 em mg g⁻¹



Fonte: autoria própria

5.3.6 Formação do isômero X3

Para a formação de X3, foram significativos ($p < 0,05$) os efeitos dos termos linear e quadrático da temperatura e a interação entre o teor de catalisador e a temperatura (Tabela 11). Os efeitos dos termos linear e quadrático do teor de catalisador foram marginalmente significativos ($p < 0,10$). A temperatura teve um efeito maior sobre a formação de X3 que o teor de catalisador. O efeito negativo do termo quadrático da temperatura significa que em temperaturas elevadas a formação de X3 foi menor.

Tabela 11 – Efeitos para formação do isômero X3

Fatores	Efeito	Erro padrão	Valor p
Teor catalisador (L)	29,22	13,34	0,071129
Teor catalisador (Q)	-29,88	14,92	0,092082
Temperatura (L)	35,56	13,34	0,037274
Temperatura (Q)	-46,70	14,92	0,020332
Teor catalisador (L) x Temperatura (L)	-52,17	18,87	0,032665

(L): linear; (Q): quadrático.

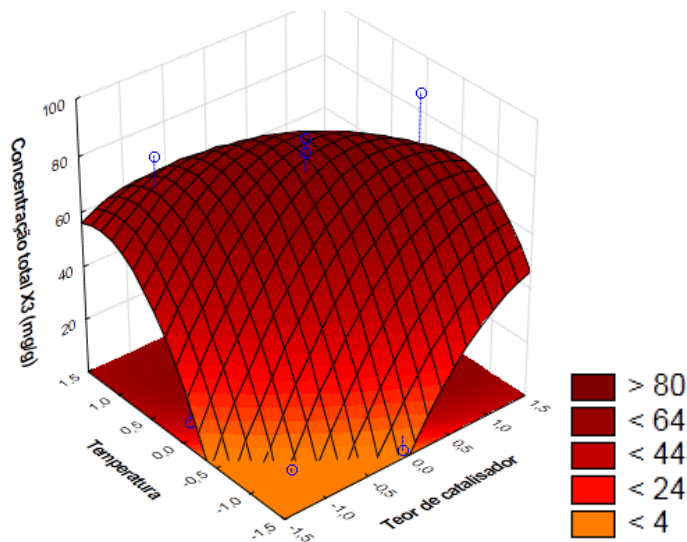
Fonte: autoria própria

O modelo para X3 (Equação 8) apresentou o valor de 0,839 para R^2 e teve um ajuste ligeiramente melhor que os modelos obtidos para X1 e X2. A análise da superfície de resposta (Figura 20) indica que a região do ponto central (20% de catalisador e 160 °C) resulta na obtenção de concentrações elevadas de X3.

$$Y = 78,67 + 14,61.A - 14,94.A^2 + 17,78.B - 23,35.B^2 - 26,08.A.B \quad (8)$$

Onde: Y = concentração do isômero X3; A = teor do catalisador; B = temperatura da reação; com A e B em termos dos fatores codificados.

Figura 20 – Superfície de resposta para concentração do isômero X3 em mg g^{-1}



Fonte: autoria própria

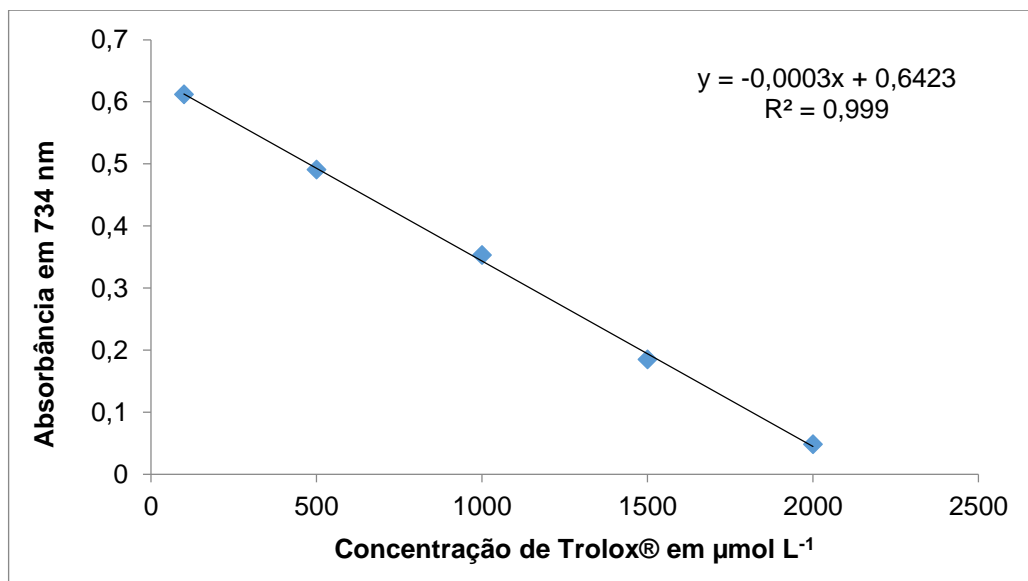
5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante tem sido através da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolona-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática. Essa metodologia tem sido utilizada para medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI et al., 2005). Segundo Re et al., (1999), embora existam vários métodos para verificação da capacidade antioxidante, o método ABTS se destaca por proporcionar boa solubilidade, permitindo a análise de compostos hidrofílicos e lipofílicos, com um tempo de análise relativamente curto.

Mekni et al., (2014), testaram atividade antioxidante de extratos de variedades de semente de romã (*Punica granatum* L.), contendo o ácido puníco, principal CLNA encontrado nesta espécie. Os métodos aplicados neste estudo foram o DPPH e o ABTS, sendo que em todas as amostras avaliadas, o método ABTS apresentou valores maiores para a quantidade de equivalente trolox. Segundo estes autores, além do CLNA contido nas amostras testadas, a presença de compostos fenólicos também contribuiu para a atividade antioxidante.

Assim, foi utilizado o método ABTS para determinar a atividade antioxidante do óleo de linhaça não isomerizado e isomerizado. Os resultados foram expressos em termos de equivalente trolox (6-hidroxi-2,5,7-tetrametilcromam-2-carboxílico), o que facilita a comparação dos resultados da atividade antioxidante. Para isso, foi obtida a curva de calibração relacionando absorvância da solução de ABTS em 734 nm *versus* a concentração de trolox (Figura 21).

Figura 21 – Curva de calibração em termos de equivalente trolox utilizada na determinação da atividade antioxidante.



Fonte: autoria própria

A atividade antioxidante para o óleo de linhaça não isomerizado foi 7,41 μmol de equivalente troloxg⁻¹ de óleo (Tabela 12). Para a isomerização nas condições do ponto central e dos pontos axiais (-1,414, 0) e (0, -1,414) ocorreu a diminuição da atividade antioxidante, passando respectivamente para 6,24, 6,16 e

5,47 μmol de equivalente trolox g^{-1} de óleo. Nas condições dos pontos fatoriais (1, -1), (-1, -1) e (-1, 1) a atividade antioxidante teve valores próximos a do óleo de linhaça. Em condições de isomerização mais severas, que incluiu os pontos axiais (0, 1,414) e (1,414, 0) e o ponto fatorial (1, 1), ocorreu o aumento de 29, 39 e 45 %, respectivamente, em relação atividade antioxidante do óleo de linhaça.

Tabela 12 – Atividade antioxidante pelo método ABTS para o óleo de linhaça isomerizado e não isomerizado.

Condição de isomerização	Concentração de Trolox ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	Condição de isomerização	Concentração de Trolox ($\mu\text{mol g}^{-1}$)
(-1, -1) - (15 %, 135 °C)	7,51 \pm 0,15	(0, -1,414) - (20 %, 125 °C)	5,47 \pm 0,10
(-1, 1) - (15 %, 185 °C)	7,94 \pm 0,13	(0, 1,414) - (20 %, 195 °C)	9,58 \pm 0,17
(0, 0) - (20 %, 160 °C)	6,24 \pm 0,25	(-1,414, 0) - (13 %, 160 °C)	6,16 \pm 0,15
(1, -1) - (25 %, 135 °C)	7,43 \pm 0,15	(1,414, 0) - (27 %, 160 °C)	10,33 \pm 0,11
(1, 1) - (25 %, 185 °C)	10,74 \pm 0,06	não isomerizado	7,41 \pm 0,15

Fonte: autoria própria

Ao avaliar o teor de antioxidantes pelo método ABTS para a sementes de linhaça marrom e dourada, Sargi et al., (2013), encontraram os teores de 3,70 e 3,38 μmol de equivalente trolox g^{-1} de semente. Prescha et al., (2014), determinaram a atividade antioxidante pelo método DPPH para diversos óleos vegetais extraídos por prensagem a frio. Para o óleo de linhaça os valores variaram de 1,30 a 1,72 μmol de equivalente trolox g^{-1} de óleo. Dhavamani et al., (2014), avaliaram a atividade antioxidante do óleo de linhaça por fotoquimioluminescência e encontraram os valores de 243,7 e 41,2 μmol de equivalente trolox g^{-1} de óleo, respectivamente, para o óleo antes e após a remoção dos seus constituintes não saponificáveis.

Com relação aos compostos responsáveis pela atividade antioxidante no óleo de linhaça Cisneros et al., (2014), determinaram a presença de delta e gama tocoferóis e compostos fenólicos. Tanto tocoferóis como compostos fenólicos tem a sua atividade antioxidante diminuída com o aumento da temperatura (RÉBLOVÁ, 2012; AL-ATTAR, 2013).

Assim, com o aquecimento do óleo de linhaça provavelmente tenha ocorrido a degradação dos antioxidantes presentes no óleo de linhaça, tais como tocoferóis e compostos fenólicos, o que diminuiria a atividade antioxidante. Por outro lado, conforme Fagali e Catalá (2008), ácidos graxos conjugados tem o efeito de aumentar a atividade antioxidante. Em decorrência desse comportamento pode

ocorrer uma pequena variação da atividade antioxidante ou a sua diminuição em condições de isomerização mais brandas, com o aumento da atividade para as condições mais severas.

A Tabela 13 apresenta os resultados da ANOVA para a atividade antioxidante. Foram significativos ($p < 0,05$) os efeitos dos termos linear e quadrático do teor de catalisador e da temperatura, sendo que para o efeito linear os valores foram próximos. O efeito de interação entre o teor de catalisador e a temperatura foi marginalmente significativo ($p < 0,10$).

Tabela 13 – Efeitos para atividade antioxidante.

Fatores	Efeito	Erro padrão	Valor p
Teor catalisador (L)	2,15	0,45	0,003315
Teor catalisador (Q)	2,26	0,51	0,004492
Temperatura (L)	2,39	0,45	0,001992
Temperatura (Q)	1,54	0,51	0,023518
Teor catalisador (L) x Temperatura (L)	1,44	0,64	0,067882

(L): linear; (Q): quadrática.

Fonte: autoria própria

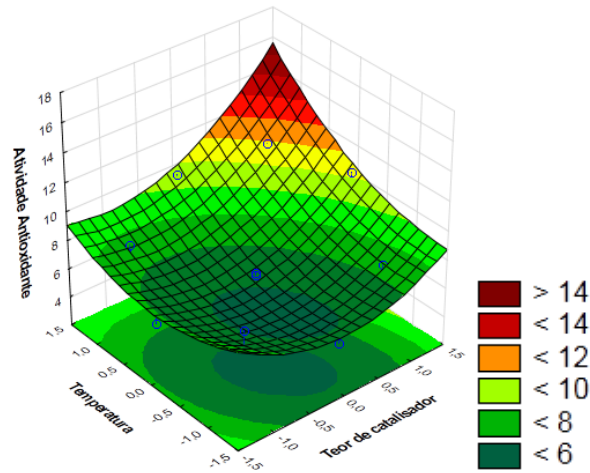
O modelo de predição para a atividade antioxidante (Equação 9) foi obtido a partir da análise de regressão, e apresentou o valor de 0,929 para o coeficiente de determinação (R^2).

$$Y = 6,24 + 1,07.A + 1,13.A^2 + 1,19.B + 0,77.B^2 + 0,72. A.B \quad (9)$$

Onde: Y corresponde a atividade antioxidante em μmol de equivalente trolox g^{-1} de óleo; A representa o teor do catalisador; B a temperatura da reação; com a A e B em termos das variáveis codificadas.

A Figura 22 apresenta a superfície de resposta para atividade antioxidante. A menor atividade antioxidante foi obtida no ponto (-0,27, -0,65), cujo teor de catalisador foi 18,7 % e a temperatura 144 °C. Com o aumento do teor de catalisador e da temperatura ocorreu o aumento da atividade antioxidante, que atingiu o seu maior valor para a condição (1,1), que corresponde a 25 % de catalisador e 185 °C.

Figura 22 – Superfície de resposta para atividade antioxidante ($\mu\text{mol g}^{-1}$).



Fonte: autoria própria

5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os testes realizados para confirmar a viabilidade das cepas microbianas, por meio de incubação dos microrganismos no meio de cultura, confirmaram que todos os inóculos estavam em condições adequadas para crescimento nas microplacas. Para verificar se o diluente DMSO causaria alguma interferência sobre o crescimento dos microrganismos, foi realizado o teste para confirmar que este não inibiria o crescimento microbiano.

De acordo com os resultados obtidos pela técnica microbiológica empregada, de microdiluição em caldo, a atividade antibacteriana dos isômeros foi evidenciada sobre as cepas do microrganismo gram-positivo *Staphylococcus aureus*, que apresentou maior susceptibilidade às misturas de ácidos graxos isomerizados (Tabela 14). Contudo os resultados obtidos não seguiram um padrão de proporcionalidade em relação a concentração de CLA, X1, X2 e X3.

Kelsey et al., (2006), verificaram por meio de testes de CIM, a susceptibilidade de cepas de *S. aureus* diante de diversos ácidos graxos, sendo que dois destes se tratavam de ácidos graxos conjugados: CLA 9c, 11t e 10t, 12c. Verificaram que o CLA 9c, 11t apresentou o melhor resultado dentre todos os ácidos graxos avaliados, que correspondeu a CIM de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$.

Tabela 14 – Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em mg mL⁻¹

Microrganismo	Gram-Positivos				Gram-Negativos			
	<i>S.aureus</i>		<i>B. cereus</i>		<i>E. coli</i>		<i>Salmonellatyphi</i>	
Amostra	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
1 (-1;-1)	1,25	2,5	20	>20	20	>20	20	>20
2 (-1;+1)	1,25	1,25	20	>20	20	>20	20	>20
3 (0;0)*	1,25	>20	20	>20	>20	-	>20	-
4 (+1;-1)	1,25	2,5	20	>20	>20	-	>20	-
5 (+1;+1)	1,25	>20	20	>20	>20	-	>20	-
não isomerizada**	>20	-	>20	-	>20	-	>20	-
ampicilina	0,125	-	4,8 x 10 ⁻³	-	4,8 x 10 ⁻³	-	9,7x 10 ⁻³	-

(-) não houve inibição do crescimento

*Corresponde à média de quatro repetições do ponto central

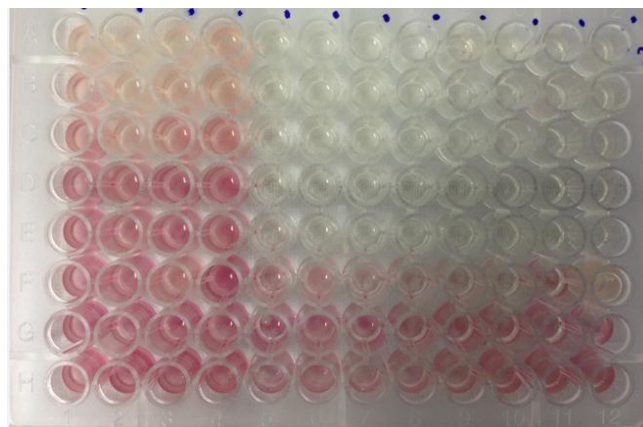
**ácidos graxos livres do óleo de linhaça não isomerizado

Fonte: autoria própria

Parsons et al., (2012), propuseram o mecanismo pelo qual ácidos graxos de cadeia longa podem provocar inibição e morte de alguns microrganismos, indicando que possa ser por meio da desestabilização da fluidez das membranas, que promoveria a liberação do conteúdo intracelular, causando sua morte.

É possível verificar na Figura 23, os resultados obtidos em uma microplaca para o microrganismo *S. aureus*, após aplicar o corante CTT foi possível confirmar a atividade inibitória nas cavidades em que não houve desenvolvimento de coloração.

Figura 23 – Confirmação de atividade inibitória com corante CTT



Fonte: autoria própria

Já para o microrganismo *Bacillus cereus*, todas as amostras das misturas de isômeros apresentaram CIM de 20 mg mL⁻¹, porém não apresentaram atividade bactericida nas concentrações testadas. Klančnik et al., (2011), testaram a susceptibilidade de *B. cereus* frente a extratos de plantas e obtiveram resultados de CIM de 5 mg mL⁻¹ para extrato de folhas de oliveira.

Para *E. coli*, as amostras 1 e 2 apresentaram atividade inibitória igual a 20 mg mL⁻¹, e não apresentaram atividade bactericida nesta concentração. As demais amostras não apresentaram inibição do crescimento deste microrganismo na maior concentração testada, sendo assim, considera-se a CIM para estas como maior que 20 mg mL⁻¹. Estes resultados estão de acordo com o estudo de Parsons et al., (2012), no qual concluíram que os microrganismos gram-negativos como *E. coli*, foram mais resistentes que os gram-positivos, sugerindo-se que o mecanismo de defesa foi o de incorporar alguns ácidos graxos exógenos e não desestabilizar suas membranas. Klančnik et al., (2011) obteve resultados com extrato de semente de uva com CIM de 2,5 mg mL⁻¹ para *E. coli*.

Salmonella typhi teve maior susceptibilidade às amostras isomerizadas 1 e 2, que apresentaram CIM de 20 mg mL⁻¹ e as demais amostras não apresentaram inibição do crescimento na maior concentração testada. Rani e Khullar (2004), testaram a atividade de extrato de romã, que contém ácido puníco, que se trata de um CLNA, e verificaram por meio de difusão em ágar que houve inibição do crescimento de *S. typhi*, porém não testaram a CIM neste estudo.

Os resultados do presente estudo estão de acordo com Byeonet al., (2009), que testaram por meio de difusão em ágar, a atividade antimicrobiana de ácidos graxos conjugados (CLA), e demonstraram que CLA promoveu inibição do crescimento de cepas de *S. aureus*, *B. cereus* e *Salmonella typhi*, sendo mais evidente a atividade bactericida sobre os microrganismos gram-positivos.

A demonstração de atividade contra espécies gram-positivas e gram-negativas sugere que possa ser algum ou alguns dos isômeros presentes nas amostras o responsável pelo potencial efeito inibitório e bactericida observado, pois promoveu uma melhor atividade antimicrobiana em comparação com a amostra não isomerizada que não apresentou inibição do crescimento na maior concentração testada que foi de 20 mg mL⁻¹.

Observou-se que a capacidade inibitória avaliada neste estudo foi maior sobre o crescimento das bactérias gram-positivas do que das gram-negativas. A parede celular dos gram-negativos é mais complexa sendo constituída pelos componentes: camada delgada de peptidoglicano, lipoproteína, proteína, fosfolípido e lipopolissacarídeo, enquanto que a parede celular das bactérias gram-positivas é composta de uma camada espessa de peptidoglicanos (WATANABE et al., 2013). Sugere-se a hipótese de que as misturas dos isômeros pode ter causado algum dano sobre a estrutura da membrana e parede celular de gram-positivos, afetando seu crescimento, conforme observado com as cepas de *S. aureus* e *B. cereus*, que foram os mais susceptíveis dentre os microrganismos testados.

A ação inibitória de alguns ácidos graxos, de acordo com Burt (2004), pode estar associada à membrana celular, como o transporte de elétrons, gradiente de íons e translocação de proteínas, uma vez que a difusão exagerada de íons e moléculas vitais pode levar a célula à morte.

Calsamiglia et al., (2007), confirmou que a hidrofobicidade está relacionada à ação antimicrobiana. Os ácidos graxos conjugados são substâncias hidrofóbicas, e esta característica lhes confere capacidade de interagir com lipídios da membrana celular, alterando a estrutura, tornando-as mais permeáveis, o que permite o extravasamento de íons e outros conteúdos citoplasmáticos (LAMBERT et al., 2001).

Ao comparar os resultados obtidos para as amostras isomerizadas com os resultados do antimicrobiano ampicilina, que possui amplo espectro de ação, foi possível verificar que as CIM das amostras isomerizadas foram em todos os casos inferiores à CIM deste padrão. Porém, como algumas amostras foram capazes de inibir o crescimento, mesmo sendo em concentrações maiores que de ampicilina, este fato não descarta a possibilidade de realização de testes complementares para se propor o uso destes produtos com finalidade antimicrobiana.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As análises espectroscópicas na região do ultravioleta e do infravermelho permitiram confirmar a isomerização dos ácidos linoleico e alfa-linolênico, com a formação de duplas ligações *trans* e ligações conjugadas com duas e três insaturações.

As condições de isomerização do óleo de linhaça avaliadas neste estudo resultaram na formação de ácidos graxos conjugados CLA e CLNA. Para as condições mais brandas ocorreu a formação de poucos isômeros conjugados, sendo que X1 foi o principal isômero formado. Quando foram empregadas condições mais severas (valores extremos de teor de catalisador e/ou temperatura) ocorreu a formação de diversos isômeros, constituindo uma mistura complexa que dificulta a identificação da maioria dos isômeros formados.

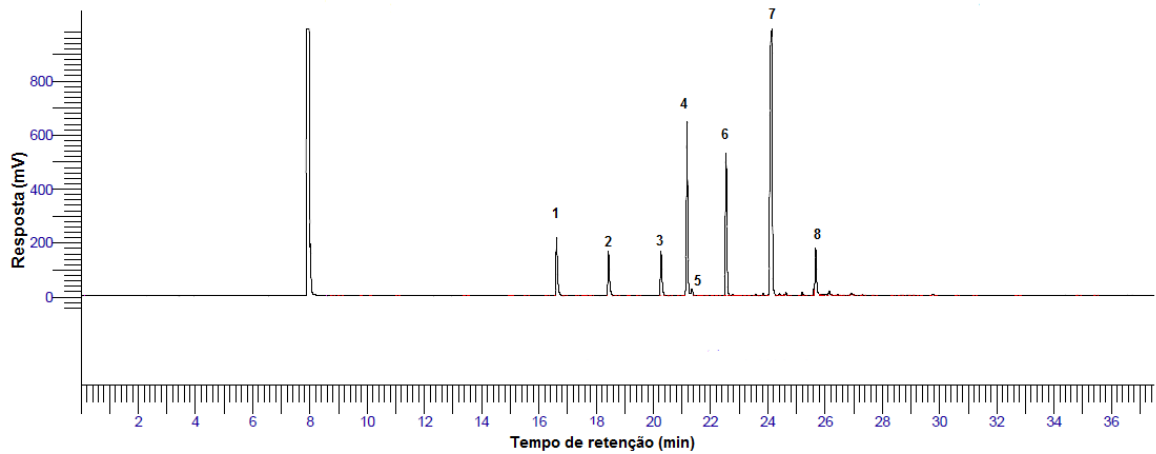
O grau de isomerização do ácido alfa-linolênico foi maior que a do ácido linoleico para as condições mais brandas de isomerização. Entretanto, para as condições mais severas não houve diferença entre o grau de isomerização destes ácidos. Em relação aos ácidos graxos conjugados formados na reação de isomerização, a condição de 20 % de catalisador e 160 °C, resultou em concentrações elevadas.

A atividade antioxidante para as condições de isomerização mais severas foi superior a atividade obtida para óleo de linhaça não isomerizado, sendo obtido um aumento de até 45% na atividade antioxidante. Em condições mais brandas e intermediárias a atividade antioxidante foi próxima do valor obtido para o óleo de linhaça não isomerizado, sendo menor em algumas condições.

A isomerização do óleo de linhaça resultou no surgimento de atividade inibitória principalmente frente aos microrganismos gram-positivos, *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778), sendo maior para a espécie *S. aureus*, correspondendo a 10 vezes a concentração inibitória mínima da ampicilina, que foi utilizada como droga de referência.

A isomerização do óleo de linhaça representa uma alternativa para a preparação de misturas de isômeros conjugados dos ácidos linoleico e alfa-linolênico, pois utiliza um sistema reacional e uma metodologia de isomerização, que são relativamente simples e de baixo custo.

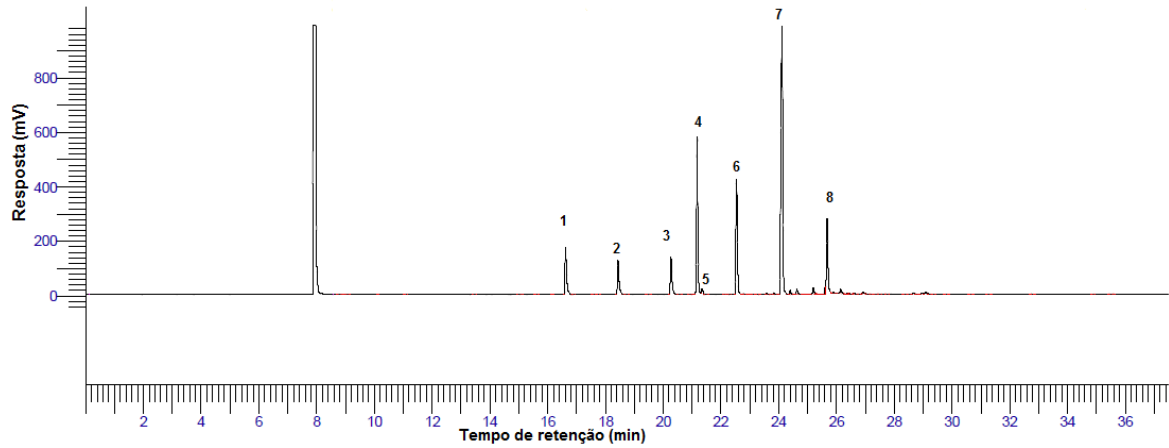
APÊNDICE A – Cromatograma de ésteres metílicos de óleo de linhaça isomerizado com 20 % de catalisador a 125 °C (0, -1,41)



Legenda: (1) 16:0; (2) 17:0 (padrão interno); (3) 18:0; (4) 18:1n-9; (5) 18:1n-7; (6) 18:2n-6; (7) 18:3 n-3; (8) X1 (não identificado).

Fonte: autoria própria

APÊNDICE B – Cromatograma de ésteres metílicos de óleo de linhaça isomerizado com 13 % de catalisador a 160 °C (-1,41, 0);



Legenda: (1) 16:0; (2) 17:0 (padrão interno); (3) 18:0; (4) 18:1n-9; (5) 18:1n-7; (6) 18:2n-6; (7) 18:3 n-3; (8) X1 (não identificado).

Fonte: autoria própria

APÊNDICE C – Tabela de concentrações dos isômeros formados: CLA, X1, X2 e X3

Amostra	Concentração (mg g ⁻¹)			
	CLA	X1	X2	X3
1 (-1;-1)	6,65	57,08	5,35	1,04
2 (-1;+1)	103,16	231,93	62,50	81,05
3 (0,0)*	121,90	228,29	53,20	78,67
4 (+1;-1)	131,96	114,20	23,47	53,60
5 (+1;+1)	132,35	84,32	21,23	29,25
6 (0;-1,414)	4,20	36,98	3,01	0,49
7 (0;+1,414)	117,56	194,61	42,15	61,74
8 (-1,414; 0)	9,65	76,53	8,61	6,87
9 (+1,414; 0)	106,52	239,83	58,46	88,99

*Corresponde à média de quatro repetições do ponto central

Fonte: autoria própria

REFERÊNCIAS

ACKMAN, R. G. The analysis of fatty acids and related materials by gas-liquid chromatography. **Progr. Chem. Fats Other Lipids**, v. 12, p. 165-284, 1972.

AL-ATTAR, H. Effect of heat treatment on α -tocopherol content and antioxidant activity of vegetable oils. Dissertação de mestrado. McGill University, Montreal, Quebec, p. 80, 2013.

ALI, Y. M.; KADIR, A. A.; AHMAD, Z.; YAAKUB, H.; ZAKARIA, Z. A.; HAKIM ABDULLAH, M. N. Free radical scavenging activity of conjugated linoleic acid as single or mixed isomers. **Pharmaceutical biology**, v. 50, n. 6, p. 712-719. 2012.

ALVES, S.P.; BESSA R. J. B. The *trans*-10,*cis*-15 18:2: a missing intermediate of *trans*-10 shifted rumen biohydrogenation pathway? **Lipids**, v. 49, p. 527-541, 2014.

ARUNA, P.; VENKATARAMANAMMA, D.; SINGH, A. K.; SINGH, R. P. Health benefits of punicic acid: a review. **Institute of Food Technologists**, v. 15, p. 16-27, 2016.

BANNI S. Conjugated linoleic acid metabolism. **Current Opinion in Lipidology**, v. 13, p. 261-266, 2002.

BARROSO, A. K. M.; TORRES, A. G.; BRANCO, V. N. C; FERREIRA, A.; FINOTELLI, P.V.; FREITAS, S. P.; LEÃO, M. H. M. R. Linhaça marrom e dourada: propriedades químicas e funcionais das sementes e dos óleos prensados a frio. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.44, n.1, p.181-187, 2014.

BERDEAUX, O.; VOINOT, L.; ANGIONI, E.; JUANEDA, P.; SEBEDIO, J. L. A simple method of preparation of methyl *trans*-10, *cis*-12- and *cis*-9, *trans*-11-octadecadienoates from methyl linoleate. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 75, p. 1749-1755, 1998.

BIALEK, M.; CZAUDERNA, M.; BIALEK, A. Conjugated linolenic acid (CLnA) isomers as new bioactive lipid compounds in ruminant-derived food products. A review. **Journal of Animal and Feed Sciences**, v. 26, p. 3-17, 2017.

BUCHADE, R. S.; SUPEKAR, A. R.; KALE, A. J.; SHINDE, M. G. Isolation of punicic acid from pomegranate seed oil, its characterization and evaluation for anti atherosclerosis activity. **International Journal of advanced research**, v. 4, n. 12, p. 2493-2498, 2016.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods- a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BYEON, J. I.; SONG, H. S.; OH, T. W.; KIM, Y. S.; CHOI, B. D.; KIM, H. C.; KIM, J. O.; SHIM, K. H.; HA, L. H. growth inhibition of foodborne and pathogenic bacteria by conjugated linoleic acid. **Journal of Agricultural Food Chem**, v. 57, p. 3164-3172, 2009.

CALSAMIGLIA, S.; BUSQUET, M.; CARDOZO, P. W.; CASTILLEJOS, L.; FERRET, A. Invited review: oils as modifiers of rumen microbial fermentation. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 6, p. 2580-2595, 2007.

CAO, Y.; GAO, H.; CHEN, J.; CHEN, Z.; YANG, L. Identification and characterization of conjugated linolenic acid isomers by Ag⁺- HPLC and NMR. **J. Agric. Food Chem**, v. 54, p. 9004–9009, 2006.

CARDOSO, A. L. Estudo cinético das reações de esterificação de ácidos graxos catalisadas por ácidos de Lewis e de Bronsted para produção de biodiesel. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal de Viçosa. MG, 2008.

CARVALHO, E.B.T; MELO, I.L.P; MANCINI-FILHO, J. Chemical and physiological aspects of isomers of conjugated fatty acids. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 295-307, 2010.

CHOI, W. H. Evaluation of anti-tubercular activity of linolenic acid and conjugated-linoleic acid as effective inhibitors against Mycobacterium tuberculosis. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 9, n. 2, p. 125-129, 2016.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada. M7-A6. 6 ed. Wayne, PA: CLSI; 2003.

CHRISTIE, W. W. Lipid Analysis. Oxford. Pergamon Press. 2 ed. Hannah Research Institute, Ayr, Scotland, p. 155-166, 1982.

CHRISTIE, W. W. Isolation of fatty acids and identification by spectroscopic and chemical degradative techniques. Gas chromatography and lipids, **Oily Press**, Scotland, p. 129-160, 1989.

CHRISTIE, W. W. Lipid analysis. **Oily Press**, Bridgwater. 3 edition. 2003.

CISNEROS, F. H.; PAREDES, D.; ARANA, A.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. Chemical composition, oxidative stability and antioxidant capacity of oil extracted from roasted seeds of Sacha-Inchi (*Plukenetia volubilis* L.), **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 22, p. 5191-5197, 2014.

COSMO, B. M. N.; CABRAL, A. C.; PINTO, L. P.; FRIGO, J. P.; AZEVEDO, K. D.; BONASSA, G. Linhaça *Linum usitatissimum*, Suas Características. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 3, p. 189-196, 2014.

CUPERSMID, L.; FRAGA, A. P. R.; ABREU, E. S.; PEREIRA, I. R. O. Linhaça: composição química e efeitos biológicos. **e-Scientia**, Belo Horizonte, v. 5, n. 2, p. 33-40, 2012.

de la MATA, P.; DOMINGUEZ-VIDAL, A.; BOSQUE-SENDRA, J. M.; RUIZ-MEDINA, A.; CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; AYORA-CAÑADA, M. J. Olive oil assessment in edible oil blends by means of ATR-FTIR and chemometrics. **Food Control**, v. 23, n. 2, p. 449-455, 2012.

DEMIR, A. S.; TALPUR, F. N. Chemoenzymatic conversion of linoleic acid into conjugated linoleic acid. **J. Agric. Food Chem**, v. 58: p. 1646-1652, 2010.

DHAVAMANI, S.; RAO, Y. P. C.; LOKESH, B. R. Total antioxidant activity of selected vegetable oils and their influence on total antioxidant values in vivo: A photochemiluminescence based analysis. **Food Chemistry**, v. 164, p. 551-555, 2014.

FAGALI, N.; CATALÁ, A. Antioxidant activity of conjugated linoleic acid isomers, linoleic acid and its methyl ester determined by photoemission and DPPH techniques. **Biophys. Chem**, v. 137, p. 56-62, 2008.

FONSECA, M. M.; YOSHIDA, M. I. Análise térmica do óleo de linhaça natural e oxidado. **Vértice**, v. 11, n. 1, p. 61-75, 2009.

Food and Agriculture Organization of the United Nations. Fats and Fatty Acids in Human Nutrition. **FAO Food and Nutrition Paper**, v. 91, Rome, 2010.

FRITSCHÉ, J.; MOSSOBA, M. M.; YURAWECZ, M. P.; ROACH, J. A. G.; SEHAT, N.; KU, Y.; STEINHART, H. Conjugated linoleic acid (CLA) isomers in human adipose tissue. **Z. Lebensm.-Unters.-Forsch.-A**, v. 205, p. 415–518, 1997.

FUENTE, M. A.; de la LUNA, P.; JUÁREZ, M. Chromatographic techniques to determine conjugated linoleic acid isomers. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 25, n. 9, p. 917- 926, 2006.

GALVEZ, J.; PAUL, A.; SANDI, B. Conjugated linolenic acids and methods of preparation and purification and uses thereof. US Patent 7,417,159 B2, Application 10/567, 419. Université Laval, Quebec (Ca). 2008.

GAULLIER, J.M.; HALSE, J.; HOYE, K.; KRISTIANSEN, K.; FAGERTUN, H.; VIK, H.; GUDMUNDSEN, O. Supplementation with conjugated linoleic acid for 24 months is well tolerated by and reduces body fat mass in healthy, overweight humans. **Journal of Nutrition**, v.135, n.4, p.778-784, 2005.

GORISSEN, L.; LEROY, F.; DE VUYST, L.; DE SMET, S.; RAES, K. Bacterial production of conjugated linoleic and linolenic acid in foods: A technological challenge. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n 11, p.1561-1574, 2015.

GU, H.; MA, X.; WU, J.; ZHANG, Q.; YUAN, W.; CHEN Y. Concentration of alpha-linolenic acid of perilla by gradient cooling urea inclusion. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, p. 685, 2009.

GUILLEN M.; CABO N. Relationships between the composition of edible oils and lard and the ratio of the absorbance of specific bands of their fourier transform infrared

spectra. Role of Some Bands of the Fingerprint Region. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, p. 1788-1793, 1998.

HARRIS, K. D. M. Structural and dynamic properties of urea and thiourea inclusion compounds. **Journal of Molecular Structure**, v. 374, p. 241-250, 1996.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl from lipids. **Lab. Pract**, v. 22, p. 474-476, 1973.

HAYES, D.G.; BENGTSSON, Y. C.; ALSTINE, J. V. M.; SETTERWALL, F. Urea complexation for the rapid, ecologically responsible fractionation of fatty acids from seed oil. **The Journal of the American Chemists Society**, v. 75, n. 10, p. 1404, 1998.

HEINZE, V. M.; ACTIS, A. B. Dietary conjugated linoleic acid and long-chain n-3 fatty acids in mamary cancer protection: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 63, n. 1, p. 66- 78, 2012.

HENNESSY, A. A.; ROSS, P. R.; DEVERY, R.; STANTON, C. The health promoting properties of the conjugated isomers of alpha-linolenic acid. **Lipids**, v. 46, n. 2, p.105-119, 2011.

HENNESSY, A. A.; ROSS, P. R.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Sources and bioactive properties of conjugated dietary fatty acids. **Lipids**, v.51, p. 377-397, 2016.

HUSAIN, S.; DEVI, K. S. Separation and identification of isomeric conjugated fatty acids by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. **Lipids**, v. 28, n. 11, p. 1037-1040.

JOSEPH, J. D.; ACKMAN, R. G. Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils and fish oils ethyl esters: collaborative study. **J. AOAC Int.**, v. 75, p. 488-506, 1992.

KADIDRAREDDY, R. H.; MATHAKALA, V.; PALEMPALLI, U. M. D. Therapeutic activity of conjugated linoleic acids synthesized by *Lactobacillus plantarum*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v.7, p. 215-223, 2016.

KASOTE, D. M. Flaxseed phenolics as natural antioxidants. **Int. Food Research Journal**, v. 20, n. 1, p. 27-34, 2013.

KELSEY, J. A.; BAYLES, K. W.; SHAFII, B.; MCGUIRE, M. A. Fatty acids and monoacylglycerols inhibit growth of *Staphylococcus aureus*. **Lipids**, v. 41, n. 10, p. 951-961, 2006.

KLANČNIK, A.; PISKERNIK, S.; JERŠEK, B.; MOŽINA, S. S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal of Microbiological Methods**, v. 81, p. 121-126, 2010.

KOBA, K.; BELURY, M. A.; SUGANO, M. Potential health benefits of conjugated trienoic acids. **Lipid Technology**, v. 19, n. 9, p. 200-203, 2007.

KOBA, K.; YANAGITA, T. Health benefits of conjugated linoleic acid (CLA). **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 8, n. 6, p. 525-532, 2013.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar actividade antioxidante em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p. 726-732, 2005.

LAKSHMINARAYANA, G.; SUNDAR RAO, K.; KIYYUR, M. H.; MAHAJANSHETTY, C. S. Occurrence of punicic acid in *Trichosanthes bracteata* and *Trichosanthes nervifolia* seed oils. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 65, n. 3, p.347-348, 1988.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P.; NYCHAS, G. J. E. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LEÃO, L. S. Estudo empírico e cinético da esterificação de ácidos graxos saturados sobre o ácido nióico. Rio de Janeiro: UFRJ, Escola de Química, p. 84, 2009.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, K. Y. **Princípios de Bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

LOPES, W. A. FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Quím.Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

LÓPEZ, D. E.; GOODWIN JR, J. G.; BRUCE, D. A.; LOTERO, E. Transesterification of triacetin with methanol on solid acid and base catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 295, p. 97-105, 2005.

MACREDMOND, R. R.; DORSCHIED, D. R. Conjugated linoleic acid (CLA): Is it time to supplement asthma therapy? **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 24, n. 5, p. 540-548, 2011.

MAIA E. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Avaliação de um método simples e econômico para metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 53, n. 1, p. 27-35, 1993.

MEIORIN, C.; ARANGUREN, M. I.; MOSIEWICKI, M. A. Polymeric networks based on tung oil: reaction and modification with green oil monomers. **European Polymer Journal**, v. 67, p. 551-560, 2015.

MEKNI, M.; DHIBI, M.; KHARROUBI, W.; HMIDA, R. B.; CHERAIF, I.; HAMMAMI, M. Natural conjugated and trans fatty acids in seed oils and phytochemicals in seed extracts issued from three Tunisian pomegranate (*Punica granatum*. L) cultivars. **International Journal of current microbiology and applied sciences**, v. 3, n. 8, p. 778-792, 2014.

MILINSK, M. C. Análise comparativa entre oito métodos de esterificação na determinação quantitativa de ácidos graxos em óleo vegetal. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

MIRANDA, J.; ARIAS, N.; FERNÁNDEZ-QUINTELA, A.; DEL PUY PORTILLO, M. Are conjugated linolenic acid isomers an alternative to conjugated linoleic acid isomers in obesity prevention? **Endocrinología y Nutrición**, v. 61, n.4, p 209-219. 2014.

MOONEY, D.; MCCARTHY, C.; BELTON, O. Effects of conjugated linoleic acid isomers on monocyte, macrophage and foam cell phenotype in atherosclerosis. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 98, n. 3, p. 56-62, 2012.

MOSSOBA, M. M.; MCDONALD, R. E.; ARMSTRONG, D. J.; PAGE, S. W. Identification of minor C18 triene and conjugated diene isomers in hydrogenate soybean oil and margarine by GC-MI-FT-IR Spectroscopy. **Journal Chromatographic Science**, v. 29, p. 324-330, 1991.

MOSSOBA, M. M.; YURAWECZ, M. P.; ROACH, J. A. G.; LIN, H. S.; MCDONALD, R. E.; FLICKINGER, B. D.; PERKINS, E. G. Elucidation of cyclic fatty acid monomer structures. Cyclic and bicyclic ring sizes and double bond position and configuration. **Journal of the American oil chemists' society**, v. 72, n. 6, 1995.

MOSSOBA, M. M.; YURAWECZ, M. P.; ROACH, J. A. G.; MCDONALD, R. E.; FLICKINGER, B. D.; PERKINS, E. G. Analysis of Cyclic Fatty Acid Monomer 2-Alkenyl-4,4-dimethylloxazoline Derivatives by Gas Chromatography-Matrix Isolation-Fourier Transform Infrared Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 3193-3196, 1996.

MOURÃO, D.M.; MONTEIRO, J.B.; COSTA, N.M.B.; STRINGHETA, P.C.; MINIM, V.P.R.; DIAS, C.M.G.C. Ácido linoleico conjugado e perda de peso. **Revista de Nutrição**, v.18, n.3, p.391-399, 2005.

NAGAO, K.; YANAGITA, T. Conjugated Fatty Acids in Food and Their Health Benefits. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 100, n. 2, p.152–157, 2005.

NEKOOEIAN, A. A.; EFTEKHARI, M. H.; ADIBI, S.; RAJAEIFARD, A. Effect of pomegranate seed oil on insulin release in rats with type 2 diabetes. **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 39, p. 130-135, 2014.

NEVES, A. A. Avaliação do aproveitamento de óleos alimentares usados para produção de biodiesel na área metropolitana do Porto. Dissertação de Mestrado - Universidade do Porto. Porto, 2008.

NUERNBERG, K. Comparison of different methylation methods for the analysis of conjugated linoleic acid isomers by silver ion HPLC in beef lipids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 598-602, 2007.

NUNES, J. C.; TORRES, A. G. Fatty acid and CLA composition of Brazilian dairy products, and contribution to daily intake of CLA. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 8, p. 782-789, 2010.

O'DONNELL, S.; DEMSHEMINO, I.; YAHAYA, M.; NWANDIKE, I.; OKORO, L.A Review on the Spectroscopic Analysis of Biodiesel. **European International Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 7, p. 137-146, 2013.

OLIVEIRA, M. Otimização do processo de concentração do ácido alfa-linolênico baseado na formação de adutos com ureia: efeito da temperatura e da quantidade de ésteres metílicos. Toledo, PR, 2013. Monografia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013.

PATIÑO, P. R.; ALTAHONA, L.; PÉREZ, P. J. O leite como alimento funcional: revisão. **Livestock Research for Rural Development**, v. 25, n. 8, 2013.

PARIZA, M.W.; PARK, Y.; COOK, M.E. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. **Progress in Lipid Research**, v.40, n. 4, p. 283-298, 2001.

PARK, Y. Conjugated linoleic acid (CLA): Good or bad trans fat? **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 2, suppl., p. S4-S12, 2009.

PARK, Y.; PARIZA, M. Mechanisms of body fat modulation by conjugated linoleic acid (CLA). **Food Research International**, v. 40, n. 3, p. 311-323, 2007.

PARSONS, J. B.; YAO, J.; FRANK, M. W.; JACKSON, P.; ROCK, C. O. Membrane Disruption by Antimicrobial Fatty Acids Releases Low-Molecular-Weight Proteins from *Staphylococcus aureus*. **Journal of bacteriology**, v. 194, p. 5294-5304, 2012.

PERINI, J. A. L.; STEVANATO, F. B.; SARGI, S. C.; VISENTAINER, J. E. L.; DALALIO, M. M. O.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 6, p. 1075-1086, 2010.

PHILIPPAERTS, A.; GOOSSENS, S.; JACOBS, P. A.; SELS, B. F. Catalytic production of conjugated fatty acids and oils. **ChemSusChem**, v. 4, p. 684-702, 2011.

PRESCHA, A.; GRAJZER, M.; DEDYK, M.; GRAJETA, H. The Antioxidant Activity and Oxidative Stability of Cold-Pressed Oils. **Journal Am Oil ChemSoc**, v. 91, p. 1291-1301, 2014.

RAINER, L.; HEISS, C. J. Conjugated linoleic acid: health implications and effects on body composition. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 104, n. 6, p. 963- 968, 2004.

RANI, P.; KHULLAR, N. Antimicrobial Evaluation of some Medicinal Plants for their Anti-enteric Potential against Multi-drug Resistant *Salmonella typhi*. **Phytotherapy research**, v. 18, p. 670-673, 2004.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation

decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RÉBLOVÁ, Z. Effect of temperature on the antioxidant activity of phenolic acids. **Czech Journal Food Science**, v. 30, p. 171-177, 2012.

REDA, S. Y. Estudo comparativo de óleos vegetais submetidos a estresse térmico. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2004.

REMMEIREIT, J. Bulk animal feeds containing conjugated linoleic acid. US Patent 6,042,869, Application 09/027, 075. Natural Nutrition Ltd, Norway. 2000.

RINALDI, R.; GARCIA, C.; MARCINIUK, L. L.; ROSSI, A. V.; SCHUCHARDT, U. Síntese de biodiesel: Uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1374-1380, 2007.

ROACH, J. A. G.; MOSSOBA, M. M.; YURAWECZ, M. P.; KRAMER, J. K. G. Chromatographic separation and identification of conjugated linoleic acid isomers. **Analytica Chimica Acta**, v. 465, p. 207-222, 2002.

SAHA, S. S.; GHOSH, M. Antioxidant and anti-inflammatory effect of conjugated linolenic acid isomers against streptozotocin-induced diabetes. **British Journal Nutrition**, v. 108, p. 974-983, 2012.

SASSANO G.; SANDERSON P.; FRANX J.; GROOT P.; STRAALLEN J. V.; BASSAGANYA-RIERA J. Analysis of pomegranate seed oil for the presence of jacaric acid. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, p. 1046-1052, 2009.

SARGI, S. C.; SILVA, B. C.; SANTOS, H. M. C.; MONTANHER, P. F.; BOEING, J. S.; SANTOS, O. O.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J.V. Antioxidant capacity and chemical composition in seeds rich in omega-3: chia, flax, and perilla. **Food Sci. Technol.** Campinas, v. 33, n. 3, p. 541-548, 2013.

SHIM, Y. Y.; GUI, B.; ARNISON, P. G.; WANG, Y.; REANEY, M. J. Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) bioactive compounds and peptide nomenclature: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 38, n. 1, p. 5-20, 2014.

SIANO, F.; ADDEO, F.; VOLPE, M. G.; PAOLUCCI, M.; PICARIELLO, G. Oxidative stability of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed oil to simulated gastric conditions and thermal stress. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 44, p. 8369-8378, 2016.

SMALL, D. M. Lateral chain packing in lipids and membranes. **Journal of lipid research**, v. 25, p. 1490-1500, 1984.

TAHVILDARI, K.; MOHAMMADI, S. Synthesis of ethyl ester (biodiesel) from linseed oil, using transesterification double step process (TDSP). **Academic Research International**, v. 5, n. 2, p. 27-32, 2014.

VASCONCELOS, T. B.; CARDOSO, A. R. N. R.; JOSINO, J. B.; MACENA, R. H. M.; BASTOS, V. P. D. Antioxidants and free radicals: peril or protection? **Unopar Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 16, n. 3, p. 213-219, 2014.

VISHAL P.; PROCTOR A. Photocatalytic Production and Processing of Conjugated Linoleic Acid-Rich Soy Oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5590-5596, 2006.

VOGEL, A. I. Química Orgânica – Análise Orgânica Qualitativa. 3ª ed., Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1987.

WATANABE, E.; RAZABONI, A. M.; BERALDO, C. C.; GIORDANI, A. T.; ANDRADE, D. determinação in vitro da atividade antibacteriana de detergente de mamona contra bactérias hospitalares. **Rev. Ciênc Farm Básica Apl**, v. 34, n. 1, p. 59-62, 2013.

YANG, T. S.; LIU, T. T. Optimization of Production of Conjugated Linoleic Acid from Soybean Oil. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 52, n. 16, p. 5079-5084, 2004.

YUAN, G. F.; CHEN, X. E.; LI, D. Conjugated linolenic acids and their bioactivities: a review. **Food Functional Journal**, v. 5, p. 1360-1368, 2014.

YURAWECZ, M. P.; MOLINA, A. A.; MOSSOBA, M.; KU, Y. Estimation of conjugated octadecatrienes in edible fats and oils. **Journal American Oil Chemist's Society**, v. 70, n. 11, p. 1093-1099, 1993.