



**UnB**

**Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica  
Instituto de Química  
Universidade de Brasília**

**Efeito da etapa adsortiva no teor de carotenóides do óleo de palma  
processado**

*Erislene Silva de Almeida*

**Brasília, 2021.**



**UnB**

**Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica  
Instituto de Química  
Universidade de Brasília**

## **Efeito da etapa adsortiva no teor de carotenóides do óleo de palma processado**

*Erislene Silva de Almeida*

*Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Química e Biológica do Instituto de Química da Universidade de Brasília como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do Título de Doutora em Tecnologias Química e Biológica.*

***Orientadora***

*Profa. Dra. Simone Monteiro e Silva*

**Brasília, 2021.**

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho a meus pais Amadeu e Nazaré.*

## **AGRADECIMENTOS**

*Mestrado e doutorado foi muito mais que uma mera experiência acadêmica. Tantas pessoas foram fundamentais para eu chegar aqui. O primeiro agradecimento não poderia deixar de ser para meus pais, sempre presentes e maiores incentivadores.*

*Todos excepcionais amigos e amigas que conheci durante a pós, e que são amizades que levarei para toda a vida. Mariana, Thayse, Weslany, Gabriel, Eliane, Gabriella, Fabi, Graciane, Leo. Presentes nas horas de alegria e nos momentos menos alegres. E não faltou conversa, carona, chororô, chá, café, coxinha e crochê entre cada experimento (acho que gostamos de fazer coisas que comecem coma letra 'c'). Obrigada por me aturarem com esse meu humor quase sempre ausente.*

*As amigas/irmãs da vida, Karina, Olyzi, Érica. O que dizer sobre vocês?! Quase impossível expressar o que sinto por vocês. Mas o que posso dizer é que cada conselho, broncas, incentivo, apoio incondicional, foram de grande importância para minha vida dentro e fora do meio acadêmico.*

*Aos colegas, professores e pesquisadores do LDPQ-UnB, agradeço pelo apoio, pelo auxílio em diversos momentos.*

*Todos que fizeram e fazem parte do grupo de pesquisa do qual faço parte, em especial aos colegas mais próximos, Isabela, Mari, Ludmilla, Leonardo, Hugo, Alisson.*

*Agradeço a todos os amigos e familiares que participaram direta ou indiretamente para realização e conclusão deste trabalho, me acompanhando e incentivando.*

*E o agradecimento mais que especial a Simone. Orientadora presente, paciente, incentivadora, interessada no meu crescimento profissional e pessoal. Porém, foi muito mais que uma orientadora, pois enxergou em mim um potencial que, quase sempre, eu tenho dificuldade em ver. Agradeço a ela por ser a pesquisadora que sou hoje.*

## RESUMO

Durante o armazenamento e processamento, os óleos vegetais passam por processo de oxidação, o que leva a degradação do óleo. A tendência atual de produtos mais saudáveis, torna fundamental entender esse processo oxidativo do óleo, assim como a degradação de compostos nutracêuticos, que leva a perda de valor nutricional do mesmo. Diante do atual interesse e das características diferenciadas do óleo de palma provenientes de palmeiras de diferentes espécies, e em especial da espécie híbrida (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*, HOPO), é fundamental conhecer suas características físicas, químicas e térmicas. O óleo de palma da espécie africana (*E. guineenses*, APO), mais estudado e comercialmente mais difundido, foi estudado para fins de comparação. HOPO e APO apresentaram diferente composição em ácidos graxos, o óleo híbrido apresentou alto teor de ácido oleico, enquanto o africano apresentou composição equilibrada em ácidos graxos saturados e insaturados. Além disso, diferenças importantes nas propriedades térmicas foram observadas: o HOPO demonstrou uma diminuição do ponto de fusão de mais de 3 °C em relação ao APO, e uma redução do ponto de cristalização de mais de 6 °C. Além de maior teor de ácidos graxos insaturados, o HOPO foi mais estável do que o APO devido a maiores níveis de antioxidantes. Outro fator que mostrou grande influência na formação de produtos de oxidação e degradação de carotenos foi a temperatura. Amostras de óleo bruto e branqueados com diferentes terras foram aquecidos entre 150 e 210 °C. Foi observada a forte influência da temperatura na formação de dienos e trienos, produtos de oxidação, e que, nas condições estudadas o isômero  $\beta$ -caroteno é preferencialmente adsorvido. Finalmente, quanto maior a degradação térmica do caroteno e quanto maior a remoção de caroteno por adsorção, maior foi a oxidação observada no óleo. Por fim, foi desenvolvido método de UHPLC – MS / MS que possibilitou diferenciar os isômeros  $\alpha$ - e  $\beta$ -carotenos, pois o  $\alpha$ -apresenta uma fragmentação a mais ( $m/z$  388). A redução dos isômeros  $\alpha$  e  $\beta$  no APO branqueado foi muito semelhante após o tratamento com os dois tipos diferentes de adsorventes. Para o óleo híbrido interespecífico, o adsorvente ácido proporcionou uma redução das duas formas, enquanto o adsorvente neutro reduziu principalmente a forma  $\beta$ . O trabalho se mostra de grande relevância, pois a caracterização do óleo de palma híbrido preenche uma lacuna atual da literatura. Além disso, trouxe importante progresso no entendimento de como o processo de adsorção afeta os isômeros de carotenóides remanescentes no óleo de palma branqueado, e a quantidade de produtos de oxidação formados, o que é essencial para melhorias no refino do óleo de palma.

**Palavras-chave:**  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 9-cis-  $\beta$ -carotenos; dienos; trienos; terras de branqueamento; cromatografia

## ABSTRACT

During storage and processing, vegetable oils undergo an oxidation process, which leads to oil degradation. The current trend towards healthier products makes it essential to understand this oil's oxidative process and the degradation of nutraceutical compounds, which leads to its loss of nutritional value. Given the current interest and differentiated characteristics of palm oil from plants of different species, especially the hybrid one (*Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*), it is essential to know its physical, chemical, and thermal characteristics. The more studied and commercially exploited palm oil from the African specie (*E. guineensis*) was studied for comparison's sake. The African and Hybrid species had a different fatty acid composition; the hybrid oil had a high oleic acid content, while the African has a balanced composition of saturated and unsaturated fatty acids. Furthermore, important differences in thermal properties were observed: HOPO demonstrated a decrease in the melting point of more than 3 °C in relation to APO and a reduction of the crystallization point of more than 6 °C. In addition to a higher content of unsaturated fatty acids, HOPO was more stable than APO due to higher antioxidants. Another factor that greatly influenced the formation of oxidation products and the degradation of carotenes was temperature. Crude oil samples and bleached with different adsorbents were heated between 150 and 210 °C; the strong influence of temperature on the formation of oxidation products such as dienes and trienes was observed. It was observed that under the conditions studied, the  $\beta$ -carotene isomer was preferentially adsorbed: the greater the thermal degradation and removal of carotene by adsorption, the greater the oxidation observed in the oil. Finally, a UHPLC method – MS / MS was developed, which made it possible to differentiate the  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene isomers, as the  $\alpha$ -presents an extra fragmentation (m/z 388). The reduction of  $\alpha$  and  $\beta$  isomers in the bleached APO was very similar after treatment with the two different adsorbents. For the interspecific hybrid oil, the acid adsorbent reduced both forms, while the neutral adsorbent mainly reduced the  $\beta$  form. The work is of great relevance because the characterization of hybrid palm oil fills a current gap in the literature. In addition, it has brought significant progress in understanding how the adsorption process affects the isomers of carotenoids remaining in bleached palm oil and the oxidation products formed, which is essential for improvements in the refining of palm oil.

**Keywords:**  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 9-*cis*- $\beta$ -carotenes; dienes; trienes; bleaching earth; chromatography

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>16</b>
1.1	Introdução e Objetivos .....	16
	Referências .....	19
<b>2</b>	<b>Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>21</b>
2.1	Óleos vegetais.....	21
2.2	Óleo de Palma.....	28
	2.2.1 Compostos minoritários .....	34
2.3	Oxidação de Lipídios .....	40
	2.3.1 Mecanismos de oxidação .....	42
	2.3.2 Determinação do grau de oxidação do óleo .....	46
2.4	Refino de Óleos Vegetais.....	49
	2.4.1 Branqueamento.....	54
	Referências .....	58
<b>3</b>	<b>Thermal and Physical Properties of Crude Palm Oil with Higher Oleic Content</b>	<b>67</b>
3.1	Introduction .....	68
3.2	Material and Methods .....	70
	3.2.1 Physicochemical Characterization.....	70
	3.2.2 Physical and Thermal Properties .....	73
3.3	Results and Discussion .....	74
	3.3.1 Chemical Characterization of the Oils .....	74
	3.3.2 Physicochemical Properties.....	76
	3.3.3 Thermal Analysis of the Oils.....	77
3.4	Conclusions .....	81
	References .....	82
<b>4</b>	<b>Effects of Thermal Treatment and Bleaching on the Concentration of Carotene and Oxidation Products in Palm Oils.....</b>	<b>86</b>
4.1	Introduction .....	87
4.2	Material and Methods .....	90

4.2.1	Material .....	90
4.2.2	Analysis.....	91
4.2.3	Experimental procedure .....	92
4.3	Results and Discussion .....	94
4.3.1	Oil quality characterization .....	94
4.3.2	Carotenes removal by adsorption .....	100
4.3.3	Oxidation during heating treatment .....	101
4.3.4	Thermal degradation of carotenoids .....	103
4.3.5	Carotenoid isomers quantification in bleached oil .....	105
4.4	Conclusion.....	109
	References .....	109
<b>5</b>	<b>Identification of Carotenoid Isomers in Crude and Bleached Palm Oils by Mass Spectrometry .....</b>	<b>114</b>
5.1	Introduction .....	115
5.2	Material and Methods .....	118
5.2.1	Oil Characterization .....	118
5.2.2	Chemical Standards .....	119
5.2.3	Adsorbents.....	120
5.2.4	Bleaching experiments.....	120
5.2.5	Analytical techniques.....	121
5.3	Results and Discussion .....	122
5.3.1	Crude Oil Characterization.....	122
5.3.2	Total carotene content.....	124
5.3.3	Chromatography .....	125
5.3.4	MS/MS Analysis.....	126
5.3.1	Carotenoids identification in bleached oils .....	130
5.4	Concluding remarks.....	132
	References .....	133
	Supplementary material.....	136
<b>6</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>147</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1: Ácido graxo com denominação ômega: em azul contagem até a dupla ligação a partir do carbono do grupo carboxila; em vermelho contagem a partir do grupo metila terminal (carbono ômega) .....	25
Figura 2-2: Reação de interesterificação com rearranjo entre ácidos graxos em uma molécula de triacilglicerol, onde O representa ácido oleico e S o ácido esteárico .....	27
Figura 2-3: Usos para o óleo de palma (Basiron, 2005).....	30
Figura 2-4: Fruto da palma e óleos extraídos do mesocarpo (óleo de palma) e da castanha (palmiste).....	32
Figura 2-5: Estrutura de alguns carotenos (Adapatado de <a href="http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotenoids/carotenoids.htm">http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotenoids/carotenoids.htm</a> Acessado em 15/06/2021).....	36
Figura 2-6: Estágios de biossíntese e possíveis transformações em carotenoides. Reações: (1) dessaturação, (2) ciclização, (3) hidroxilação, (4) epoxidação (5) oxidação .....	38
Figura 2-7: Estruturas de tocoferóis. As estruturas de tocotrienóis são idênticas aos tocoferóis correspondentes, exceto pela presença de ligações duplas nas posições 3', 7' e 11' indicado pelas setas (Adaptada de Kiokias, Varzakas, Oreopoulou, 2008) .....	40
Figura 2-8: Etapas de oxidação dos óleos (Fonte Shahidi 2010).....	43
Figura 2-9: Formação de dienos e trienos conjugados.....	47
Figura 2-10: Esquema de decomposição/isomerização de carotenoides (adaptado de Rodriguez-Amaya e Kimura, 2004).....	48
Figura 2-11: Esquema representativo do processo de refino de óleos vegetais - Adaptado de Gibon, (2012).....	52
Figura 2-12: Representação tridimensional idealizada da estrutura da bentonita de cálcio em camadas 2:1 (Taylor, 2005) .....	57
Figura 2-13: Argila ativada com dissolução ácida e substituição de cátion (Taylor, 2005)[99].....	58
Figure 3-1: DSC curves in a heating and cooling program of APO and HOPO for run 1	78
Figure 3-2: DSC curves in a heating and cooling program of APO and HOPO for run 2. ....	78

Figure 3-3: TGA curves of palm oil APO and HOPO .....	81
Figura 4-1: Uv-vis absorption spectrum of crude a) HOPO b) APO and after the addition of carotenes by ABE and NBE adsorbents.....	96
Figura 4-2: APO and HPO UV-vis spectra after carotene adsorption onto LDH, PCH and Sepiolite.....	98
Figura 4-3: Heated oils. Comparison between HOPO (a) and APO (a) concerning the total carotene content remaining in the oil and formation of dienes and trienes..	102
Figura 4-4: Carotenes remaining in the HOPO and APO after heating (150 to 210 °C)	103
Figura 4-5: Representative chromatogram of $\alpha$ -carotene, $\beta$ -carotene and 9-cis- $\beta$ -carotene in crude palm oils by HPLC: (a) Hybrid palm oil, (b) African palm oil.....	106
Figura 4-6: Carotenes adsorption for oil without pre-treatment, crude HOPO and APO, and oils bleached at 90 ° C, 105 ° C and 120 ° C in 2.5% adsorbent and 5% ABE and NBE .....	108
Figure 5-1: Representative chromatogram of model system representing a vegetable oil with high $\beta$ -carotene content: (1) monoolein (RT: 0.5 min); (2) tricaprylin (RT: 0.7 min), (3) trans- $\beta$ -apo-8'-carotenal (RT: 1.1 min), (4) tricaprin (RT: 1.3 min), (5) 1,2- and 1,3- diolein (RT: 2.2 min), (6) trilaurin (RT: 2.7 min), (7) $\beta$ -carotene (RT: 3.9 min), (8) trimyristin (RT: 4.2 min), (9) tripalmitin and triolein (RT: 5.6 min). .....	126
Figure 5-2: Left) (A) High resolution ESI(+)-MS spectrum of $\alpha$ -carotene (radical cation) (B) ESI(+)-MS/MS spectrum of $\alpha$ -carotene (precursor ion of m/z 536). (Right) (A) High resolution ESI(+)-MS spectrum of $\beta$ -carotene (radical cation) (B) ESI(+)-MS/MS spectrum of $\beta$ .....	128
Figure 5-3: Proposed fragmentation pattern for carotene isomers main fragments. (Left) Rationale for the $\alpha$ - isomer fragmentation. (Right) Rationale for the $\beta$ - isomer fragmentation. ....	129
Figure 5-4: Representative ion extracted chromatogram (m/z 536) of (A) native and (B) interspecific hybrid palm oil: crude (red); bleached with acid active adsorbent (Tonsil OPT 210 FF) (blue), bleached with neutral adsorbent (Pure Flo B-80) (green). The black line .....	131

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2-1: Composição dos principais ácidos graxos saturados e insaturados (%) de diferentes óleos vegetais 4 (adaptada de Oswell e Gunstone (2005) e Ribeiro et al. (2018)) .....	24
Tabela 2-2: Composição geral em componentes desejáveis e indesejáveis de óleos comestíveis e seu efeito geral na qualidade do óleo (Vaisali et al. (2015)) ...	50
Table 3-1: Physicochemical characteristics of hybrid (HOPO - <i>E. oleifera</i> x <i>E. guineensis</i> ) and African (APO - <i>E. guineensis</i> ) palm oil.....	75
Table 3-2: Densities and viscosities of palm oils as a function of temperature *.....	77
Table 3-3: Thermal events APO and HOPO obtained from the differential scanning calorimetry (DSC) curves.....	80
Table 4-1: Total carotene content and adsorbed on HOPO and APO, bleached crude oils, considering different types of adsorbents and worked temperatures (Total carotene: APO 451.3 and HPO 934.3mg/Kg) .....	101
Table 4-2: Degradation of carotenes from African (APO) and hybrid (HOPO) palm oils submitted to heating in a nitrogen atmosphere. The results of carotenes are expressed as a percentage of total carotenes and $\alpha$ - and $\beta$ -carotenes remaining in the oil after heating .....	104
Table 5-1: Oil Characterization: Fatty acids profile, DOBI, free fatty acid (expressed as percentage of palmitic) and total carotenes content.....	123
Table 5-2: Fatty acid compounds identified in the model system representing a vegetable oil with high $\beta$ -carotene content by UHPLC-ESI-MS.....	127

## LISTA DE MATERIAL SUPLEMENTAR

- Figure S5.1: (A) High resolution ESI(+)-MS spectrum of monoolein ( $[M+H]^+$  of  $m/z$  357); (B) ESI(+)-MS/MS spectrum of monoolein (precursor ion of  $m/z$  357). - 136
- Figure S5.2: (A) High resolution ESI(+)-MS of tricaprylin ( $[M+NH_4]^+$ ). The ion of  $m/z$  493 ( $[M+Na]^+$ ) was also noted in the spectrum; (B) ESI(+)-MS/MS of tricaprylin (precursor ion of  $m/z$  488). ----- 137
- Figure S5.3: (A) High resolution ESI(+)-MS of trans- $\beta$ -apo-8'-carotenal ( $[M+H]^+$ ); (B) ESI(+)-MS/MS of trans- $\beta$ -apo-8'-carotenal (precursor ion of  $m/z$  417). - 138
- Figure S5.4: (A) High resolution ESI(+)-MS of tricaprin ( $[M+NH_4]^+$ ); (B) ESI(+)-MS/MS of tricaprin (precursor ion of  $m/z$  572). ----- 139
- Figure S5.5: (A) High resolution ESI(+)-MS of 1,2-diolein and 1,3-diolein ( $[M+NH_4]^+$ ); (B) ESI(+)-MS/MS of 1,2- and 1,3-diolein (precursor ion of  $m/z$  638). -- 140
- Figure S5.6: (A) High resolution ESI(+)-MS of trilaurin ( $[M+NH_4]^+$  of  $m/z$  656 or  $[M+Na]^+$  of  $m/z$  661); (B) ESI(+)-MS/MS of trilaurin (precursor ion of  $m/z$  661).- 141
- Figure S5.7. (A) High resolution ESI(+)-MS of trimyristin ( $[M+NH_4]^+$ ); (B) ESI(+)-MS/MS of trimyristin (precursor ion of  $m/z$  740).----- 142
- Figure S5.8: High resolution ESI(+)-MS of tripalmitin ( $[M+NH_4]^+$ ); (B) ESI(+)-MS/MS of tripalmitin (precursor ion of  $m/z$  824). ----- 143
- Figure S5.9: High resolution ESI(+)-MS of triolein ( $[M+NH_4]^+$ ); (B) ESI(+)-MS/MS of triolein (precursor ion of  $m/z$  902).----- 144
- Figure S5.10: Representative chromatogram of a mixture of  $\alpha$ -carotene (RT: 3.8 min) and  $\beta$ -carotene (3.9 min). ----- 145

## LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

3-MCPD	3-nomocloropropano-diol
ABE	Terra de Branqueamento Ácida (Acid Bleached Earth)
Abiove	Associação Brasileira de Indústrias de Óleos Vegetais
AGIs	Ácidos Graxos Insaturados
AGL/FFA	Ácidos Graxos Livres / Free Fat Acid
AGMIs	Ácidos Graxos Monoinsaturados
AGPIs	Ácidos Graxos Poliinsaturados
AGs	Ácidos Graxos
AGSs	Ácidos Graxos Saturados
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS	Sociedade Americana de Química dos Óleos (American Oil Chemists' Society)
APCI	Ionização química de pressão atmosférica (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APO	Óleo de Palma Africano
CG	Cromatografia Gasosa
CPO	Óleo de Palma Bruto (Crude Palm Oil)
DAD	Detector de Arranjo de Diodo
DLC / dcb	Dupla Ligação Conjugada / double conjugated bond
DLG	Dupla Ligação Conjugada
DOBI	Índice de Deterioração de Clareamento (Deterioration of the Bleaching Index)
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial (Differential Scanning Calorimetry)
DTG	Termogravimetria Derivada (Derived Thermogravimetry)
ESI	Ionização por Eletrospray (Electrospray Ionization)
FID	Detector de Ionização por Chama (Flame Ionization Detector)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPO/HOPO	Óleo de Palma Híbrido (Hybrid Palm Oil) / Óleo de Palma com Alto teor de Oleico (High Oleic Palm Oil)
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano

LC	Cromatografia Líquida (Liquid Chromatography)
LDH	Dupla Camada de Hidróxido (Layered Double Hydroxide)
MS	(Espectrometria de Massas (Mass Spectrometry)
MTBE	Éter metil-terc-butílico
NBE	Terra de Branqueamento Neutra (Neutral Bleached Earth)
nm	Nanômetros
OOO	Oleico Oleico Oleico (Oleic Oleic Oleic)
PCH	Heteroestruturas Porosa de Argila (Porous Clay Heterostructures)
PDA	Detector de arranjo de fotodiodo / photodiode-array
PLP	Palmitico Linoleico Palmitico (Palmitic Linoleic Palmitic)
POL	Palmitico Oleico Linoleico (Palmitic Oleic Linoleic)
PORIM	Instituto de Pesquisa de Óleo de Palma da Malásia (Palm Oil Research Institute of Malaysia)
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RMN / NMR	Ressonância Magnética Nuclear / Nuclear Magnetic Resonance
RSPO	Mesa Redonda de Óleo de Palma Sustentável (Roundtable For Sustainable Palm Oil)
SSS	Saturado Saturado Saturado (Saturated Saturated Saturated)
SUU	Saturado Insaturado Insaturado (Saturated Unsaturated Unsaturated)
TAGs	Triacilgliceróis
TEA	Trietilamina
THF	Tetrahidrofurano
TOTOX	Oxidação Total
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência
UUU	Insaturado Insaturado Insaturado (Unsaturated Unsaturated Unsaturated)
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture)
UV-Vis	Ultravioleta Visível

## **CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO**

---

# 1 Introdução

## 1.1 Introdução e Objetivos

O estudo dos óleos vegetais é de grande interesse devido ao aumento de sua demanda em função do aumento da riqueza global, à evolução da conscientização sobre problemas de saúde relacionados aos ácidos graxos *trans*, bem como à ampliação do uso de óleos vegetais para fornecimento de matéria-prima para biocombustíveis como um substituto para os combustíveis fósseis <sup>1</sup>.

A demanda por fontes de alimentos e energias renováveis vem se intensificando ao longo dos anos. Os óleos vegetais desempenham importante papel como de fonte de alimento, pois, além de ácidos graxos essenciais à saúde humana, seu conteúdo energético permite o maior armazenamento possível de energia na menor quantidade possível de alimento, e também possibilita o consumo de vitaminas lipossolúveis, como A, D, E e K, compostos nutracêuticos como esteróis, carotenos e tocóis <sup>1</sup>.

O crescimento da demanda por alimentos nos países em desenvolvimento, principalmente os mais populosos, alavancou o crescimento do setor de oleaginosas, evidenciando a necessidade de encontrar fontes de grãos que tenham alto rendimento por área plantada, diminuindo o desmatamento de novas áreas para o cultivo <sup>2</sup>. Estima-se que a demanda doméstica de óleo no Brasil seja de 207 milhões de toneladas entre 2020 e 2021, podendo chegar a 213 milhões de toneladas até 2022. Os óleos de palma e de soja são os mais consumidos, com 35% e 28%, respectivamente <sup>3</sup>.

O grande destaque do óleo de palma se deve à sua utilização na indústria de alimentos, cosméticos, higiene e limpeza, agroenergia e biocombustíveis <sup>4</sup>. Além disso, a palma tem produtividade por hectare cerca de 10 vezes maior que a da soja <sup>5</sup>. Outro ponto



de destaque é o teor diferenciado de gordura sólida em comparação a outros óleos vegetais <sup>6</sup>, o que proporciona o seu fracionamento em produtos de diversas utilizações <sup>7</sup>.

Palma de óleo é o termo usado no meio técnico e o mais aceito mundialmente para se referir à palmeira produtora de óleo de palma, que apresenta condições ideais para seu desenvolvimento no solo e no clima tropical <sup>4</sup>. Dentre os diferentes tipos de palma, podemos destacar a espécie originária da África, *Elaeis guineensis*, e a espécie americana, *Elaeis oleifera*. No Brasil, palma de óleo tem sua maior produção em regiões amazônicas, sendo desenvolvida em larga escala sobretudo em áreas já desmatadas ou em alto grau de degradação <sup>4</sup>.

Há também um cultivar híbrido interespecífico dessas duas espécies, do qual se obtém o óleo híbrido ou óleo de palma com alto teor oleico. É um cultivar que agrega vantagens das duas espécies parentais, como menor crescimento vertical, maior resistência a doenças e pragas, grande produtividade por área plantada, além de composição diferenciada em ácidos graxos insaturados, compostos antioxidantes e menores índices de acidez, pelo fato de a hibridização promover menor atividade das lipases, enzimas ativadas quando a colheita dos frutos é inadequada <sup>8</sup>.

Porém, a literatura ainda é escassa quanto a dados relativos a propriedades físicas e térmicas desse óleo híbrido. Conhecer essas informações é de grande importância para estabelecer as condições de processamento. A determinação das propriedades termofísicas dos óleos híbridos é essencial para promover o seu uso em alimentos de base lipídica (como margarinas, cremes vegetais, chocolates e sorvetes), a elaboração de processos para produção, transporte e embalagem de óleo, o processamento de alimentos fritos, projeto de aparelhos e sistemas de controle do processo de fritura, bem como a sua utilização como outras fontes de óleo diesel <sup>9</sup>.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar condições de branqueamento, similar ao processamento industrial do óleo, para determinar seu impacto na formação de produtos de oxidação e alterações nas concentrações de carotenos no óleo de palma. Para isso, foram cumpridos os seguintes objetivos específicos:

- Determinar as propriedades térmicas e físico-químicas do óleo híbrido interespecífico e suas influências no produto branqueado;
- Utilizar técnicas cromatográficas e espectrométricas para identificar isômeros  $\alpha$ - e  $\beta$ -carotenos, e o produto de isomerização do 9-*cis*- $\beta$ -caroteno, presentes em óleo de palma;
- Determinar a influência de diferentes tipos de adsorventes e da temperatura na degradação do óleo e dos principais isômeros de carotenos;
- Avaliar a seletividade de adsorventes comerciais na adsorção dos isômeros de carotenos; e
- Avaliar a degradação térmica e a oxidação dos óleos de palma híbrido interespecífico e africano submetidos a aquecimento em condições similares àquelas ao que o óleo é submetido durante a sua utilização doméstica e branqueamento industrial.

O presente trabalho está organizado em capítulos. O **Capítulo 1** aborda os principais problemas e objetivos desta tese de doutorado. No **Capítulo 2**, consta a revisão bibliográfica, que contextualiza esta pesquisa em relação a outros trabalhos já disponíveis na literatura. O **Capítulo 3** apresenta o artigo “*Thermal and Physical Properties of Crude Palm Oil with Higher Oleic Content*”, publicado na revista *Applied Sciences*. Este artigo trata da caracterização físico-química e térmica do óleo de palma híbrido interespecífico. O **Capítulo 4** apresenta o artigo intitulado “*Effects of Thermal Treatment and Bleaching on the Concentration of Carotene and Oxidation Products in Palm Oils*”, que trata da

influência da temperatura e de terras de branqueamento comerciais e sintetizadas pelo grupo de estudo sobre adsorção na Universidade Federal do Ceará na formação de produtos de oxidação do óleo, além da degradação e adsorção de carotenos por essas terras de branqueamento. O artigo será submetido ao periódico *European Journal of Lipid Science and Technology*. O **Capítulo 5** apresenta o artigo “*Identification of carotenoid isomers in crude and bleached palm oils by mass spectrometry*”, publicado na *LWT – Food Science and Technology*. Esse artigo identifica os isômeros de  $\alpha$ - e  $\beta$ -carotenos em óleos de palma bruto e processados por espectrometria de massas. O **Capítulo 6** apresenta as conclusões sobre o trabalho desenvolvido.

## Referências

1. Parcell, J. Global Edible Vegetable Oil Market Trends. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.* **2**, (2018).
2. FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Prospective for the oilcrop sector. <http://www.fao.org/3/y4252e/y4252e05d.htm>.
3. F, U.-U. S. D. of A. Oilseeds: World Markets and Trade. 39 <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf> (2021).
4. ABRAPALMA - Associação Brasileira de Produtores de Óleo de Palma. Sobre a palma. <http://www.abrapalma.org/pt/sobre-o-fruto-de-palma/>.
5. Pirker, J., Mosnier, A., Kraxner, F., Havlík, P. & Obersteiner, M. What are the limits to oil palm expansion? *Glob. Environ. Chang.* **40**, 73–81 (2016).
6. Habi Mat Dian, N. L. Palm Oil And Palm Kernel Oil: Versatile Ingredients For Food Applications. *J. Oil Palm Res.* **29**, 487–511 (2018).
7. Agropalma. Products. <https://www.agropalma.com.br/en/products>.
8. Mozzon, M., Foligni, R. & Tylewicz, U. Chemical Characteristics and Nutritional Properties of Hybrid Palm Oils. in 149–170 (2019). doi:10.5772/intechopen.75421.
9. Rojas, E. E. G., Coimbra, J. S. R. & Telis-Romero, J. Thermophysical Properties of Cotton, Canola, Sunflower and Soybean Oils as a Function of Temperature. *Int. J. Food Prop.* **16**, 1620–1629 (2013).

## **CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Óleos vegetais

Uma maior procura por alimentos mais saudáveis, gerou uma mudança significativa nas fontes de gorduras consumidas nas últimas décadas, aumentando o interesse em óleos devido ao seu alto teor de ácidos graxos mono e poli-insaturados quando comparados às gorduras animais. Assim sendo, alimentos processados foram reformulados com óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa por causa de seus reconhecidos benefícios nutricionais.

Os óleos vegetais estão presentes no cotidiano das pessoas, sendo utilizados diretamente na cocção de diversos alimentos, em frituras ou no tempero de saladas, além de também fazerem parte da composição de diferentes alimentos industrializados.

Os óleos vegetais estão presentes no cotidiano das pessoas, sendo utilizados diretamente na cocção de diversos alimentos, em frituras ou no tempero de saladas, além de também fazerem parte da composição de diferentes alimentos industrializados.

Na indústria de alimentos, os óleos vegetais apresentam uma diversidade de usos em diferentes segmentos industriais, como, por exemplo, na produção de pães, bolos, margarinas, sorvetes e maioneses. Também possuem aplicação em outros setores não alimentícios, como indústrias de sabões e detergentes, cosméticos, lubrificantes, tintas, vernizes e biodiesel<sup>1,2</sup>. Os óleos vegetais podem ser obtidos a partir de grãos oleaginosos, como soja, canola, girassol, mamona, algodão e colza, e alguns frutos, como a palma e a oliva.

Conforme dados da USDA (*United States Department of Agriculture*), há previsão de aumento de 5% na produção de oleaginosas entre 2020 e 2021, principalmente pelo aumento na produção de soja na América do Sul e Estados Unidos. Além disso, projeções

indicam que no período de 2020/2021, a produção de oleaginosas atingirá valores recordes, atingindo cerca de 632 milhões de toneladas <sup>3</sup>. A produção estimada no Brasil de cereais, leguminosas e oleaginosas no ano de 2020 foi de 254,1 milhões de toneladas <sup>4</sup>.

A cultura de oleaginosas tem uma importância econômica e social para as regiões produtoras, como, por exemplo, a produção de soja no cerrado (região Centro-oeste), e a produção de palma em regiões do norte do Brasil. O impacto das culturas de soja e palma nas regiões produtoras ocorre por meio do desenvolvimento econômico e tecnológico nas áreas agrícola e industrial, além da geração de empregos, o que resulta em melhora no índice de desenvolvimento humano e, conseqüentemente, na qualidade de vida da população dessas regiões <sup>5</sup>.

Os óleos vegetais pertencem à classe dos lipídios, macronutrientes importantes para a dieta. Estão presentes na membrana celular e participam do metabolismo das plantas <sup>6</sup>. Óleos vegetais são uma fonte importante de energia para seres humanos e plantas, além de apresentarem em sua composição componentes minoritários essenciais na dieta, como fosfolipídios, fitosteróis, tocoferóis e tocotrienóis (vitamina E) e carotenos (pró-vitamina A) <sup>7</sup>.

Os óleos vegetais brutos são constituídos principalmente de triacilgliceróis (TAGs), moléculas formadas por três ácidos graxos esterificados em uma molécula de glicerol, correspondente a aproximadamente 95% de sua composição. Há um grande número de moléculas de TAGs possíveis, pois os ácidos graxos que as compõem variam no tamanho da cadeia, existência, número, orientação e posição das insaturações, havendo, desse modo, diferentes possibilidades de alocação e tipos de ácido graxo que podem se ligar à molécula de glicerol <sup>8</sup>. Os óleos vegetais brutos são constituídos principalmente de triacilgliceróis (TAGs), moléculas formadas por três ácidos graxos esterificados em uma molécula de glicerol, correspondente a aproximadamente 95% de sua composição. Há um grande

número de moléculas de TAGs possíveis, pois os ácidos graxos que as compõem variam no tamanho da cadeia, existência, número, orientação e posição das insaturações, havendo, desse modo, diferentes possibilidades de alocação e tipos de ácido graxo que podem se ligar à molécula de glicerol <sup>9</sup>.

Os componentes minoritários podem ser classificados em dois tipos: glicerolipídios e não glicerolipídios. Os glicerolipídios são ésteres de glicerol <sup>10</sup>. Os não glicerolipídios são os componentes não saponificáveis presentes no óleo. Esses não glicerolipídios podem ser extraídos do óleo por uma reação com base forte, por se tratar de fração insaponificável, podendo ser separada da fração saponificável com o uso de solventes orgânicos, como éter de petróleo e hexano <sup>11,12</sup>. Essa fração insaponificável é de grande relevância em pesquisas, pois é rica em compostos nutracêuticos e contém tocoferóis, compostos fenólicos e carotenoides, que são fundamentais na estabilidade oxidativa do óleo <sup>11</sup>.

Os ácidos graxos (AGs), presentes nos óleos vegetais, pertencem à classe dos lipídios, assim como os TAGs <sup>13</sup>. O que diferencia um óleo do outro é a composição em AGs saturados e insaturados, determinados por cromatografia gasosa (CG), conforme pode ser visto na Tabela 2-1 <sup>9,14</sup>. A composição em AGs é um parâmetro importante para identificação de autenticidade e para a estabilidade do óleo <sup>15 16</sup>. Outra alternativa possível para realizar a determinação de AGs no óleo é por ressonância magnética nuclear (RMN), <sup>17</sup> proporcionando uma análise rápida, não destrutiva e de simples preparo de amostras.

Tabela 2-1: Composição dos principais ácidos graxos saturados e insaturados (%) de diferentes óleos vegetais 4 (adaptada de *Oswell e Gunstone (2005) e Ribeiro et al. (2018)*)

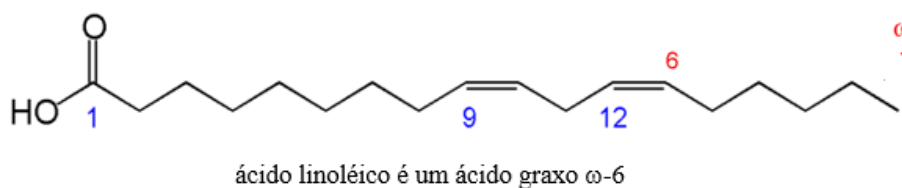
Óleo Vegetal	Ácido graxo				
	(número de carbono : quantidade de insaturações)				
	Palmítico (16:0)	Estearico (18:0)	Oleico (18:1)	Linoleico (18:2)	Linolênico (18:3)
Palma	35	12	38	10	0,6
Palma com alto teor de oleico	27	3	56	11	0,4
Coco	9	2	7	1	-
Oliva	10	2	78	7	1
Soja	11	4	22	53	8
Girassol	7	3	14	75	-
Girassol com alto teor de oleico	6	2	74	16	-
Milho	13	3	31	52	1
Algodão	27	2	18	51	Traço

Os óleos comestíveis são fontes de AGs saturados, insaturados e poliinsaturados, que têm efeitos diretos na saúde. Esses AGs apresentam importante papel no armazenamento e fornecimento de energia para o metabolismo celular<sup>8</sup>. A maioria dos óleos utilizados com fins alimentícios é composta por cinco AGs, sendo eles palmítico, estearico, oleico, linoleico

De modo geral, o tipo de AG ingerido pode trazer efeitos diversos na saúde. Existem estudos que associam a ingestão de ácidos mono e poliinsaturados a efeitos benéficos, como proteção contra doenças cardiovasculares e cânceres e um bom desempenho de funções cerebrais<sup>1</sup>. O ácido graxo monoinsaturado (AGMI) mais comumente presente na alimentação é o ácido oleico<sup>17</sup>, encontrado em teor majoritário no azeite de oliva<sup>18</sup> e no óleo de palma híbrido. Uma alimentação rica em ácido oleico pode levar à redução dos níveis de colesterol, induzir efeitos anti-inflamatórios, além de ter efeito protetor contra o câncer de mama e melhora da função do sistema imunológico<sup>19</sup>. Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs) também desempenham importantes funções na nutrição humano. Os



ácidos graxos essenciais, ômega 3 e 6, são poliinsaturados. A denominação ômega seguida do número refere-se à posição da dupla ligação, começando a contagem dos carbonos a partir do grupamento metil. Deste modo, a posição da primeira ligação dupla pode ser do tipo ácidos graxos ômega-3, como o ácido linolênico (18: 3), e ômega-6, ácido linoléico (18: 2) <sup>1</sup> (Figura 2-1).



*Figura 2-1: Ácido graxo com denominação ômega: em azul contagem até a dupla ligação a partir do carbono do grupo carboxila; em vermelho contagem a partir do grupo metila terminal (carbono ômega)*

Por outro lado, uma alimentação que apresente excesso de ácidos graxos saturados (AGSs) pode levar a um maior risco de obesidade e doenças associadas, como a dislipidemia, resistência à insulina, doença hepática gordurosa não alcoólica <sup>20</sup>, maior risco de doenças cardiovasculares <sup>1</sup> e aumento dos níveis de colesterol total <sup>18</sup>. Porém, vale ressaltar que os efeitos metabólicos dos AGSs dependerão do comprimento de sua cadeia, pois AGSs de cadeia longa levam aos distúrbios metabólicos já citados, enquanto os de cadeia curta e média têm efeitos benéficos na promoção do metabolismo <sup>20</sup>. Como exemplo de AG de cadeia longa, tem-se o ácido palmítico, um dos principais componentes do óleo de palma africano <sup>19, 20</sup>.

Os AGs *trans*, cujos efeitos na saúde são relevantes, apresentam estruturas quase lineares, permitindo um bom empacotamento da fase sólida <sup>22</sup>. Esse tipo de gordura se mostrou uma alternativa ao uso das gorduras saturadas, devido ao fato de o consumo de AGSs ter efeitos conhecidamente danosos à saúde <sup>23</sup>. Os AGs *trans* acarretariam produtos com maior teor de insaturados, porém mantendo características de AGSs, como

plasticidade e maior resistência à oxidação. No entanto, hoje é conhecido que, assim como AGSs, as gorduras *trans* também têm efeitos danosos para o organismo.

Não existe a configuração *trans* em AGs na natureza, então essa mudança na cadeia surge como resultado do processamento industrial, em especial na etapa de desodorização de refino ou durante o processo de hidrogenação de óleos, que visa adicionar hidrogênio às duplas ligações e pode levar à saturação incompleta das ligações, podendo ocasionar a isomerização *cis/trans*<sup>22</sup>. Durante a etapa de desodorização, são utilizadas temperaturas elevadas (acima de 200 °C) para remover compostos de odor e ácidos graxos livres (AGLs) do óleo. Submeter o óleo com alto teor de AGIs a altas temperaturas por tempo elevado pode levar a uma mudança na conformação do AG, que passa da forma *cis* para a forma *trans*, pois a dupla ligação dos AGIs é o sítio reativo dessa isomerização. Desse modo, quanto mais insaturado o óleo, maior a chance de formar gordura *trans*.

Como alternativa à gordura *trans*, é possível utilizar óleos que naturalmente apresentem em sua constituição maior teor de AGSs, como é o caso dos óleos de palma e de coco, ou utilizar a interesterificação, que serve para óleos que não tenham alto teor de AGSs<sup>23,24</sup>. A interesterificação envolve a redistribuição dos ácidos graxos que compõem os triacilgliceróis presentes no óleo sobre suas porções de glicerol,<sup>25</sup> Figura 2- 2, mostra um exemplo dessa redistribuição. Essa reação acontece naturalmente quando o óleo é aquecido acima de 200 °C por um longo período. A utilização de catalisadores permite que a interesterificação ocorra em temperaturas abaixo de 50 °C<sup>22</sup>. A grande vantagem desse processo é que não se tem formação de AGs *trans*<sup>26</sup>.



Figura 2-2: Reação de interesterificação com rearranjo entre ácidos graxos em uma molécula de triacilglicerol, onde O representa ácido oleico e S o ácido esteárico

A composição em AGs também tem importância quanto à funcionalidade química de um óleo vegetal, sendo fator de grande relevância para a indústria<sup>27</sup>. Industrialmente, é importante conhecer a composição de AGs do óleo, uma vez que ela afeta suas propriedades físicas, como ponto de fusão, densidade e calor específicos, viscosidade e calor de cristalização. Esses são pontos essenciais para projetos de plantas e determinação de condições de processamento de óleos<sup>15</sup>. Em muitos produtos alimentícios e durante o processamento, a cristalização do óleo é utilizada para modificar suas propriedades, e permitir, por exemplo, a permanência do líquido durante o fracionamento e a distribuição de tamanho e dispersão da fase cristalina adequados<sup>28</sup>.

O fracionamento é o processo no qual as espécies mais saturadas no óleo são cristalizadas durante o tratamento de baixa temperatura e, em seguida, removidas<sup>29</sup>. Óleos passam por uma série de fases de cristalização durante resfriamento, o que faz dessa multiplicidade de modos de cristalização (polimorfismo) uma característica importante, pois tem grande impacto nas propriedades texturais e funcionais de óleos e produtos derivados<sup>29</sup>. Além disso, a cristalização também é importante durante o fracionamento do óleo para se obter gorduras funcionais. Nesse caso, realizando o controle da cristalização, é possível otimizar o processo de separação. O óleo de palma, por exemplo, é fracionado utilizando esse processo<sup>28</sup>. Os processos de modificação do óleo, como hidrogenação,

interesterificação e fracionamento, além de aumentarem a utilidade dos óleos comestíveis, aumentam sua intercambialidade, o que tem grande importância econômica <sup>30</sup>.

## **2.2 Óleo de Palma**

Na atualidade, entre as culturas de óleos vegetais, o óleo de palma se mostra como uma das mais importantes <sup>31</sup> devido às suas características texturais, versatilidade de uso, e alto rendimento de óleo por área plantada, quando comparada a outras culturas. O óleo de palma refinado, popularmente conhecido como dendê, e suas frações são amplamente utilizados em uma diversidade de produtos alimentícios, como margarinas, gorduras, óleos de cozinha, pastas, doces e gorduras de panificação <sup>32,33</sup> (Figura 2-3). Segundo dados da USDA <sup>34</sup>, o Brasil é o nono produtor mundial de óleo de palma, tendo produzido 550 mil toneladas entre setembro de 2020 e maio de 2021 <sup>34</sup>, enquanto a produção mundial alcançou a marca de 73,379 milhões de toneladas no mesmo período <sup>35</sup>. Indonésia e Malásia são os maiores produtores mundiais do óleo de palma. Hoje, os estados brasileiros com maior produtividade são Pará (82%) e Bahia (16%) <sup>34</sup>.

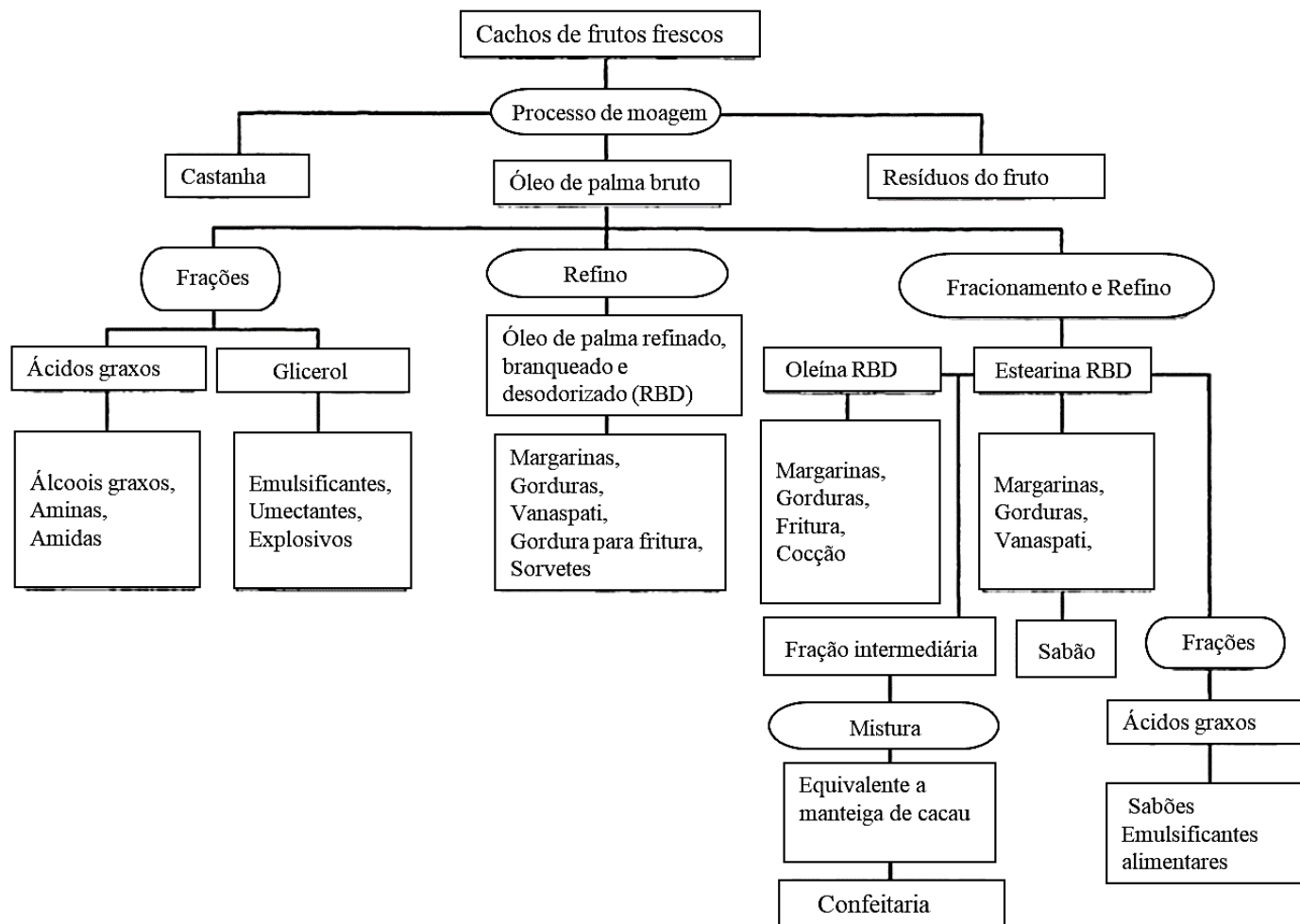


Figura 2-3: Usos para o óleo de palma (Basiron, 2005)

Apesar de ser apenas o nono produtor mundial de óleo de palma, o Brasil tem um grande potencial mundial para crescimento da produção, pois conta com áreas agricultáveis disponíveis sem que seja necessário aumentar o desmatamento <sup>36</sup>. Considerando as áreas remanescentes aptas à cultura de dendê, existem cerca de 30-42 milhões de hectares de áreas não florestais <sup>37</sup>, quantidade suficiente para triplicar a produção, que atualmente é cultivada em aproximadamente 10 milhões de hectares. A cultura do óleo de palma se mostra, portanto, essencial dos pontos de vista econômico e social <sup>38</sup>. Atualmente, o Brasil tem uma das maiores proporções nacionais de produção de dendê certificada pela RSPO (*Roundtable for Sustainable Palm Oil*), que visa a cultura sustentável da palma, reduzindo os impactos negativos ao meio ambiente e às comunidades.

A espécie de palma de óleo mais importante comercialmente é a africana, *Elaeis guineensis*, que é a cultivada majoritariamente no mundo <sup>39</sup>. Na Indonésia e na Malásia, por exemplo, o amplo cultivo se deve ao fato de essa espécie possuir maior produtividade por área plantada <sup>39</sup>. Outra espécie de palma, *Elaeis oleifera*, é típica das Américas Central e do Sul. Apesar de apresentar uma produtividade menor quando comparada à espécie africana, apresenta maior resistência a doenças e pragas, como o amarelamento fatal <sup>38</sup>, além de menor crescimento do tronco em altura, facilitando o manejo e a colheita de cachos <sup>40</sup>. A espécie americana também apresenta um alto teor de carotenoides (acima de 4600 ppm), maior que o da espécie africana (entre 600 e 1000 ppm) <sup>38</sup>.

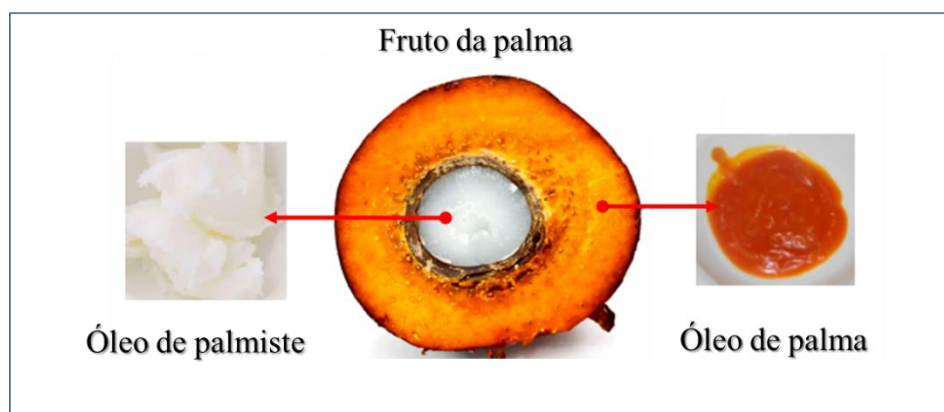
A fim de obter uma espécie de palma de óleo com maior resistência a pragas e com alta produtividade por área plantada, foi desenvolvida uma espécie híbrida interespecífica, obtida pelo cruzamento interespecífico entre as espécies africana (dendezeiro) e americana (caiaué) <sup>40</sup>. O híbrido interespecífico resultante (*Elaeis guineensis* x *Eleais oleifera*) é um óleo de palma com alto teor oleico, que também apresenta composição diferenciada em AGs.

Pela alta produtividade da palma de óleo quando comparada a outras culturas de oleaginosas <sup>41</sup>, ela é uma matéria-prima utilizada em diversos segmentos, como indústria de alimentos, farmacêutica e de combustíveis. Em virtude da alta concentração de AGIs, como o ácido oleico, responsável pela estabilidade oxidativa, alimentos processados com óleo de palma têm vida útil mais longa do que alimentos processados com outros óleos vegetais <sup>42</sup>. Devido a seu ponto de fumaça relativamente alto <sup>31</sup>, que o torna ideal para processos de fritura por imersão, e a sua textura semissólida em temperatura ambiente, o óleo de palma não requer hidrogenação para ser usado como ingrediente alimentar, e se mostra uma alternativa para gorduras parcialmente hidrogenadas no abastecimento alimentar e redução na ingestão de gordura *trans*, mantendo as características sensoriais dos alimentos <sup>43</sup>. Recentemente, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) estabeleceu a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) N° 332, de 23 de dezembro de 2019, que trata do uso de gorduras *trans* industriais em alimentos e determina que, a partir de 2021, o teor de gordura *trans* nos alimentos não pode ultrapassar 2 g/100 g. A mesma resolução determina que, a partir de 2023, todos os alimentos comercializados no país deverão ser completamente isentos de gorduras *trans*.

A textura diferenciada do óleo de palma se deve à sua composição balanceada de AGIs e AGSs. A espécie de palma africana, por exemplo, apresenta cerca de 49% de sua composição em AGSs e 51% de AGIs <sup>14</sup>. De modo geral, o que diferencia óleos vegetais e gorduras são suas propriedades físicas em temperatura ambiente. Gorduras, produtos sólidos em temperatura ambiente, apresentam uma maior concentração de AGSs. Os óleos vegetais, produtos líquidos em temperatura ambiente, apresentam alto teor de AGIs <sup>44</sup>.

Do fruto da palma de óleo são extraídos dois tipos de óleo (Figura 2-4). O óleo de palmiste, extraído da castanha do fruto, é um óleo de cor branca rico em ácido láurico <sup>44</sup>. Do mesocarpo do fruto, é obtido o azeite de dendê, ou óleo de palma, um óleo com uma

característica coloração alaranjada e uma composição de AGs variável conforme a espécie de palma. O óleo de palma é usado principalmente para alimentos, enquanto o óleo de palmiste vai principalmente para a indústria oleoquímica para produção de sabonetes, detergentes e produtos de higiene pessoal <sup>45</sup>.



*Figura 2-4: Fruto da palma e óleos extraídos do mesocarpo (óleo de palma) e da castanha (palmiste)*

A composição química também afeta as propriedades térmicas do óleo. Os TAGs do óleo de palma consistem em uma combinação de ácidos graxos com diferentes comprimentos de cadeia e grau de insaturação, influenciando na sua temperatura de fusão. O teor de gordura sólida presente no óleo em qualquer temperatura pode ser alterado através do processo de cristalização, que ocorre como consequência de sua composição química, pois diferentes estruturas moleculares de TAGs, com suas características químicas distintas, manifestam seus estados físicos em diferentes temperaturas, conferindo ao óleo certo comportamento de cristalização e fusão <sup>46</sup>. A partir dessas características, o óleo de palma pode ser separado sob condições térmicas controladas em dois componentes: uma fração sólida (estearina) e uma fração líquida (oleína) <sup>46</sup>. A cristalização do óleo sob resfriamento controlado seguida pela separação produzirá uma oleína de baixo ponto de fusão e estearina fase sólida de alto ponto de fusão <sup>45</sup>.



Assim como descrito para os óleos vegetais, os componentes majoritários do óleo de palma são os TAGs. O procedimento para obtenção de óleos brutos resulta na incorporação de componentes menores, como AGLs, acilgliceróis parciais, fosfatídeos, esteróis, tocoferóis, tocotrienóis, pigmentos, vitaminas, esteróis glicosídeos, vestígios de pesticidas, metais pesados, entre outros <sup>47</sup>. Contudo, nem todos esses componentes minoritários são indesejáveis, pois tocoferóis e tocotrienóis (tocóis) e carotenoides, por exemplo, desempenham a importante função de proteger o óleo contra a oxidação e possuem atividade da vitamina E e pró-vitamina A, respectivamente <sup>13</sup>.

Dentre os compostos minoritários presentes no óleo de palma, os carotenoides são os responsáveis pela cor característica do óleo, compostos antioxidantes e com atividade pró-vitamina A <sup>14</sup>. Cerca de 90% dos carotenos presentes no óleo são  $\alpha$ - e  $\beta$ -carotenos <sup>48</sup>. Eles são removidos do óleo durante o refino e, conseqüentemente, parte da cor é removida por adsorção dos carotenos na etapa de branqueamento por materiais chamados terras, ou argilas, adsorventes, enquanto o restante é removido na etapa de desodorização <sup>39,47</sup>. A remoção desses compostos do óleo é importante para se obter um óleo claro, permitindo, assim, maior gama de uso em produtos alimentícios e farmacêuticos <sup>14</sup>.

O refino de óleos vegetais tem por fim remover todas as impurezas do óleo, como odor, sabor e cor indesejáveis, porém acaba removendo também os componentes benéficos, como vitaminas, pró-vitaminas e antioxidantes <sup>47</sup>, deixando o óleo nutricionalmente mais pobre. O óleo de palma, assim como a maioria dos óleos comestíveis, pode ser refinado tanto por via física quanto química, que diferem basicamente na maneira como os AGLs são removidos <sup>46</sup>. No refino químico (alcalino), o óleo de palma degomado é tratado com álcali (principalmente hidróxido de sódio) antes do branqueamento, na etapa de neutralização, enquanto no refino físico, o óleo de

palma passa por três etapas – degomagem, branqueamento e desodorização/ sendo que os AGLs são removidos na etapa de desodorização <sup>47</sup>.

No refino químico de óleo de palma, o branqueamento é integrado em uma etapa chamada de pré-tratamento a seco, que visa o branqueamento simultâneo e a remoção de fosfolipídeos com formação mínima de produtos de oxidação <sup>49</sup>. Mas o refino físico tornou-se a rota preferencial para o refino do óleo de palma devido à sua relação custo-benefício, eficiência e tratamento simples de efluentes <sup>45</sup>. Pelo fato de o óleo de palma ter um alto teor de AGLs, o uso de substâncias cáusticas para remover os AGLs acarretaria em grandes quantidades de sabão e perda de óleo neutro <sup>50 39</sup>. Ambos os processos são capazes de produzir óleo de palma refinado, branqueado e desodorizado de qualidade e estabilidade desejáveis para fins comestíveis. As etapas de refino de óleos vegetais serão apresentadas com maiores detalhes ao final deste capítulo.

### **2.2.1 Compostos minoritários**

Os principais componentes minoritários do óleo de palma são os carotenóides, tocoferóis e tocotrienóis (tocóis: tocoferóis + tocotrienóis), os quais possuem atividade nutracêutica e antioxidantes importantes, esta última fundamental para estabilidade oxidativa do óleo <sup>51</sup>. O óleo de palma bruto é uma das fontes vegetais mais ricas em carotenos em termos de equivalente de retinol (pró-vitamina A), apresentando entre 15 a 300 vezes mais equivalentes de retinol do que cenouras, vegetais de folhas verdes e tomates <sup>52</sup>. A concentração desses pigmentos no óleo pode variar entre 500 a 2000 ppm, sendo  $\alpha$ - e  $\beta$ -carotenos os majoritários, responsáveis por aproximadamente 90% desse teor <sup>47</sup>. O  $\beta$ -caroteno atua como um pró-oxidante, promovendo a peroxidação lipídica em alguns sistemas sob alta pressão parcial de oxigênio, porém a alta reatividade dos carotenoides com o oxigênio, principalmente em altas temperaturas, impõe uma grande

limitação ao seu uso como antioxidantes <sup>11</sup>. No entanto, quando tocoferóis estão presentes eles estabilizam espécies radicais formadas a partir da reação de carotenoides com oxigênio, e um efeito antioxidante sinérgico significativo pode ser alcançado <sup>11</sup>, evidenciando a importância da presença desses compostos no óleo.

Tendo em vista a importância desses compostos, estudos buscam desenvolver processos para recuperá-los do óleo, como saponificação, extração de solvente, transesterificação seguida por destilação molecular, purificação adicional por adsorção usando resinas sintéticas, entre outros <sup>53</sup>.

### *Carotenóides*

Carotenoides são uma importante classe de pigmentos naturais. Para a maior parte dos animais, a fonte desses pigmentos são os alimentos <sup>53,54</sup>. A presença de carotenoides na dieta é fundamental, pois está relacionada à prevenção de diferentes tipos de doença, como doenças cardiovasculares, diferentes tipos de câncer, doenças da mácula ocular, além de importante papel antioxidante <sup>55</sup>. Os carotenoides alimentares são estruturas tetraterpenoides que geralmente possuem 40 carbonos em sua cadeia, com características estruturais variadas, formadas por oito unidades isoprenoides ligadas de forma que a molécula seja linear e simétrica, com a ordem invertida no centro <sup>56</sup>, que pode ser ciclizada em uma ou em ambas as extremidades <sup>57</sup>. Os carotenoides são geralmente divididos em duas categorias <sup>58,59</sup> (Figura 2-5):

- **carotenos**, compostos inteiramente por carbono e hidrogênio, como  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$  caroteno e licopeno; e
- **xantofilas**, constituídas por carbono, hidrogênio e oxigênio, como luteína e zeaxantina.

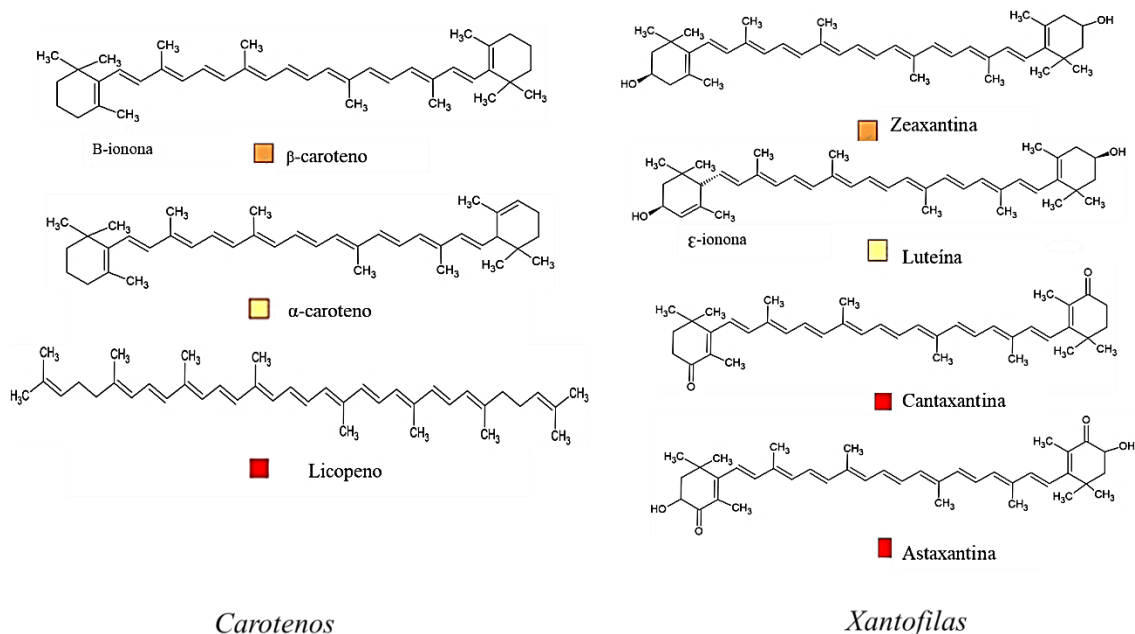


Figura 2-5: Estrutura de alguns carotenoides representação de suas cores (Adaptado de <http://www.chm.bris.ac.uk/motm/carotenoids/carotenoids.htm> Acessado em 15/06/2021)

Carotenoides são pigmentos lipossolúveis com mais de 700 estruturas conhecidas, cuja coloração varia do vermelho ao amarelo, dependendo da quantidade de duplas ligações conjugadas (DLG) presentes na molécula, as quais podem variar entre 3 e 13<sup>60,61</sup>. A grande quantidade de DLG cria um ambiente rico em elétrons, que atuam como o cromóforo, absorvendo a luz e sendo responsável pelas cores dos carotenos<sup>57</sup>. Além disso, as DLGs conferem a esses compostos alta reatividade, tornando-os facilmente isomerizados e oxidados<sup>56</sup>, tornando-os antioxidantes eficientes<sup>62</sup>. A propriedade de cromóforo é responsável pelo fato de os carotenoides absorverem a luz fortemente e exibirem intensas faixas de absorção na região do ultravioleta e do visível.

A propriedade de cromóforo é responsável pelo fato de os carotenoides absorverem a luz fortemente e exibirem intensas faixas de absorção na região do ultravioleta e do visível. Quando se deseja uma análise mais precisa, ou seja, quantificar e identificar os diferentes carotenoides presentes em uma amostra, as técnicas cromatográficas ganham destaque. Por serem compostos não voláteis e termolábeis, a cromatografia líquida de alta

eficiência (HPLC) é a técnica ideal para quantificação e identificação de carotenoides, utilizando detectores ultravioleta-visível com arranjo de diodos (UV-VIS-DAD) ou um espectrômetro de massas <sup>11</sup>. A separação pode ser obtida por cromatografia em fase reversa utilizando colunas C18 ou C30 e mistura de solventes, como metanol, acetonitrila, éter metil-terc-butílico (MTBE) e tetrahidrofurano (THF) <sup>11,14,63</sup>.

Por cromatografia líquida, Ribeiro et al. <sup>14</sup> identificaram os isômeros  $\alpha$ - e  $\beta$ -carotenos nos óleos de palma africano e no híbrido brutos, e também nestes óleos após branqueamento com adsorventes neutro e ácido. Os resultados para a análise de UHPLC-MS/MS, em coluna C18, mostraram que os isômeros  $\alpha$  e  $\beta$  correspondem a mais de 90% dos carotenos totais presentes no óleo. Como esperado, após tratamento com os adsorventes, a concentração de carotenoides foi reduzida. Um comportamento diferente foi observado entre as terras clarificantes na adsorção dos isômeros  $\beta$ - e  $\alpha$ -caroteno. No óleo branqueado com a terra neutra (terra que não passou por processo de ativação com ácidos fortes, para obtenção de melhor desempenho na adsorção), houve grande redução do isômero  $\beta$ -, porém quase não houve redução na concentração do isômero  $\alpha$ . No branqueamento com a terra ácida (terra submetida a tratamento com ácido), foi observada redução na concentração dos dois isômeros, porém o isômero  $\beta$ - teve redução mais acentuada. Esses resultados podem ser evidência de que se tem adsorção seletiva entre os isômeros  $\alpha$  e  $\beta$ , sendo o último adsorvido preferencialmente. Nessas condições, por exemplo, o  $\beta$ -caroteno produz íons  $[M + H]^+$  intensos em  $m/z$  537 sem fragmentação <sup>64</sup>.

Os carotenos possuem excelente absorvância na faixa de 400–500 nm. Assim sendo, a propriedades de absorção de luz fornecem meios para identificação e caracterização de carotenoides por UV-VIS <sup>65</sup>. Um método muito utilizado para quantificar carotenoides totais é o proposto por PORIM <sup>66</sup>. Uma limitação dessa técnica que utiliza UV-VIS, em relação a técnicas de cromatografia, é que não permite diferenciar entre os

diferentes isômeros de carotenoides e as espécies modificadas que surgem devido a processos como a ciclização, hidrogenação, desidrogenação, migração de ligação dupla, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, isomerização, introdução de funções de oxigênio ou combinações desses processos <sup>57</sup> (Figura 2-6).

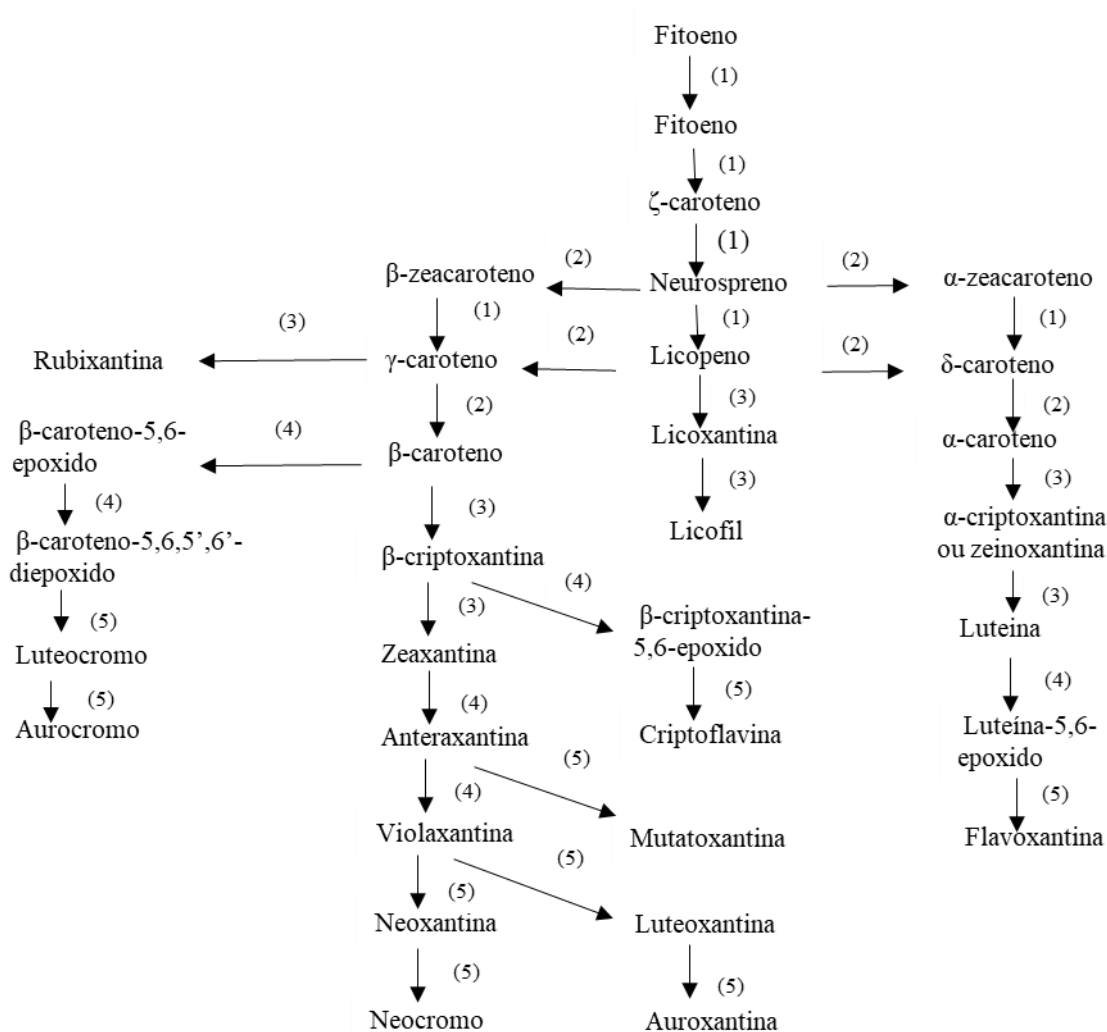


Figura 2-6: Estágios de biossíntese e possíveis transformações em carotenoides. Reações: (1) dessaturação, (2) ciclização, (3) hidroxilação, (4) epoxidação (5) oxidação

Por apresentarem estrutura com elevado teor de insaturações, os carotenoides podem sofrer alterações, como a isomerização *cis-trans* pela exposição a luz e temperaturas elevadas ou pela atividade catalítica das terras adsorventes <sup>62,67</sup>. A configuração *trans* nos carotenoides é mais usual na natureza. Evidências indicam que o adsorvente com ativação ácida utilizado durante o branqueamento do óleo de palma catalisa a isomerização do  $\beta$ -caroteno, interferindo, portanto, na cor do óleo de palma totalmente refinado <sup>39,49</sup>. A oxidação de carotenoides é frequentemente acompanhada pela isomerização *cis/trans*, e ambos os isômeros estão sujeitos à oxidação, levando a alteração de cor e comprometimento das atividades biológicas da pró-vitamina A <sup>67,68</sup>. Os estágios iniciais de oxidação envolvem epoxidação e clivagem em apocarotenais, e as fragmentações seguintes formam compostos com baixas massas moleculares, semelhantes aos produzidos na oxidação de AGs <sup>67</sup>. Outro importante efeito da geração de produtos de oxidação de carotenoides é que alguns deles, como os produtos de oxidação do  $\beta$ -carotenos, passam a ter atividade pró-oxidante no óleo <sup>69</sup>.

### *Tocóis*

Tocóis são uma classe de compostos antioxidantes e que possuem atividade de vitamina E, compreendidas principalmente pelos tocoferóis e tocotrienóis [24] [68]. São encontrados nos tecidos das plantas, especialmente nozes, óleos vegetais, frutas e vegetais <sup>70</sup>.

Os tocoferóis consistem em um grupo 6-cromanol e uma cadeia apolar fitila com diferentes formas ( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -) variando no número e localização dos grupos metil. Os tocotrienóis são semelhantes aos tocoferóis correspondentes, porém apresentam insaturações na cadeia lateral nas posições 3', 7' e 11' <sup>70</sup> (Figura 2-7). O óleo de palma bruto é uma fonte rica desses componentes, principalmente os tocotrienóis (principalmente  $\gamma$ ,  $\alpha$

e  $\delta$ -tocotrienóis). O  $\gamma$ -tocoferol e o  $\alpha$ -tocoferol são os principais tocoferóis, com o conteúdo total (tocoferóis e tocotrienóis) variando de 600 a 1500 ppm <sup>7</sup>.

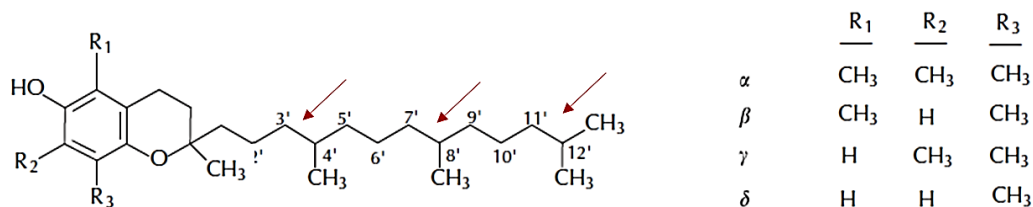


Figura 2-7: Estruturas de tocoferóis. As estruturas de tocotrienóis são idênticas aos tocoferóis correspondentes, exceto pela presença de ligações duplas nas posições 3', 7' e 11' indicado pelas setas (Adaptada de Kiokias, Varzakas, Oreopoulou, 2008).

Almeida et al. (2021) <sup>16</sup>, quantificaram tocois no óleo de palma bruto das espécies africana (APO) e com alto teor de oleico (HOPO) por cromatografia líquida de ultra alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodo (UHPLC-PDA) e coluna C18, 1,7 $\mu$ m, 2,1  $\times$  100mm. O teor de  $\alpha$ -tocoferóis foi de 136,4 e 167,5 mg/kg para HOPO e APO respectivamente. Os  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferóis não foram detectados em ambos os óleos. HOPO e APO apresentaram todas as classes de tocotrienóis: 128,6 e 117,1 mg/kg de  $\alpha$ -tocotrienol; 603,5 e 413,6 mg/kg de  $\beta$ -/ $\delta$ -tocotrienóis; e 15,2 e 29,8 mg/kg de  $\delta$ -tocotrienol. A relação tocoferol/tocotrienol de HOPO e APO foi de 18% e 29%, respectivamente. Um maior teor de tocotrienóis é interessante por se tratarem de compostos com propriedades neuroprotetoras, anticancerígenas e redutoras do colesterol, atividade muitas vezes não atribuídas aos tocoferóis <sup>71</sup>.

### 2.3 Oxidação de Lipídios

Os lipídios estão sujeitos a um processo de deterioração, a oxidação, que pode ocorrer de forma espontânea ou estimulada por condições externas. Os mecanismos de reação e a taxa de oxidação de lipídios dependem de muitos fatores, como composição de



AGs, presença de pró-oxidantes e antioxidantes, tipo de lipídio (triacilgliceróis, fosfolipídios e outros) e condições de armazenamento, como, por exemplo, temperatura, luz e disponibilidade de oxigênio <sup>72,73</sup>, além das próprias condições de refino, em que são utilizadas temperaturas elevadas e terras de branqueamento ácidas.

A estabilidade oxidativa de óleos é a resistência à oxidação durante o processamento e armazenamento, configurando um importante indicador para determinar a qualidade e a vida útil do óleo, visto que compostos de sabor desagradável e de baixo peso molecular são produzidos durante a oxidação. Fatores como AGLs, mono- e diacilgliceróis, metais, clorofilas, carotenoides, tocoferóis, fosfolipídios, temperatura, luz, oxigênio, métodos de processamento de óleo e composição de AGs afetam a estabilidade oxidativa do óleo comestível. Para minimizar a oxidação do óleo comestível durante o processamento e armazenamento, é recomendado diminuir a temperatura, excluir luz e oxigênio, remover metais e compostos oxidados e usar concentrações adequadas de antioxidantes, como tocoferóis <sup>74</sup>.

A oxidação de lipídios é um conjunto altamente complexo de reações de radicais livres que ocorre entre AGs e oxigênio, que resultam na degradação oxidativa dos lipídios que causam sabores desagradáveis, conhecidos como ranço <sup>72</sup>. A oxidação também gera produtos tóxicos e polímeros oxidados <sup>74</sup>, fatores que comprometem a palatabilidade, qualidade e segurança nutricional do óleo <sup>22,32</sup>. A oxidação do óleo também destrói os AGs essenciais <sup>74</sup>. Os produtos intermediários da oxidação lipídica (radicais livres) e os produtos finais oxigenados de baixo peso molecular (constituintes oxigenados, como álcoois, aldeídos, ácidos graxos livres e cetonas) <sup>75</sup> podem interagir com outros constituintes dos alimentos, como proteínas, açúcares, pigmentos e vitaminas, e modificar negativamente suas propriedades <sup>72</sup>.

A dupla ligação presente nos AGs é o sítio reativo das reações de oxidação. Na verdade, a cadeia alquílica dos AGs está suscetível à oxidação tanto no carbono das ligações duplas quanto nos carbonos adjacentes <sup>22</sup>. quantidade de AGI e seu grau de insaturação são os fatores mais importantes que afetam a oxidação, enquanto fatores como a posição dos AGI nos TAGs e a presença de antioxidantes e pró-oxidantes controlam a tendência à oxidação <sup>32</sup>. As taxas de oxidação das séries de AGs principais são as seguintes: ácido esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (18:2) e linolênico (C18:3), na proporção de 1: 100: 1200: 2500, o que evidencia a influência do grau de insaturação na oxidação <sup>13</sup>.

### 2.3.1 Mecanismos de oxidação

A temperatura também influencia na oxidação. A indução térmica pode levar à oxidação de lipídios saturados e insaturados <sup>8</sup>. A velocidade de oxidação de lipídios está ligada a vários fatores, como concentração de oxigênio no sistema, temperatura que causa degradação e/ou volatilização de compostos antioxidantes e desnaturação de enzimas antioxidantes, e área superficial, que pode levar a um maior contato com oxigênio ou compostos pró-oxidantes. Tanto a autooxidação quanto a fotoxidação produzem hidroperóxidos alílicos a partir de centros insaturados, conforme Equação 1 <sup>22</sup>:

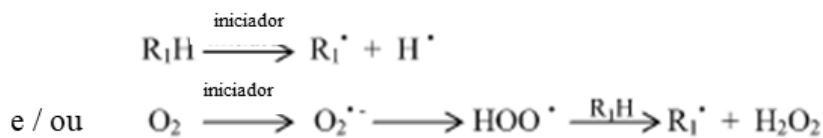


Durante o processo, a posição e a geometria da ligação dupla podem mudar. As misturas de hidroperóxidos produzidas por autooxidação e fotoxidação não são as mesmas, indicando que mecanismos diferentes estão envolvidos <sup>22</sup>. <sup>22</sup>. A oxidação do radical livre pode ser promovida ou inibida <sup>22</sup>.

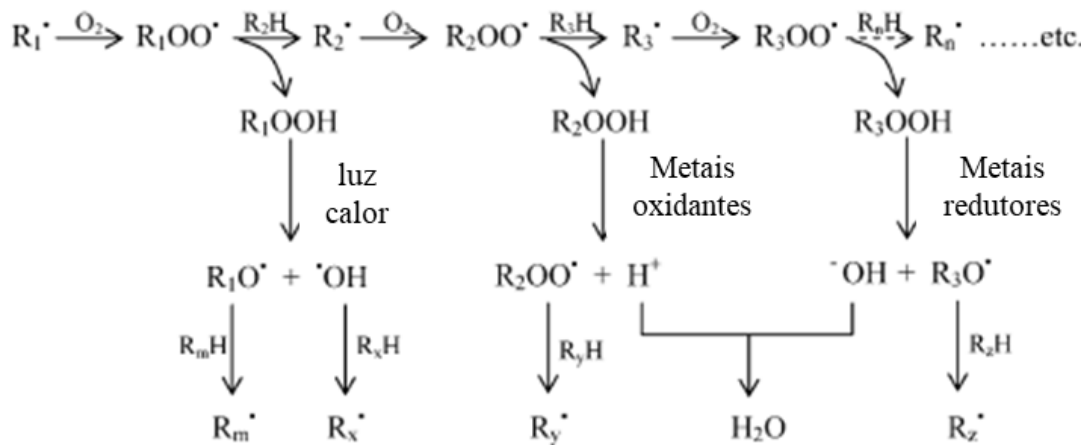
## Auto-oxidação

A autoxidação é o processo natural e é definida como a reação espontânea dos lipídios com o oxigênio atmosférico por meio de uma reação em cadeia de radicais livres, podendo ser catalisado em temperaturas mais elevadas <sup>13</sup>. As moléculas lipídicas insaturadas, na presença de iniciadores como calor, luz / radiação ionizante e íons metálicos, perdem um átomo de hidrogênio e produzem radicais livres <sup>13</sup>. O processo de autoxidação ocorre em três etapas: iniciação, propagação e terminação, conforme será descrito a seguir <sup>22,68</sup> (Figura 2-8)..

### Iniciação:



### Propagação:



### Terminação:

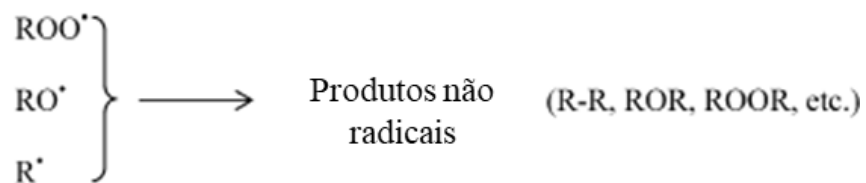


Figura 2-8: Etapas de oxidação dos óleos (Fonte Shahidi 2010)

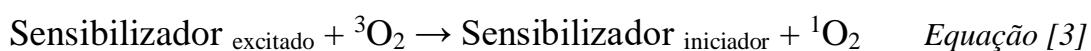
- **Iniciação:** tem início com a abstração de um hidrogênio do AG, formando um radical alquil, que é estabilizado pela deslocalização da dupla ligação, e, no caso de ácidos graxos poliinsaturados, a partir da formação de duplas ligações conjugadas, em configurações *cis* ou *trans*. O iniciador é um radical livre, provavelmente produzido pela decomposição de hidroperóxidos presentes ou produzidos por fotoxidação. A autoxidação é caracterizada por um período de indução durante o qual a concentração de radicais livres aumenta até que as etapas de propagação autocatalítica se tornem dominantes.
- **Propagação:** é a etapa em que ocorre a adição de oxigênio ao radical alquil <sup>68</sup>, com subsequente produção de um radical peroxil. Os radicais livres formados a partir do oxigênio triplete têm pouca energia, não causando a abstração direta de hidrogênio. Essa etapa é muito mais rápida do que a abstração subsequente de outro hidrogênio alílico pelo radical peroxil, produzindo um hidroperóxido alílico e um novo radical alílico, que continua na reação em cadeia. A remoção do hidrogênio é a etapa determinante, portanto é seletiva para o hidrogênio mais facilmente abstraído. A reação em cadeia é encerrada por reações que removem radicais que, de outra forma, produziriam mais radicais alílicos por abstração de hidrogênio.
- **Terminação:** nessa etapa, tem-se a formação de espécies não radicais, reações que removem radicais que, de outra forma, produziriam mais radicais alílicos por abstração de hidrogênio.

A velocidade de autoxidação depende do número de duplas ligações presentes na molécula <sup>76</sup>. Na maior parte das matrizes oleaginosas, as insaturações dos AGs são separadas por um grupo metileno, como é o caso do ácido linolênico <sup>22</sup>. Na fase de iniciação da oxidação, a abstração do hidrogênio ocorre preferencialmente no carbono entre as duas duplas ligações (grupo metileno), e o elétron livre fica estabilizado nas duplas ligações. A maior densidade de elétrons fica situada no carbono central, enquanto os carbonos periféricos possuem a menor densidade. Dessa forma, durante a iniciação, é observada a

formação das duplas conjugadas <sup>77</sup>. Devido à menor densidade eletrônica, a adição do oxigênio na próxima etapa da oxidação, que resulta na formação dos peróxidos, ocorre preferencialmente nos carbonos periféricos.

### *Fotoxidação*

Esse processo oxidativo se dá pela exposição do AG à luz em presença de oxigênio e compostos fotossensores <sup>8</sup>. A radiação ultravioleta decompõe os hidroperóxidos, peróxidos e carbonil e outros compostos contendo oxigênio existentes, produzindo radicais que iniciam a autoxidação <sup>22</sup>. A fotoxidação por comprimento de onda mais longo próximo ao UV ou à luz visível requer um sensibilizador, que pode ser pigmentos naturalmente presentes, como clorofila. Estes são excitados pela luz ao estado tripleto, promovendo diferentes mecanismos de oxidação <sup>22</sup>. A oxidação fotossensibilizada é uma reação direta do oxigênio singleto ativado pela luz com ácidos graxos insaturados <sup>10</sup>. Ocorre devido à presença de moléculas que podem absorver a luz visível ou próximo ao ultravioleta para se tornarem eletronicamente excitadas (sensibilizadores), Equação 2, <sup>78</sup>. O sensibilizador pode ser de dois tipos: tipo I serve como iniciador fotoquimicamente ativado de radical livre; e os sensibilizadores tipo II no estado tripleto interagem com o oxigênio por transferência de energia para formar o oxigênio singleto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) que reage posteriormente com o lipídio insaturado, Equação 3, <sup>78</sup>. Em condições de oxidação fotossensibilizada, a reação de lipídios insaturados com oxigênio singleto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) leva à rápida formação de hidroperóxidos, Equação 4, <sup>78</sup>



### 2.3.2 Determinação do grau de oxidação do óleo

Conhecer o grau de oxidação do óleo é uma importante ferramenta de controle de qualidade, por ser esta a principal causa de deterioração de óleos. A oxidação ocorre durante a fabricação, o transporte, o armazenamento, o cozimento e a fritura de óleos comestíveis e alimentos que os contêm <sup>79</sup>. A literatura fornece uma diversidade de métodos que possibilitam determinar a formação de produtos de oxidação. É possível contar com uma variedade de testes físico-químicos, incluindo análises instrumentais, para medir parâmetros de oxidação lipídica, com destaque para análises cromatográficas, onde é possível a separação das carbonilas provenientes da oxidação de lipídios de compostos interferentes <sup>68</sup>, titulação iodométrica, espectrometria UV-Vis para dienos e trienos conjugados, determinação de peróxidos e valor de p-anisidina (p-AnV) e Método de Rancimat e *Oxidative Stability Instrument* (OSI) para índice de estabilidade de óleo. Outras técnicas baseadas em princípios diferentes, como calorimetria diferencial de varredura (DSC) e ressonância magnética nuclear (RMN), também já foram utilizadas para medir a oxidação lipídica.

Alguns desses métodos podem ser utilizados em conjunto, como o índice de peróxido e valor de p-anisidina. Por esses métodos, são determinados os produtos de oxidação primário e secundário, respectivamente, sendo a oxidação total determinada pelo cálculo do TOTOX ( $TOTOX = 2 \text{ valor de peróxido} + \text{valor de p-anisidina}$ ) <sup>81</sup>. A grande variedade de métodos de análise de grau de oxidação do óleo se deve ao grau de complexidade e produtos formados. Os compostos formados durante a oxidação de lipídios podem variar com diferentes óleos (diferentes composições de AGs), antioxidantes (inerentes e/ou adicionados), temperaturas de oxidação e conteúdo de água, uma vez que esses fatores podem alterar os mecanismos e rotas da oxidação reações <sup>79</sup>.

Alguns dos compostos formados pela oxidação dos lipídios permitem mensurar o grau de oxidação. Após a abstração do hidrogênio e a consequente formação de hidroperóxidos, tem-se uma rápida formação de duplas ligações conjugadas nos AGPIs, formando compostos como dienos e trienos conjugados <sup>68</sup> (Figura 2-9) Alguns dos compostos formados durante a oxidação dos lipídios permitem mensurar o grau de oxidação. Após a abstração do hidrogênio e a consequente formação de hidroperóxidos, tem-se uma rápida formação de duplas ligações conjugadas nos AGPIs, formando compostos como dienos e trienos conjugados <sup>81</sup>. A formação desses produtos é potencializada pela ação de temperaturas elevadas.

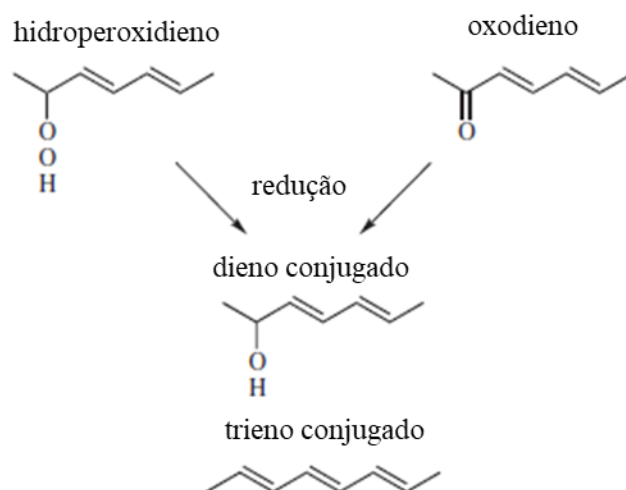


Figura 2-9: Formação de dienos e trienos conjugados

Além dos AGs, os carotenoides também estão sujeitos às reações de oxidação, formando compostos contendo grupos epóxidos, cetonas e aldeídos (epoxicarotenos, apocarotenonas e apocarotenais) <sup>62,82</sup>. A degradação desses compostos, ou seja, sua oxidação secundária, produz uma série de compostos de baixo peso molecular, incluindo acetona, metilheptenona, aldeído levulínico e, provavelmente, glioxal <sup>83</sup> (Figura 2-10).

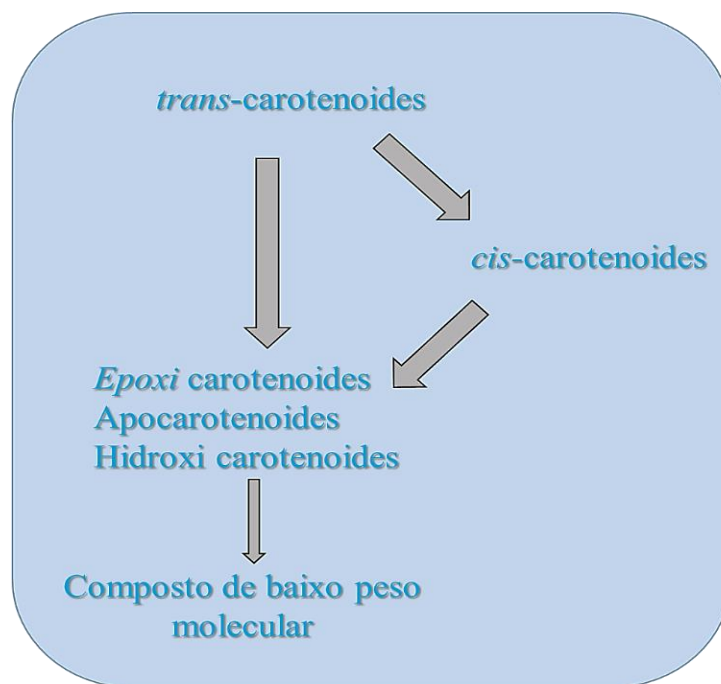


Figura 2-10: Esquema de decomposição/isomerização de carotenoides (adaptado de Rodriguez-Amaya e Kimura, 2004)

A cadeia de polieno dos carotenoides é a base para o comportamento dos carotenoides tanto como antioxidantes como, em determinadas situações, pró-oxidantes <sup>65</sup>. Diversos estudos mostram que os produtos de degradação térmica do  $\beta$ -caroteno (epóxidos), provocada pela exposição às espécies reativas de oxigênio, agem como pró-oxidantes <sup>8485</sup>. Os efeitos pró-oxidantes dos carotenoides podem ser causados pela sua autoxidação, especialmente em alta pressão parcial de  $O_2$  <sup>85</sup>. Essas espécies podem participar de reações de peroxidação lipídica, e, portanto, qualquer alteração na concentração do carotenoide ou na pressão de  $O_2$  terá influência na formação de radicais peroxil carotenoide ou autoxidação carotenoide <sup>85</sup>. No processamento do óleo, essa oxidação tem implicações como coloração escura, devido à dificuldade de remover os produtos da oxidação dos carotenos durante as etapas tradicionais <sup>86</sup>.

Diferente dos carotenos, os tocóis não são degradados pelas altas temperaturas utilizadas no processo de desodorização, são removidos por volatilização. Damanik e Murkovi (2018) <sup>87</sup>, estudaram o perfil cinético da degradação de compostos carbonílicos



do óleo de palma bruto e óleo de palma refinado durante 10 horas de oxidação em equipamento Rancimat a 120 °C. Concluíram que ambos os óleos ainda são estáveis pelo tempo de duração do experimento. Foi observado que a concentração do  $\beta$ -caroteno no óleo de palma bruto oxidado diminuiu de 2,34 mg/g para 0,33 mg/g em 7,5 horas de oxidação, e não sendo mais detectado após esse período. Além disso, o  $\beta$ -caroteno não foi detectado no óleo de palma refinado. A vitamina E no óleo de palma refinado e bruto,  $\delta$ -tocotrienol e  $\gamma$ -tocotrienol, tem uma vida útil longa em comparação ao  $\alpha$ -tocoferol e  $\gamma$ -tocoferol. Para  $\alpha$ -tocoferol a concentração inicial foi de 39,96 mg/g ainda permaneceu no óleo até 4 horas de teste, sendo a concentração no início 6,18 mg/g. O  $\gamma$ -tocoferol permaneceu até 3 horas com 0,22 mg/g em comparação com 0,94 mg/g iniciais. O  $\gamma$ -tocotrienol esteve presente até 11 horas com 0,18 mg/g sendo a concentração inicial de 9,45 mg/g. O  $\delta$ -tocotrienol, cuja concentração inicial determinada foi de 2,10 mg/g, foi degradado lentamente e pode ser encontrado mesmo após 15 horas de oxidação com 0,035 mg/g remanescente no óleo de palma bruto oxidado. No óleo de palma refinado, o  $\delta$ -tocotrienol pode ser determinado até 11 horas de oxidação com 0,49 mg/g.

## 2.4 Refino de Óleos Vegetais

O óleo vegetal é obtido de partes de plantas oleaginosas, como semente, fruto e castanhas<sup>88</sup>. A extração é feita de diferentes maneiras, como prensagem, extração com solventes e cozimento. Óleos como palma e oliva são obtidos por prensagem do endosperma do fruto<sup>89</sup>. Durante a extração do óleo bruto, diferentes impurezas são extraídas junto com óleo<sup>17, 20</sup>. Além disso, o óleo possui compostos minoritários que podem conferir características limitantes a seu uso comestível e industrial, como cheiro, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, AGLs, cor gerada pela presença de pigmentos, materiais oxidados, componentes de sabor, metais-traço, compostos de enxofre e poluentes<sup>29,30,89</sup>.

Para eliminar esses compostos e conferir uma maior diversidade de usos industriais, conferindo também palatabilidade, o óleo passa por um processo de refino <sup>30</sup>. Óleos vegetais estão comercialmente disponíveis como totalmente refinados, parcialmente refinados, virgens ou prensados a frio, dependendo das etapas de processamento envolvidas em sua produção <sup>90</sup>. O refino do óleo deve ser realizado de forma a eliminar os compostos indesejáveis, minimizar a perda de óleo e maximizar a disponibilidade de constituintes benéficos <sup>91</sup>, Tabela 2-2. A depender de sua composição e do modo de extração, o óleo pode ser submetido também a refino químico ou físico. Para óleos vegetais contendo menor teor insaturados, com baixo teor de fosfolipídios e alto níveis de AGLs, o refino físico é mencionado como método mais adequado, sendo, portanto o mais indicado para refinar o óleo de palma <sup>50</sup>.

*Tabela 2-2: Composição geral em componentes desejáveis e indesejáveis de óleos comestíveis e seu efeito geral na qualidade do óleo (Vaisali et al. (2015))*

Tipo de componentes em óleo	Característica	Quantidade		Efeito na qualidade do óleo
		Bruto	Refinado	
Acilgliceróis	Desejável	90%	> 99%	Melhorar a estabilidade oxidativa
Tocoferóis, esqualenos, esteróis	Desejável	200-800 ppm	50-300 ppm	Melhorar a estabilidade oxidativa
Fosfolipídios	Indesejável	100-500 ppm	<10 ppm	Assentamento no fundo durante o armazenamento
Ácidos graxos livres	Indesejável	5-20%	<1%	Atua como pró-oxidante levando à oxidação de acilgliceróis
Íons metálicos e complexos metálicos	Indesejável	2-15 mg kg <sup>-1</sup>	<1 mg kg <sup>-1</sup>	Prejudicial para o consumo e atua como pró-oxidante
Produtos oxidados	Indesejável	2-6 meq kg <sup>-1</sup>	<1 meq kg <sup>-1</sup>	Ranço e prejudicial
Umidade	Indesejável	1-3%	<1%	Atua como pró-oxidante

As etapas básicas de processamento consistem em extração do óleo bruto, degomagem ou refino alcalino, branqueamento, desodorização e, por fim, armazenamento de óleo <sup>92</sup>. O processamento visa converter o óleo bruto em um produto final mais adequado ao consumo humano.

Os óleos vegetais podem ser refinados por vias químicas ou físicas (Figura 2-11). O processo convencional de refino de óleo bruto, o refino químico, pode ser separado em degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização <sup>46,48,90,91</sup>. O refino físico é baseado na maior volatilidade dos AGLs em comparação com os TAGs, por meio das seguintes etapas: degomagem, branqueamento e desacidificação/desodorização em alta temperatura para a remoção de AGLs <sup>93,50</sup>. A substituição do refino químico por um processo de refino físico é desejável industrialmente por reduzir o consumo de energia e os problemas ambientais, como exemplo, a geração de águas residuais com alto teor de álcali <sup>94</sup>. No refino físico, os fosfolipídios e pigmentos são removidos por adsorventes, e os AGL, por vaporização. Nesse tipo de refino, a sequência de processamento é mais curta do processo e resulta em menor perda de óleo neutro. As etapas do refino, (Figura 2-11), podem ser descritas como:

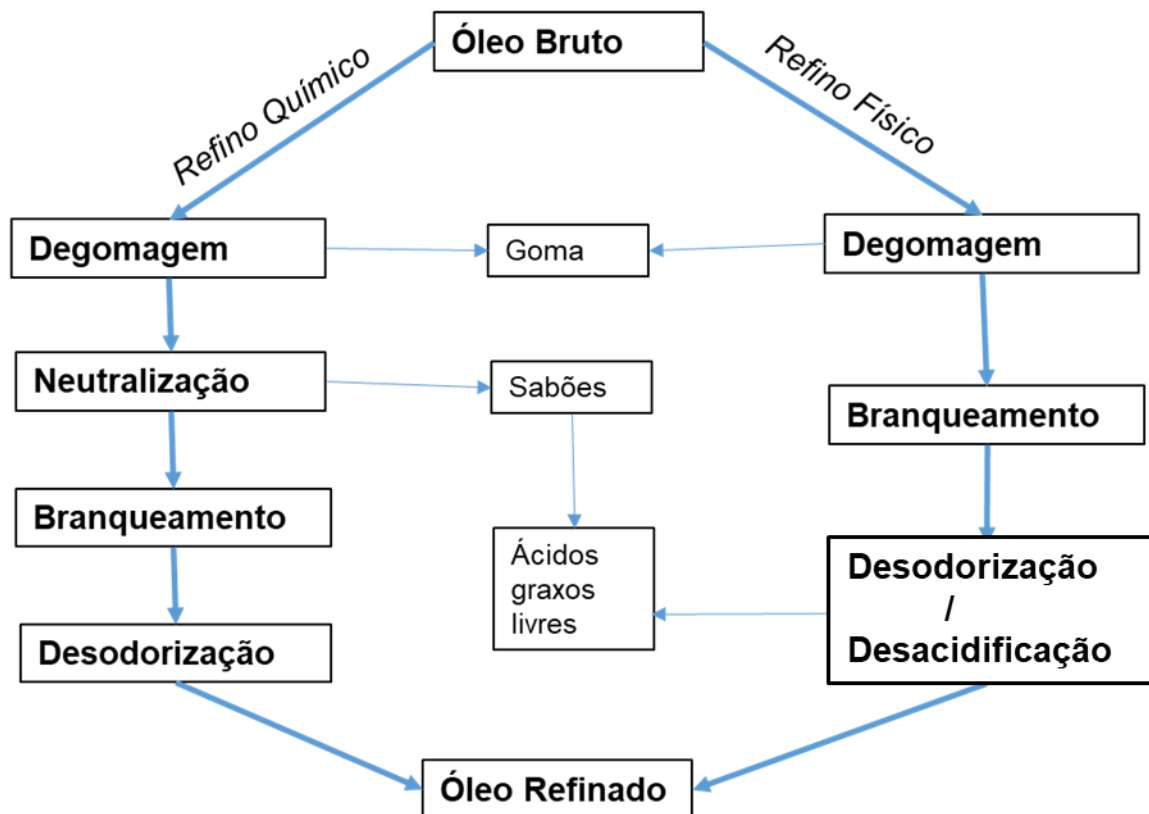


Figura 2-11: Esquema representativo do processo de refino de óleos vegetais - Adaptado de Gibon, (2012)

1. **degomagem**: Etapa tanto do refino químico quanto do físico. Remoção de fosfolipídios. É adicionada água quente para possibilitar a precipitação dos fosfolipídeos hidratáveis. Os fosfolipídios não hidratáveis, ligados principalmente com sais, não são precipitados. Para isso, ácido fosfórico ou ácido cítrico é aplicado para diminuir o conteúdo de fosfolipídios no óleo degomado, pois esses ácidos clivam os íons metálicos dos fosfolipídios <sup>95</sup>.

2. **neutralização**: Etapa do refino químico. Remoção de AGLs através de sua conversão em sabões e posterior decantação. É realizada misturando-se uma solução de hidróxido de sódio com óleo bruto, o que faz com que os AGLs formem sabões que podem ser removidos separando-se a fase oleosa da aquosa que contém os sabões. A quantidade de hidróxido de sódio usado depende da concentração de AGLs presente no óleo bruto, e

pode ser determinada estequiometricamente <sup>68</sup>. Essa etapa ocorre apenas no refino químico. No refino físico, os AGLs são removidos por volatilização da etapa de desodorização/desacidificação.

3. **branqueamento**: Etapa tanto do refino químico quanto do físico. Os produtos de oxidação primária são adsorvidos, e os pigmentos e traços de metais são removidos por adsorventes, como terras de branqueamento ativadas. O processo geralmente leva 15-30 min, a 90-95 °C sob vácuo. O adsorvente e as partículas adsorvidas são filtrados e o sucesso do branqueamento pode ser verificado a olho nu pela diminuição da cor do óleo, ou com a utilização de colorímetros, por exemplo, colorímetro Lovibond <sup>96</sup>.

4. **desodorização**: Etapa tanto do refino químico quanto do físico. O óleo é submetido a um processo de destilação por arraste de vapor sob alto vácuo para remover vestígios de aldeídos, cetonas e outros compostos voláteis, entre outros. No caso do refino físico, essa etapa, chamada desodorização/desacidificação, também tem como objetivo a remoção dos AGLs, sendo este o principal composto a ser removido. O óleo é aquecido a 230-250 °C sob pressão de 1-4 mmHg, condições que propiciam a decomposição dos peróxidos. AGLs e compostos odoríferos são vaporizados. O branqueamento por calor, também conhecido como *heat bleaching*, é realizado mantendo-se o óleo por 15-60 min em alta temperatura para garantir a degradação térmica dos carotenoides. Aproximadamente 98% dos carotenoides são degradados termicamente após 20 minutos de desodorização a 240 °C <sup>97</sup>. Durante o processo de desodorização, também ocorrem algumas reações indesejáveis, como hidrólise lipídica, polimerização e isomerização, o que faz imprescindível o controle da temperatura de desodorização visando um produto final de qualidade <sup>29</sup>.

Quando se pretende propor processos ou materiais com o objetivo de recuperar, ou reduzir a perda dos compostos de valor agregado do óleo durante o refino, deve ser feito

durante a etapa de branqueamento, já que durante a etapa seguinte de refino os compostos de valor agregado, como os carotenos, são destruídos. Sendo possível, durante o branqueamento, recuperar os carotenos com materiais adsorventes não destrutivos, como estudado por Vidoca et al., (2020). Dada a importância desta etapa do refino, é importante conhecer as características, interações e limitações dos métodos tradicionais de branqueamento, como uso de terras de branqueamento, para poder propor novos materiais e metodologias, comercialmente viáveis, de recuperação de compostos de valor agregado e/ou branqueamento.

### **2.4.1 Branqueamento**

O termo branqueamento é usualmente aplicado para um processo de interação adsorptiva entre a superfície do adsorvente e o que se pretende remover, visando a redução de pigmentos, principalmente feofitinas e carotenoides, e gerando um produto final mais brilhante, menos colorido e mais estável <sup>98</sup>. A etapa de branqueamento é realizada após a degomagem e/ou neutralização, e nela são utilizados compostos adsorventes chamados terras de branqueamento ou argilas branqueadoras. Após aquecimento e mistura, as terras de branqueamento, juntamente com os compostos adsorvidos, é removida por filtração <sup>98,99</sup>. Por outro lado, as terras branqueadoras também interagem com outros constituintes do óleo não colorido, como sabões, AGLs, fosfolipídios e peróxidos, e o papel que as terras desempenham nesses processos é tão importante quanto o papel que desempenham na redução da cor <sup>98</sup>.

O branqueamento é uma etapa crítica do processamento do óleo <sup>29</sup>, podendo ser afetada por diferentes fatores: tempo, temperatura, umidade, quantidade e tipo de terra <sup>15</sup>. Além disso, deve-se buscar um processo que minimize a perda de óleo na terra e que, ao

mesmo tempo, reduza a quantidade de terra adsorvente utilizada, reduzindo também, desse modo, a quantidade de resíduo gerado e custos operacionais <sup>100</sup>.

A interação entre o soluto e o adsorvente pode ocorrer através de forças de interação físicas ou químicas <sup>15,101</sup>. No caso da interação física, também chamada de fisissorção, as interações são relativamente fracas, pois acontecem através de interações de van der Waals, interações eletrônicas e/ou eletrostáticas entre regiões ricas ou pobres em elétrons da molécula de adsorbato e locais receptores na superfície do adsorvente <sup>98</sup>. As moléculas ligadas por interação adsorvente/adsorbato podem ser removidas por várias técnicas de extração com solvente. No caso da interação química, também chamada de quimissorção, ocorre a formação de ligações covalentes entre a superfície do adsorvente e o adsorbato <sup>98</sup>.

Dentre as terras adsorventes comumente utilizadas comercialmente, aquelas ativadas acidamente apresentam maior eficiência na adsorção de pigmentos, pois possuem maior área superficial e volumes de poro e microporo <sup>39</sup>. Entretanto, atualmente as terras neutras vem despertando interesse em função do possível efeito catalítico de terras de branqueamento acidamente ativadas na formação de ésteres 3-monocloropropano-diol (3-MCPD), que são compostos potencialmente tóxicos gerados durante o refino do óleo de palma. No entanto, o efeito da terra branqueadora ativada por ácido na formação de ésteres 3-MCPD ainda não está totalmente compreendido <sup>100</sup>.

### *Terras de branqueamento*

As montmorilonitas são utilizadas no refino do óleo durante o branqueamento. Além de remover pigmentos, a etapa de branqueamento visa melhorar a estabilidade oxidativa e as qualidades sensoriais do óleo <sup>102</sup>, pois compostos que estimulam a oxidação e conferem características desagradáveis ao óleo são removidos nessa etapa. Desse modo, o branqueamento é considerado uma etapa crítica <sup>102</sup> e de grande importância para garantir

a qualidade final do óleo <sup>103</sup>. Nessa etapa do refino, além das terras de branqueamento, também são utilizados compostos como carbono ativado e sílica <sup>39,98</sup>. Essas terras podem ser neutras ou com ativação ácida.

As montmorilonitas passam por tratamento ou modificação para melhorar suas propriedades físico-químicas <sup>104</sup>. A capacidade adsortiva das terras de branqueamento se deve à sua estrutura lamelar, que conferem a esses materiais área superficial elevada, com a capacidade de adsorver íons e moléculas orgânicas, sendo a adsorção e a dessorção controladas principalmente pelas propriedades da superfície da argila e pelas propriedades químicas das moléculas <sup>105</sup>. As terras naturais apresentam carga estrutural negativa que lhe permite adsorver corantes carregados positivamente, mas induz uma baixa capacidade de adsorção de corantes aniônicos <sup>105</sup>. Terras que passam por tratamento ácido visam melhorar a área superficial específica destes materiais ou a incorporação de cátions volumosos no espaçamento entre camadas para favorecer a interação eletrostática entre os cátions volumosos e os corantes <sup>104</sup>.

Uma representação tridimensional idealizada da estrutura da bentonita é a de camadas 2:1 (Figura 2-12), composta de camadas superiores e inferiores de tetraedros de óxido de silício ligados a matrizes hexagonais para formar folhas de silicato bidimensionais, preenchidas com magnésio, alumínio e ocasionais octaedros de óxido de ferro <sup>98</sup>. As terras do tipo bentonita pertencentes ao grupo da esmectita tem uma ampla gama de utilizações químicas e industriais devido a seu baixo custo, à grande área de superfície específica, às ricas propriedades estruturais de superfície e à estabilidade química e mecânica <sup>41,106</sup>.



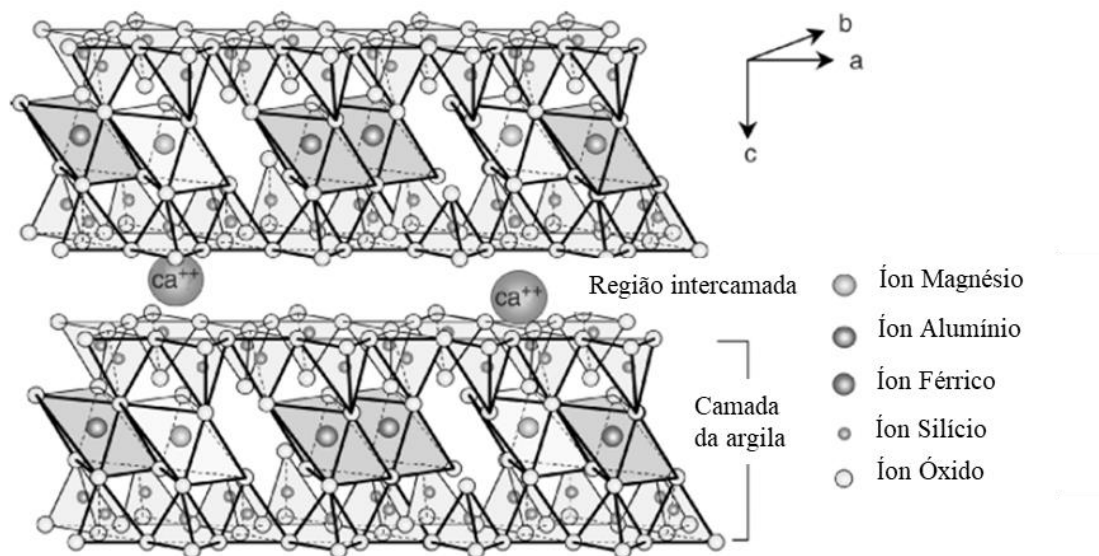


Figura 2-12: Representação tridimensional idealizada da estrutura da bentonita de cálcio em camadas 2:1 (Taylor, 2005)

As terras que passam por tratamento ácido, a fim de aumentar sua área superficial, são bastante eficientes no branqueamento <sup>41,102</sup> O tratamento com um ácido forte gera mudanças estruturais e químicas na montmorilonita e pode levar à dissolução de íons da camada octaédrica e substituição dos cátions trocáveis, alcalinos, como  $H^+$  e  $Al_3^+$ . Além disso, outros cátions escapam dos sítios tetraédricos e octaédricos, deixando os grupos de  $SiO_4$  praticamente intactos, o que acarreta em aumento da área superficial, da porosidade e da acidez dos minerais de terras, eliminação de várias impurezas minerais e dissolução parcial das camadas externas <sup>41,98</sup> (Figura 2-13).

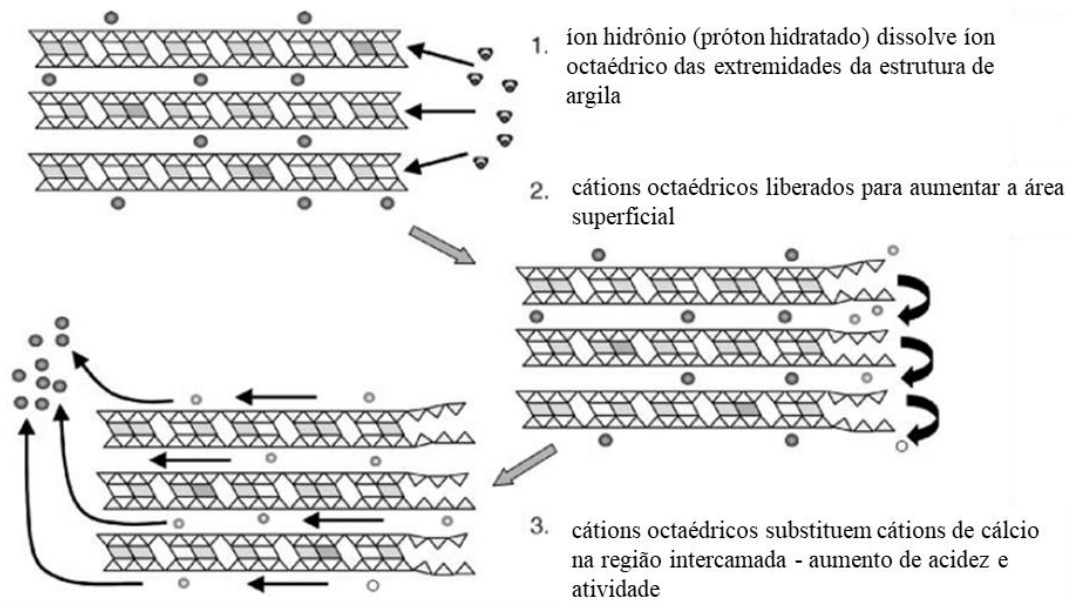


Figura 2-13: Argila ativada com dissolução ácida e substituição de cátion (Taylor, 2005)

Terras com ativação ácida e temperaturas elevadas agem como catalisadores ácidos em diferentes reações de isomerização, desidratação, esterificação e de oxidação no óleo vegetal. Desse modo, os adsorventes utilizados durante o branqueamento podem catalisar reações de oxidação.

Um crescente interesse diante da espécie híbrida de palma de óleo, que produz o óleo de palma com alto teor em ácido oleico, é observado atualmente. Porém, há escassez na literatura acerca de dados relativos à composição química, propriedades físicas e térmicas, do comportamento desse óleo diante das condições e terras utilizadas durante a etapa de branqueamento do refino. Este trabalho visa minimizar essa lacuna com a apresentação de três artigos onde o objeto principal do estudo é o óleo da espécie híbrida. Nestes trabalhos foram simuladas condições de branqueamento similares ao branqueamento industrial, onde apresentamos a influências da temperatura e de diferentes tipos de terras de branqueamento na formação de produtos de oxidação e na adsorção de carotenos no óleo.

## Referências

1. Kumar, A., Sharma, A. & Upadhyaya, K. C. Vegetable Oil: Nutritional and Industrial Perspective. *Curr. Genomics* 17, 230–240 (2016).
2. Simsek, S. & Uslu, S. Determination of a diesel engine operating parameters powered with canola, safflower and waste vegetable oil based biodiesel combination using response surface methodology (RSM). *Fuel* 270, 117496 (2020).
3. USDA. Strong Global Consumption Growth in 2021/22 Despite High Prices. Oilseeds: World Markets and Trade vol. 2021 <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/tx31qh68h/8g84nh663/3r075q71r/oilseeds.pdf> (2021).
4. Gov.br. Participação brasileira saltou de US\$ 20,6 bilhões para US\$ 100 bilhões. <https://www.gov.br/pt-br/noticias/agricultura-e-pecuaria/2021/03/participacao-brasileira-saltou-de-us-20-6-bilhoes-para-us-100-bilhoes>.
5. Abiove. Cadeia produtiva de oleaginosas e biodiesel. <https://abiove.org.br/cadeia-produtiva>.
6. Orsavova, J., Misurcova, L., Ambrozova, J. V., Vicha, R. & Mlcek, J. Fatty Acids Composition of Vegetable Oils and Its Contribution to Dietary Energy Intake and Dependence of Cardiovascular Mortality on Dietary Intake of Fatty Acids. *Int. J. Mol. Sci.* 16, 12871–12890 (2015).
7. Verhoeff, M. & Duijn, G. Edible Oil Processing, Second Edition. in 251–266 (2013). doi:10.1002/9781118535202.ch9.
8. de Andrade Araujo, J. M. *Química de alimentos: teoria e pratica.* (UFV).
9. Oswell, N. J., Gunstone, F. D. & Pegg, R. B. Vegetable Oils. in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* 1–30 doi:<https://doi.org/10.1002/047167849X.bio018.pub2>.
10. Frankel, E. E. *Lipid Oxidation.* (Oily Press Lipid Library, 2005).
11. Kamal-Eldin, A. Minor Components of Fats and Oils. in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (2005). doi:<https://doi.org/10.1002/047167849X.bio012>.
12. Yara-Varón, E. et al. Vegetable Oils as Alternative Solvents for Green Oleo-Extraction, Purification and Formulation of Food and Natural Products. *Molecules* 22, 1474 (2017).
13. Shahidi, F. & Zhong, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.* 39, 4067–4079 (2010).
14. Ribeiro, J. A. A., Almeida, E. S., Neto, B. A. D., Abdelnur, P. V. & Monteiro, S. Identification of carotenoid isomers in crude and bleached palm oils by mass spectrometry. *LWT - Food Sci. Technol.* 89, (2018).
15. Bockisch, M. B. T. Chapter 2 - Composition, Structure, Physical Data, and Chemical Reactions of Fats and Oils, Their Derivatives, and Their Associates. in (org. Bockisch, M. B. T.-F. and O. H.) 53–120 (AOCS Press, 1998).

doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-9818936-0-0.50007-X>.

16. de Almeida, E. S. et al. Thermal and Physical Properties of Crude Palm Oil with Higher Oleic Content. *Applied Sciences* vol. 11 (2021).
17. Schwingshackl, L. & Hoffmann, G. Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Lipids Health Dis.* 13, 154 (2014).
18. Degirolamo, C. & Rudel, L. L. Dietary monounsaturated fatty acids appear not to provide cardioprotection. *Curr. Atheroscler. Rep.* 12, 391–396 (2010).
19. Sales-Campos, H., Souza, P. R. de, Peghini, B. C., da Silva, J. S. & Cardoso, C. R. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini Rev Med Chem* 13, 201–210 (2013).
20. Saraswathi, V. et al. Lauric acid versus palmitic acid: Effects on adipose tissue inflammation, insulin resistance, and non-alcoholic fatty liver disease in obesity. *Biology (Basel)*. 9, 1–17 (2020).
21. Mancini, A. et al. Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. *Molecules* 20, 17339–17361 (2015).
22. Scrimgeour, C. *Chemistry of Fatty Acids. Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (2005) doi:<https://doi.org/10.1002/047167849X.bio005>.
23. Senanayake, S. P. J. N. & Shahidi, F. Modification of Fats and Oils via Chemical and Enzymatic Methods. *Bailey's Ind. Oil Fat Prod.* 1–29 (2020) doi:10.1002/047167849x.bio062.pub2.
24. Scrimgeour, C., Gao, Y., Oh, W. Y. & Shahidi, F. *Chemistry of Fatty Acids. Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (2020). doi:10.1002/047167849x.bio005.pub2.
25. Dijkstra, A. J. Chemical Interesterification. *AOCS Lipid Library* <https://lipidlibrary.aocs.org/edible-oil-processing/chemical-interesterification>.
26. Farajzadeh Alan, D., Naeli, M. H., Naderi, M., Jafari, S. M. & Tavakoli, H. R. Production of Trans-free fats by chemical interesterified blends of palm stearin and sunflower oil. *Food Sci. Nutr.* 7, 3722–3730 (2019).
27. Erhan, S. Z. *Industrial Uses of Vegetable Oil* . (AOCS Publishing, 2005). doi:<https://doi.org/10.4324/9781003040248>.
28. Metin, S. & Hartel, R. W. Crystallization of Fats and Oils. in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (2005). doi:<https://doi.org/10.1002/047167849X.bio021>.
29. Gunstone, F. *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses, Second Edition*. in *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses, Second Edition* 1–24 (2011). doi:10.1002/9781444339925.ch1.
30. Dijkstra, J. C. S. and A. J. Production and Refining of Oils and Fats. in *The Lipid Handbook The Lipid Handbook* (org. Frank D. Gunstone John L. Harwood, J. L. H.) 120 (2007).
31. Kadandale, S., Marten, R. & Smith, R. The palm oil industry and noncommunicable diseases. *Bull. World Health Organ.* 97, 118–128 (2019).
32. Javidipour, I., Erinç, H., Baştürk, A. & Tekin, A. Oxidative changes in hazelnut, olive, soybean, and sunflower oils during microwave heating. *Int. J. Food Prop.* 20, 1582–1592 (2017).

33. De Leonardis, A., Cuomo, F., Macciola, V. & Lopez, F. Influence of free fatty acid content on the oxidative stability of red palm oil. *RSC Adv.* 6, 101098–101104 (2016).
34. USDA. Palm Oil Explorer. vol. 2021 <https://ipad.fas.usda.gov/cropexplorer/cropview/commodityView.aspx?cropid=4243000> (2021).
35. F, U.-U. S. D. of A. Oilseeds: World Markets and Trade. 39 <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf> (2021).
36. Ocampo Battlle, E. A. et al. Thermodynamic and environmental assessment of different scenarios for the insertion of pyrolysis technology in palm oil biorefineries. *J. Clean. Prod.* 250, 119544 (2020).
37. Benami, E. et al. Oil palm land conversion in Pará, Brazil, from 2006–2014: evaluating the 2010 Brazilian Sustainable Palm Oil Production Program. *Environ. Res. Lett.* 13, 34037 (2018).
38. Vidoca, L. P. et al. Extraction of carotene from crude hybrid palm oil using polymeric resin. *J. Food Eng.* 278, (2020).
39. Almeida, E. S. et al. Elucidating how two different types of bleaching earths widely used in vegetable oils industry remove carotenes from palm oil: Equilibrium, kinetics and thermodynamic parameters. *Food Res. Int.* 121, (2019).
40. Embrapa. Palma de Óleo (Híbrido interespecífico *Elaeis oleifera* x *E. guineensis*) - BRS Manicoré. vol. 2021 <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas/-/produto-servico/941/palma-de-oleo-hibrido-interespecifico-elaeis-oleifera-x-e-guineensis---brs-manicore> (2010).
41. Alexander, J. A., Ahmad Zaini, M. A., Surajudeen, A., Aliyu, E.-N. U. & Omeiza, A. U. Surface modification of low-cost bentonite adsorbents—A review. Part. *Sci. Technol.* 37, 538–549 (2019).
42. Vispute, P. & Dabhade, S. Refining of palm oil: A review on palm oil refining process, 3- MCPD esters in refined palm oil, and possible reduction tactics for 3-MCPD esters. *Int. J. Agric. Eng.* 11, 81–85 (2018).
43. Sun, Y. et al. Palm Oil Consumption Increases LDL Cholesterol Compared with Vegetable Oils Low in Saturated Fat in a Meta-Analysis of Clinical Trials. *J. Nutr.* 145, 1549–1558 (2015).
44. Krist, S. *Vegetable Fats and Oils*. *Vegetable Fats and Oils* (Springer International Publishing, 2020). doi:10.1007/978-3-030-30314-3.
45. Basiron, Y. Palm oil production through sustainable plantations. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 289–295 (2007).
46. Basiron, Y. Palm Oil. in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (2005). doi:<https://doi.org/10.1002/047167849X.bio071>.
47. Gibon, V., De Greyt, W. & Kellens, M. Palm oil refining. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 109, 315–335 (2007).
48. Gibon, V. 12 - Palm Oil and Palm Kernel Oil Refining and Fractionation Technology. in (orgs. Lai, O.-M., Tan, C.-P. & Akoh, C. C. B. T.-P. O.) 329–375 (AOCS Press, 2012). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-9818936-9-3.50015-0>.

49. Silva, S. M. et al. Effect of type of bleaching earth on the final color of refined palm oil. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 1258–1264 (2014).
50. Čmolík, J. & Pokorný, J. Physical refining of edible oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 102, 472–486 (2000).
51. Pande, G., Akoh, C. C. & Lai, O.-M. 19 - Food Uses of Palm Oil and Its Components. in (orgs. Lai, O.-M., Tan, C.-P. & Akoh, C. C. B. T.-P. O.) 561–586 (AOCS Press, 2012). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-9818936-9-3.50022-8>.
52. May, C. Y. Palm Oil Carotenoids. *Food Nutr. Bull.* 15, 1–8 (1994).
53. N. Othman, Z.A. Manan, S. R. W. A. and M. R. S. A Review of Extraction Technology for Carotenoids and Vitamin E Recovery from Palm Oil. *J. Appl. Sci.* 10, 1187–1191 (2010).
54. Cerón-García, M. C. et al. Maximizing carotenoid extraction from microalgae used as food additives and determined by liquid chromatography (HPLC). *Food Chem.* 257, 316–324 (2018).
55. Saini, R. K. & Keum, Y.-S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chem.* 240, 90–103 (2018).
56. Mezzomo, N. & Ferreira, S. R. S. Carotenoids Functionality, Sources, and Processing by Supercritical Technology: A Review. *J. Chem.* 2016, 3164312 (2016).
57. Rodriguez-Amaya, D. B. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods.* (1999).
58. Qian, C., Decker, E. A., Xiao, H. & McClements, D. J. Physical and chemical stability of  $\beta$ -carotene-enriched nanoemulsions: Influence of pH, ionic strength, temperature, and emulsifier type. *Food Chem.* 132, 1221–1229 (2012).
59. Gul, K. et al. Chemistry, encapsulation, and health benefits of  $\beta$ -carotene - A review. *Cogent Food Agric.* 1, 1018696 (2015).
60. Decker, E. A. Natural Antioxidants In Foods. in (org. Meyers, R. A. B. T.-E. of P. S. and T. (Third E.) 335–342 (Academic Press, 2003). doi:<https://doi.org/10.1016/B0-12-227410-5/00472-5>.
61. Meléndez-Martínez, A. J., Britton, G., Vicario, I. M. & Heredia, F. J. Relationship between colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chem.* 101, 1145–1150 (2006).
62. Colle, I. J. P., Lemmens, L., Knockaert, G., Van Loey, A. & Hendrickx, M. Carotene Degradation and Isomerization during Thermal Processing: A Review on the Kinetic Aspects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 1844–1855 (2016).
63. Ribeiro, B. D., Coelho, M. A. Z. & Barreto, D. W. Production of concentrated natural beta-carotene from buriti (*Mauritia vinifera*) oil by enzymatic hydrolysis. *Food Bioprod. Process.* 90, 141–147 (2012).
64. Zdzislaw Z. E. Sikorski, A. K. Lipids and Food Quality. in *Chemical, biological, and functional aspects of food lipids* 10 (2010).
65. Britton, G., Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H. Special Molecules, Special Properties BT - Carotenoids: Volume 4: Natural Functions. in (orgs. Britton, G., Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H.) 1–6 (Birkhäuser Basel, 2008). doi:10.1007/978-3-7643-7499-0\_1.
66. PORIM. Test methods: Carotene content. Palm Oil Res. Inst. Malaysia (1990).

67. DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA, M. K. HarvestPlus handbook for carotenoid analysis. (INTERNATIONAL FOOD POLICY RESEARCH INSTITUTE (IFPRI), INTERNATIONAL CENTER FOR TROPICAL AGRICULTURE (CIAT), 2004).
68. D. Julian McClements e Eric A. Decker. Lipídeos. in *Química de alimentos de Fennema* (org. Srinivasan Damodaran, Kirk L. Parkin, O. R. F.) 890 (2010).
69. Zeb, A. & Murkovic, M. Determination of thermal oxidation and oxidation products of  $\beta$ -carotene in corn oil triacylglycerols. *Food Res. Int.* 50, 534–544 (2013).
70. Kiokias, S., Varzakas, T. & Oreopoulou, V. In Vitro Activity of Vitamins, Flavonoids, and Natural Phenolic Antioxidants Against the Oxidative Deterioration of Oil-Based Systems. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 48, 78–93 (2008).
71. Sen, C., Khanna, S. & Roy, S. Tocotrienols: Vitamin E Beyond Tocopherols. *Life Sci.* 78, 2088–2098 (2006).
72. Mozuraityte, R., Kristinova, V. & Rustad, T. Oxidation of Food Components. in (orgs. Caballero, B., Finglas, P. M. & Toldrá, F. B. T.-E. of F. and H.) 186–190 (Academic Press, 2016). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00508-0>.
73. Doleschall, F., Kemény, Z., Recseg, K. & Kővári, K. A new analytical method to monitor lipid peroxidation during bleaching. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 104, 14–18 (2002).
74. Choe, E. & Min, D. B. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 5, 169–186 (2006).
75. Farhoosh, R., Einafshar, S. & Sharayei, P. The effect of commercial refining steps on the rancidity measures of soybean and canola oils. *Food Chem.* 115, 933–938 (2009).
76. Schaich, K. M. Lipid Oxidation: Theoretical Aspects. in *In BAILEY'S INDUSTRIAL OIL AND FAT PRODUCTS* (org. Shahidi, F.) (John Wiley & Sons, Ltd, 2005).
77. Muik, B., Lendl, B., Molina-Díaz, A. & Ayora-Cañada, M. J. Direct monitoring of lipid oxidation in edible oils by Fourier transform Raman spectroscopy. *Chem. Phys. Lipids* 134, 173–182 (2005).
78. Wanasundara, P. K. J. P. D. & Shahidi, F. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (Wiley, 2005). doi:10.1002/047167849X.bio002.
79. Hwang, H.-S. *Advances in NMR Spectroscopy for Lipid Oxidation Assessment*. (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-54196-9.
80. Bartosz, G. & Ko\_owska, A. Lipid Oxidation in Food Systems. in 163–184 (2010). doi:10.1201/b10272-10.
81. Shahidi, F. & Zhong, Y. Lipid Oxidation: Measurement Methods. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (2005) doi:<https://doi.org/10.1002/047167849X.bio050>.
82. Rodriguez, E. B. & Rodriguez-Amaya, D. B. Lycopene Epoxides and Apolycopinals Formed by Chemical Reactions and Autoxidation in Model Systems and Processed Foods. *J. Food Sci.* 74, C674–C682 (2009).
83. SILVA, D. F., FAVARO-TRINDADE, C. S., ROCHA, G. A. & THOMAZINI, M.

- Microencapsulation of Lycopene by Gelatin–Pectin Complex Coacervation. *J. Food Process. Preserv.* 36, 185–190 (2012).
84. Zeb, A. Effects of  $\beta$ -carotene on the thermal oxidation of fatty acids. *African J. Biotechnol.* 10, 15346–15352 (2011).
  85. Young, A. J. & Lowe, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 385, 20–27 (2001).
  86. Silva, S. M. et al. Effect of type of bleaching earth on the final color of refined palm oil. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 1258–1264 (2014).
  87. Damanik, M. & Murkovic, M. The stability of palm oils during heating in a rancimat. *Eur. Food Res. Technol.* 244, 1–7 (2018).
  88. Ionescu, M., Vladut, V., Ungureanu, N., Dincă, M. & Zăbavă, B.-Ștefania. Methods for oil obtaining from oleaginous materials. (2016).
  89. Gunstone, F. D. Production and Trade of Vegetable Oils. in *Vegetable Oils in Food Technology* 1–24 (2011). doi:<https://doi.org/10.1002/9781444339925.ch1>.
  90. Redondo-Cuevas, L., G. Castellano, F. T. and V. R. NRevealing the relationship between vegetable oil composition and oxidative stability: A multifactorial approacho Title. *J. Food Compos. Anal.* 66, 221–229 (2018).
  91. Vaisali, C., Charanyaa, S., Belur, P. D. & Regupathi, I. Refining of edible oils: A critical appraisal of current and potential technologies. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50, 13–23 (2015).
  92. List, G. R., Wang, T. & Shukla, V. K. S. Storage, Handling, and Transport of Oils and Fats. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (2005) doi:<https://doi.org/10.1002/047167849X.bio049>.
  93. Anderson, D. A Primer on Oils Processing Technology. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (2005) doi:<https://doi.org/10.1002/047167849X.bio077>.
  94. Lin, L. & Koseoglu, S. S. Membrane Processing of Fats and Oils. in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* doi:<https://doi.org/10.1002/047167849X.bio082>.
  95. Sikorski, Z. E. & Kolakowska, A. Chemical, biological, and functional aspects of food lipids. (Taylor & Francis, 2011).
  96. Chapter 7 - Oil Purification. in (org. Bockisch, M. B. T.-F. and O. H.) 613–718 (AOCS Press, 1998). doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-9818936-0-0.50012-3>.
  97. Sales-Campos, H., Souza, P. R., Peghini, B. C., da Silva, J. S. & Cardoso, C. R. An overview of the modulatory effects of oleic acid in health and disease. *Mini Rev Med Chem* 13, 201–210 (2013).
  98. Taylor, D. R. Bleaching. in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (org. Shahidi, F.) (2005). doi:<https://doi.org/10.1002/047167849X.bio003>.
  99. David D. Brooks, R. B. and A. S. H. Optimization of Bleaching Process. <https://lipidlibrary.aocs.org/edible-oil-processing/optimization-of-bleaching-process> (2021).
  100. De Greyt, W. Edible Oil Refining: Current and Future Technologies. *Edible Oil Processing* 127–151 (2013) doi:<https://doi.org/10.1002/9781118535202.ch5>.
  101. Strieder, M. M. et al. The effect of temperature on rice oil bleaching to reduce



- oxidation and loss in bioactive compounds. *Grasas y Aceites* 70, 287 (2019).
102. J. C, O. Effect of Bleaching on Some Quality Attributes of Crude Palm Oil. *IOSR J. Eng.* 04, 25–28 (2014).
  103. Chandrasekar, V., Sampath, C., Belur, P. & Iyyaswami, R. Refining of edible oils: A critical appraisal of current and potential technologies. *Int. J. Food Sci. Technol.* 50, (2014).
  104. Aguiar, J. E. et al. Adsorption study of reactive dyes onto porous clay heterostructures. *Appl. Clay Sci.* 135, 35–44 (2017).
  105. Karaca, S. et al. Modeling of adsorption isotherms and kinetics of Remazol Red RB adsorption from aqueous solution by modified clay. *Desalin. Water Treat.* 51, 2726–2739 (2013).
  106. Naswir, M. et al. Activated Bentonite: Low Cost Adsorbent to Reduce Phosphor in Waste Palm Oil. *Int. J. Chem.* 11, 67–76 (2019).

**CAPÍTULO 3 - THERMAL AND PHYSICAL PROPERTIES OF CRUDE  
PALM OIL WITH HIGHER OLEIC CONTENT**

---

Artigo publicado *Appl. Sci.* **2021**, *11*(15), 7094; <https://doi.org/10.3390/app11157094>

### 3 Thermal and Physical Properties of Crude Palm Oil with Higher Oleic Content

*Erislene S. de Almeida<sup>1</sup>, Daniela da Silva Damaceno<sup>2</sup>, Laiane Carvalho<sup>1</sup>, Priscilla Araújo Victor<sup>1</sup>, Rafaela Menezes dos Passos<sup>3</sup>, Paula Virginia de Almeida Pontes<sup>3</sup>, Marcílio Cunha-Filho<sup>4</sup>, Klicia A. Sampaio<sup>3</sup> and Simone Monteiro<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Chemistry, University of Brasilia, Brasilia, Brazil, ZIP 70910-000;

<sup>2</sup> Faculty of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil, ZIP 13083-

<sup>3</sup> Faculty of Food Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil, ZIP 13083-000;

<sup>4</sup> Faculty of Health Sciences, University of Brasilia, Brasilia, ZIP 70910-000 Brazil;

**Abstract:** *Interspecific hybridization of oil palms (*E. guineensis* × *E. oleifera*) was initially exploited to provide disease resistance and, consequently, increased oleic acid content. Besides the growing importance of this cultivar to the market, there is little information about this oil's properties. In this context, this study aimed to determine a comprehensive physicochemical and thermal characterization of hybrid palm oil (HOPO) compared with the better-known African palm oil (APO). Differences in the distribution of fatty acids, carotenoids, and tocopherols were observed. Minor differences in density and viscosity were found between the oils, with no relevance for the materials' processing design. Nevertheless, HOPO showed unique crystallization behavior, which potentially can affect industrial operations, such as fractionation. HOPO did not present the two thermal characteristic regions of APO, attributed to olein and stearin fractions. The HOPO demonstrated a decrease in the melting point of more than 3 °C in relation to APO, and a reduction in the crystallization point of more than 6 °C. Furthermore, besides the higher content of unsaturated fatty acids, HOPO was more stable than APO due to a higher antioxidant content. These results could be useful to establish operation conditions for processes using palm oil from hybrid oil palm.*

**Keywords:** *crude palm oil; interspecific hybridization; melting; crystallization, carotenoids*

### 3.1 Introduction

Palm oil has great importance in the world economic scenario, being the most used vegetable oil source. In fact, according to the United States Department of Agriculture, in 2020, palm oil world production was 75 million tons [1], surpassing the production of soybean, sunflower, and canola oil and accounting for one-third of vegetable oil production [2]. It has a wide application in industries, especially in food and pharmaceutical industries [3], also being one of the main alternatives for biofuel production in the following years [4].

Most commercial oil palms used are obtained from *E. guineensis*, an African species with high productivity per hectare, though very susceptible to fatal yellowing disease [5]. Alternatively, *E. oleifera*, an oil palm native from Central and South America, shows high resistance to this disease and other pests; however, it is not commercially exploited due to its low productivity. In this sense, the hybridization between both species (*E. guineensis* x *E. oleifera*) can generate an oil palm as productive as the African species and resistant to diseases like the American species [6].

Besides the disease resistance, hybridization also changes palm oil's chemical composition. Palm oil extracted from a hybrid cultivar showed an intermediary fatty acids profile compared to its two parental species [7]. Commonly, *E. guineensis* oil presents about 50% of saturated fatty acids, i.e., 44% of palmitic, 5% stearic, and traces of myristic, in addition to unsaturated fatty acids which correspond to approximately 40% oleic and 10% linoleic acids [8]. Regarding *E. guineensis* x *E. oleifera* oil, the fatty acids profile corresponds mainly to oleic (56%), palmitic (27%), linoleic (11%), and stearic (3.5%) acids [6]. The Codex Committee on Fats and Oils recommends commercializing such oil with the denomination of palm oil with higher oleic content [9].

In the literature, there are several studies regarding hybrid oil palm trees and their oils' characterization. The studies describe the cultivar's growth and its vegetative characteristics and characterization regarding oil composition in terms of fatty acids, acylglycerols, and minor compounds [5,7,8,10–12]. All those previously mentioned studies regard chemical composition and fatty acid profile. However, there is a lack of scientific studies on the processing and physical properties of palm oil from the hybrid cultivar.

Undeniably, the fatty acid profile determination assumes great importance since it is related to vegetable oils' physical properties. The wide range of food and non-food applications is due to palm oil's unique fatty acid composition, which allows its easy fractionation [13–15]. Under controlled thermal conditions, palm oil can be fractionated into two components in a single step: a solid fraction (stearin, which contains more trisaturated triacylglycerol and will crystallize) and a liquid fraction (olein, which contains less trisaturated triacylglycerol, remaining liquid) [2,13].

This fractionation process can determine some of the chemical and physical properties of the oleins and stearins produced. In the food industry, those two fractions have different applications; for instance, olein may be used as frying oil and stearin as a butter substitute [16]. Each fraction's yield highly depends on the triacylglycerol composition and palm oil's crystallization behavior [13,17,18]. Besides, fatty acids also play an important role in terms of their effects on human health. An oil with a high content of monounsaturated fatty acids, such as oleic acid, can lower bad cholesterol levels and protect against heart disease [5,6]. On the other hand, saturated fatty acids, such as palmitic acids, are related to a higher incidence of cardiovascular diseases and obesity [7,8]. African palm oil (APO) has a balanced composition between saturated and unsaturated fatty acids; hybrid palm oil (HOPO), in turn, has a high content of unsaturated fatty acids, especially oleic acid [9] Furthermore, palm oil is widely used in non-food industries, including its

application other than food as hydraulic oil, drilling fluid, transmission fluid and lubricants, being fully biodegradable [19].

Several physical properties which infer process design also depend on the fatty acid composition. For instance, density and viscosity, essential fluid properties for the design of pipes, accessories, and equipment utilized in the oil industry, are highly dependent on the length and degree of fatty acids' unsaturation [20,21]. The composition of fatty acids attached to a triacylglycerol molecule determines its thermal behavior. The different molecular structures of triacylglycerols, with their different chemical characteristics, manifest their physical states at different temperatures, giving the oil crystallization and melting behavior [18]. The more saturated the fatty acids adhered to the triacylglycerol, the faster the crystallization processes. Besides the importance of palm oil for the industry and the growing interest in cultivating hybrid oil palms, there is a lack of physical and thermal properties for palm oils with higher oleic content.

In this context, this work aims to determine the physicochemical and thermal properties of commercial hybrid palm oil obtained from an interspecific hybrid cultivar (*E. oleifera*  $\times$  *E. guineensis*). The results were compared to the better-known and widely commercially exploited African palm oil (*E. guineensis*).

## **3.2 Material and Methods**

### **3.2.1 Physicochemical Characterization**

Commercial crude oils obtained from two different oil palms—*Elaeis guineensis* and the interspecific hybridization of *Elaeis guineensis*  $\times$  *Elaeis oleifera*, here so-called African (APO) and hybrid palm oil (HOPO), respectively—were kindly supplied by Denpasa (Santa Bárbara do Pará, Brazil). The oil samples were characterized regarding

standard quality parameters, following the AOCS official methods [22]: iodine value and unsaponifiable matter (Cd 1c-85 and Ca 6a-40). Total carotene content, expressed as  $\beta$ -carotene, was determined by measuring the absorbance at 446 nm of samples homogenized and diluted in hexane (Spectrophotometer Cary 5000, Varian, Palo Alto, CA, USA) [23]. All analyses were performed in triplicate. Acylglycerols were quantified by the Agilent 7890B gas chromatography system, following the AOCS official method (Santa Clara, CA, USA) (Cd 11b-91).

*$\alpha$ - and  $\beta$ -carotene quantification:* The chromatographic analysis was carried out in HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipped with a quaternary pump (LC-20AD), a degasser, a UV-Vis DAD (SPD-M20A) detector, and an autoinjector (SIL-20A). The oven was set at 40 °C, and chromatograms were obtained at 450 nm. The compound separation was performed using a C30 column (Develosil, Hinode, Japan, 250  $\times$  4.6 mm; 5  $\mu$ m particle size). Elution gradient was a mixture of acetonitrile and methanol (0.05% triethylamine – TEA) and Tetrahydrofuran (THF) with a flow rate of 1.2 mL min<sup>-1</sup>, in which the gradient only changed the concentrations of methanol and acetonitrile. The channels of the mobile phase were acetonitrile (A), methanol (0.05% TEA) (B), and tetrahydrofuran (C). Gradient proceeded as follows: (C) remained isocratic at 5% during all the analysis, and all the compositions varied linearly; from 0–10 min, (A) concentration varied from 95 to 65%, and (B) channel went from 0 to 30%; 10–20 min compositions varied to 55% (A) and 40% (B) and remained isocratic up until 60 min of the run; 60–65 min, the composition was set back to 65% (A) and 30% (B) and 65. After 65 min, (A) raised to 95% and (B) went down to 0%. Samples consisted of approximately 50 mg of crude oils diluted in 1 mL of acetone. The injection volume was 10  $\mu$ L. The quantification was performed using Sigma-Aldrich  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene standards (St. Louis, MO, USA).

*Tocols quantification:* Tocopherols and tocotrienols quantification was performed by UHPLC without sample pre-treatment, as previously reported [24]. The chromatographic analysis was performed using a Waters Acquity SQD/UPLC system (Milford, MA, USA), equipped with a PDA detector, a single-quadrupole mass spectrometer system with Electrospray Ionization interface, automatic injector, a quaternary pump, and a column oven. An Acquity UPLC BEH C18 column, 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1  $\times$  100 mm, was used (Milford, MA, USA). Instrument control and data acquisition were performed using the MassLynx software. Chromatographic separation was achieved by gradient elution using different proportions of Solvent A (methanol: water: ammonium hydroxide 99:1:0.1 v/v/v) and Solvent B (isopropanol). The flow rate was 0.2 mL min<sup>-1</sup> up to 6 min, followed by 0.15 mL min<sup>-1</sup> from 6 to 10 min, and 0.2 mL min<sup>-1</sup> until 15 min. The elution gradient was as follows: 0–6 min 100% A; 6.01–8 min 100% B; 8.01–15 min 100% A. The injection volume was 5  $\mu\text{L}$ , and the column temperature was 25 °C. Calibration curves were performed using commercial standards of  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$  tocopherols (Merck, Kenilworth, NJ, USA), and  $\alpha$ ,  $\gamma$ , and  $\delta$  tocotrienols (Chromadex, Los Angeles, CA, USA).

*Main fatty acids analysis:* The oleic, linoleic, and linolenic determination were performed by <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance (NMR). A Bruker BioSpin GmbH spectrometer (Billerica, MA, USA) was used, operating in a magnetic field of approximately 14T with a 5 mm PABBO BB/19F-1H/D Z-GRD probe Z114607/0139, observing the cores from <sup>1</sup>H to 600.17 MHz. Samples were prepared using about 30–40 mg of each oil dissolved in 2 mL of deuterated chloroform containing tetramethylsilane (TMS), used as a reference. The acquisition parameters were: spectral width of 12,019.2 Hz, relaxation delay of 1 s, number of scans 16, acquisition time of 2.7263 s, and pulse width of 10.0400 Hz. The experiment was conducted at 25 °C. The <sup>1</sup>H NMR spectrum was analyzed in the MestRenova 12<sup>®</sup> software (Mestrelab Research, Billerica, MA, USA),



using the TMS signal at 0.00 ppm. The integrals of the signs were used to calculate concentrations. The  $^1\text{H}$  NMR technique employed in this work can quantify unsaturated fatty acids, the main influence in palm oil's physical properties, in a more straightforward and fast way than the traditional method by gas chromatography [21,22,25].

### 3.2.2 Physical and Thermal Properties

*Density:* Oil samples' densities were measured using a densimeter Rudolph Research Analytical DDM 2910 (New Jersey, NJ, USA) in the range of 20 to 80 °C at 10 °C intervals. The standard deviations of the measurements in the densimeter after proper calibration were  $1 \times 10^{-4} \text{ g cm}^{-3}$ .

*Viscosity:* Viscosities of the oils were determined using 10 mL samples in the range of 20 to 80 °C at 10 °C intervals at atmospheric pressure using an automated rheometer Brookfield LV<sup>®</sup> (Middleboro, MA, USA) equipped with a spindle SC-34. The temperature uncertainty was 0.1 °C. Approximately 12 g of sample was under 100 rpm and 28 shear rate  $\text{s}^{-1}$  during 25 min. The viscosity data were obtained using Rheocalc<sup>®</sup> software (Version 2.4, Brookfield Engineering Laboratories, USA) and the calculated standard deviations were  $\pm 1\%$ .

*Differential scanning calorimetry (DSC):* The thermal behavior of oil samples was analyzed in duplicate using a differential scanning calorimeter coupled to an automated cooling TAC-60i (Shimadzu DSC-60, Kyoto, Japan) [26]. Oil samples of 3–4 mg were placed in aluminum pans sealed and analyzed under dynamic nitrogen atmosphere at 50  $\text{mL min}^{-1}$ . Samples were equilibrated at 80 °C, cooled at 5 °C/min to –80 °C, and maintained at this temperature for 2 min to eliminate the thermal history; then, the samples were heated at 5 °C/min to 80 °C, and finally cooled at 5 °C/min to –80 °C. For oil thermal behavior, just the final heating and cooling data were considered.

*Thermal gravimetric analysis (DTG):* The thermogravimetric analyses of HOPO and APO were performed in DTG-60H equipment (Shimadzu, Kyoto, Japan). Samples of 3–4 mg were placed in platinum pans under a nitrogen flow of 50 mL min<sup>-1</sup> and analyzed at a heating rate of 5 °C/min from 30 to 460 °C. Analyses were carried out using the TA software (Shimadzu, Kyoto, Japan) [20].

### **3.3 Results and Discussion**

#### **3.3.1 Chemical Characterization of the Oils**

Table 3-1 presents the physicochemical characterization of HOPO and APO. Total carotene content was 830 and 524 mg/kg for HOPO and APO, respectively, practically within the range reported for African palm oil (500–1000 mg/kg) [27]. In APO, the  $\beta$ -carotene concentration was 380 mg/kg, while in HOPO it was 504 mg/kg. The  $\alpha$ -carotene concentration was 51 mg/kg in APO and 60 mg/kg in HOPO. The concentration of  $\alpha$ - +  $\beta$ -carotenes combined corresponded to 69 and 82% of the total carotenes for HOPO and APO, respectively. According to the literature, all quality parameters and carotene contents met the requirement expected for palm oil [12,28].

Table 3-1: Physicochemical characteristics of hybrid (HOPO - *E. oleifera* x *E. guineensis*) and African (APO - *E. guineensis*) palm oil.

	HOPO	APO
Acylglycerols (% w/w)		
Monoacylglycerol	0.21	0.24
Diacylglycerol	3.96	4.54
Triacylglycerol	93.73	91.44
Fatty acids profile (%)		
Oleic	56.34	44.81
Linoleic	7.35	7.65
Linolenic	2.06	1.28
Free Fatty Acids (% palmitic)	2.1 ± 0.09	3.8 ± 0.08
Iodine Value (g/100g)*	67.7	52.3
Unsaponifiable matter (mg/g)		
Total Carotene (mg/kg)	830 ± 6	524 ± 4.4
α-carotene	60	51
β-carotene	504	380
Tocols (mg/kg)		
α-tocopherol	136.4	167.5
β/γ-tocopherol	0	0
δ-tocopherol	0	0
α-tocotrienol	128.6	117.1
β/γ-tocotrienol	603.5	413.6
δ-tocotrienol	15.2	29.8

\* calculated referring to fatty acid composition previously reported by Ribeiro, Almeida, Neto, Abdelnur, and Monteiro (2018).

Regarding tocopherols, HOPO and APO presented 136.4 and 167.5 mg/kg of  $\alpha$ -tocopherols, respectively. On the other hand,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -tocopherols were not detected in both oils, as usual for palm oil [12]. All classes of tocotrienols were present in HOPO and APO, i.e., 128.6 and 117.1 mg/kg of  $\alpha$ -tocotrienol; 603.5 and 413.6 mg/kg of  $\beta$ -/ $\gamma$ -tocotrienols; and 15.2 and 29.8 mg/kg of  $\delta$ -tocotrienol, respectively. The tocopherol/tocotrienol ratio of HOPO and APO was 18% and 29%, respectively. A similar ratio of about 20% was previously reported for an oil obtained from palm trees [29]. Moreover, Mozzon et al. [12] described similar results for HOPO, in which tocotrienols were found in high incidence, and the  $\alpha$ -isomer was the most abundant tocopherol. Tocotrienols possess neuroprotective, anti-cancer and cholesterol-lowering properties that are often not ascribed to tocopherols [30].

The unsaturated fatty acids with the highest occurrence in both oils were oleic, linoleic, and linolenic (Table 3.1). Those correspond to 65.6 and 53.7% of total fatty acids, corroborated by previous reports [6]. Palmitic acid is mostly responsible for completing the fatty acids composition [5–7,12,28]. This fatty acid composition is vital to explain the differences in vegetable oils' physical properties described hereafter. Additionally, vegetable oil composition may vary slightly with cultivation conditions, raw material maturation, and storage time. Thus, this complete chemical characterization is important to guarantee the authenticity of studied oils and register the composition at the analysis moment.

### **3.3.2 Physicochemical Properties**

The density of palm oils measured at temperatures from 20 to 80 °C to cover a is given in Table 3-2. The values follow the Codex Alimentarius Standard for palm oil (0.889–0.895 g mL<sup>-1</sup> at 20 °C) [31]. The fatty acid composition can explain the slight

difference between oils' density since hybrid palm oil has about 65% unsaturated fatty acids, while African has nearly 50% [6]. In fact, unsaturated fatty acids are denser than saturated ones [22]. Nevertheless, the differences in density found between hybrid and African oils are negligible for process design purposes. The viscosities of palm oil measured at temperatures from 40 to 80 °C are exhibited in Table 3.2. At temperatures lower than 40 °C, palm oils were at a semi-solid state, preventing viscosity measures. The viscosity of HOPO presented a smaller variation with temperature—a result of the higher content of unsaturated fatty acids [21].

*Table 3-2: Densities and viscosities of palm oils as a function of temperature \**

T (°C)	HOPO		APO	
	Density (g/cm <sup>3</sup> )	Viscosity (cP)	Density (g/cm <sup>3</sup> )	Viscosity (cP)
20	0.91369	-	0.91450	-
30	0.90637	-	0.90680	-
40	0.89866	40.19	0.89739	43.79
50	0.88663	27.59	0.88509	25.19
60	0.88396	20.4	0.88040	18.6
70	0.87849	15.6	0.86810	13.8
80	0.87174	12.0	0.86411	10.8

\* Standard uncertainty: density < 0.0001 kg/m<sup>3</sup>, viscosity ± 1%.

### 3.3.3 Thermal Analysis of the Oils

The thermal profile of the oils, particularly the melting and crystallization events, is plotted in Figures 3-1 and 3-2. Due to the complex composition of triacylglycerols (TAGs) in the palm oil [28], several endothermic events, almost simultaneous, were observed in the heating program for both palm oils. In particular, two major endothermic

events with a few sub-peaks can be identified (Figures 3.1 and 3.2 and Table 3.3). A similar thermal profile has been described for APO [28,32].

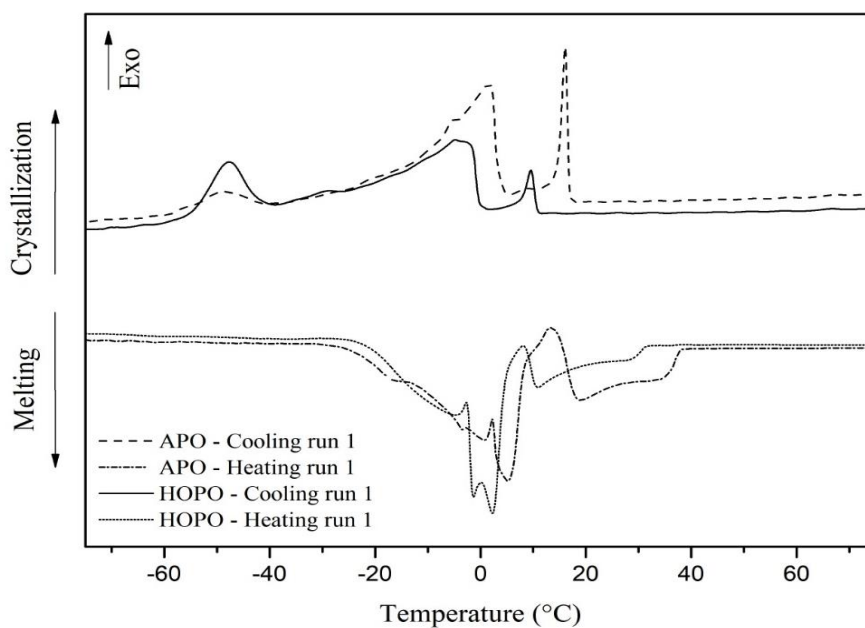


Figure 3-1: DSC curves in a heating and cooling program of APO and HOPO for run 1

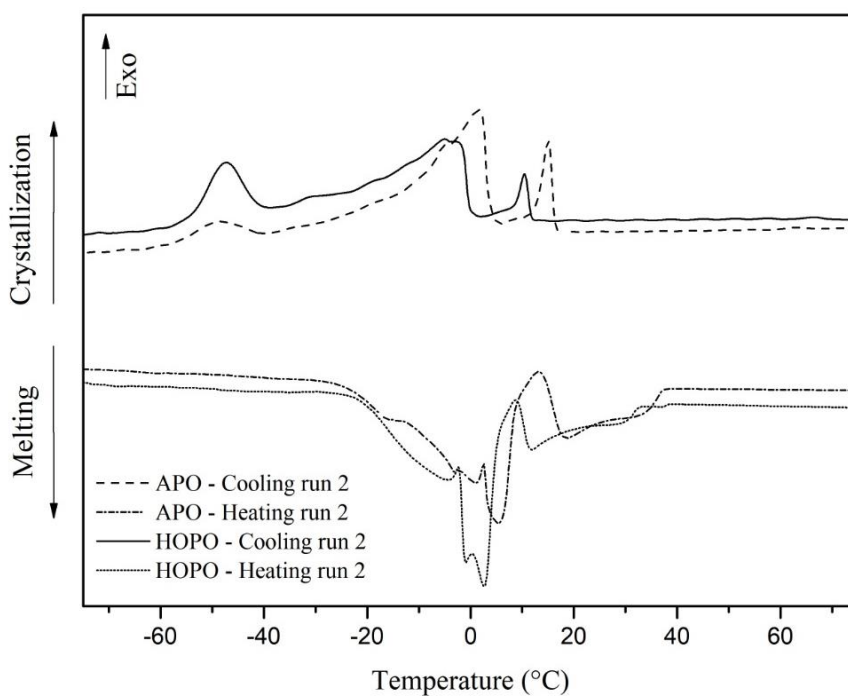


Figure 3-2: DSC curves in a heating and cooling program of APO and HOPO for run 2.

DSC data of heating showed the first event from  $-30.2\text{ }^{\circ}\text{C}$  to  $13.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (enthalpy  $39.27\text{ kJ}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) for APO and from  $-30.0$  to  $8.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (enthalpy  $23.40\text{ kJ}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) for HOPO, which are related to the contribution of the unsaturated triacylglycerols melting, such as UUU or SUU (ABC = fatty acid composition of TAG, U unsaturated fatty acid, S saturated fatty acid) [28,33]. This first broad endotherm event in both palm oils also indicates the presence of OOO, POL, and PLP compounds (P palmitic, O oleic and L linoleic acids). Moreover, the melting peak found in APO at  $5.48\text{ }^{\circ}\text{C}$  evidenced the presence of triolein compounds (melting temperature at  $5.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) [34]. The second endothermic event (Figure 3.1) is more pronounced in APO and should be related to the saturated triacylglycerols' contribution (SSS or SSU) [28].

Table 3-3 shows the melting peaks and the range temperature of the endothermic events for both compounds. HOPO exhibited lower temperatures for the endothermic peaks than APO. This behavior could be related to the fact that the APO has about 50% of unsaturated fatty acids composition, while HOPO has around 65%. In fact, unsaturated compounds present lower melting points than saturated ones [28,32,34,35].

The DSC crystallization profiles for APO and HOPO obtained by the samples' cooling program are presented in Figures 3.1 and 3.2 and Table 3.3. APO showed three crystallization peaks ( $T_c$ ), which are  $-49.09\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $1.55\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $15.61\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A similar crystallization profile was noted for HOPO (Table 3.3). Additionally, in the case of APO, a third peak involving less energy, ranging from  $5.88$  to  $17.99\text{ }^{\circ}\text{C}$ , can be attributed to the presence of TAGs such as SSS and SSU triacylglycerols [28]. The exotherm observed at lower temperatures, which in the case of APO ranges from  $5.88$  to  $63.32\text{ }^{\circ}\text{C}$ , and in the case of HOPO involves temperatures from  $1.82$  to  $71.88\text{ }^{\circ}\text{C}$ , is possibly related to unsaturated fatty acids (for example, UUU and SUU). These findings explain the broadest and most intense exotherm observed in HOPO, which showed a higher content of

unsaturated fatty acids [33]. Similar behavior was previously reported for crude palm oil, involving two sharp peaks of crystallization obtained at temperatures slightly higher than those found here [8,33].

*Table 3-3: Thermal events APO and HOPO obtained from the differential scanning calorimetry (DSC) curves*

		<b>1° PEAK</b>	<b>AD</b>	<b>2° PEAK</b>	<b>AD</b>	<b>3° PEAK</b>	<b>AD</b>
APO	TM	5.32	0.33	18.68	0.50	-	-
	TRM	-30.2 UP TO 13.5	-	13.42 UP TO 38.67	-	-	-
	Tc	-49.095	0.25	1.555	0.09	15.61	0.88
	TRC	-63.32 UP TO -39.55	-	-39.55 UP TO 5.88	-	5.88 UP TO 17.89	-
HOPO	TM	2.47	0.33	11.36	0.83	-	-
	TRM	-30.0 UP TO 8.5	-	-.05 UP TO 33.29	-	-	-
	Tc	-47.67	0.42	-4.81	0.25	9.98	0.84
	TRC	-71.88 UP TO 39.01	-	-39.01 UP TO 1.82	-	1.82 UP TO 12.29	-

Tm is the melting point of the most ascendant peak; TRm is the range temperature of melting transition; Tc is the crystallization temperature; TRc is the range temperature of crystallization transition; AD is the absolute deviation of the duplicates.

The mass loss related to the decomposition of palm oils occurred in two steps (Figure 3.3). The thermal decomposition profile of both oils is similar, including a slow first step of mass loss from 180 to 300 °C, and a fast second step of mass loss from 180 to 440 °C, which accounts for more than 90% of the sample mass loss. Nevertheless, a difference in the kinetic of the first step of mass loss is noted among the oils, Figure 3-3. The first temperature range is related to the degradation of polyunsaturated fatty acids, followed by monosaturated and saturated fatty acids [36]. Even with a higher concentration of unsaturated fatty acid, HOPO is slightly more stable than APO, showing a slower first decomposition step. This thermal profile is probably due to the high amounts of antioxidant compounds, such as carotenes and tocopherols. The same stability improvement was reported for several commercial edible oils, such as olive, soybean, and canola [34].



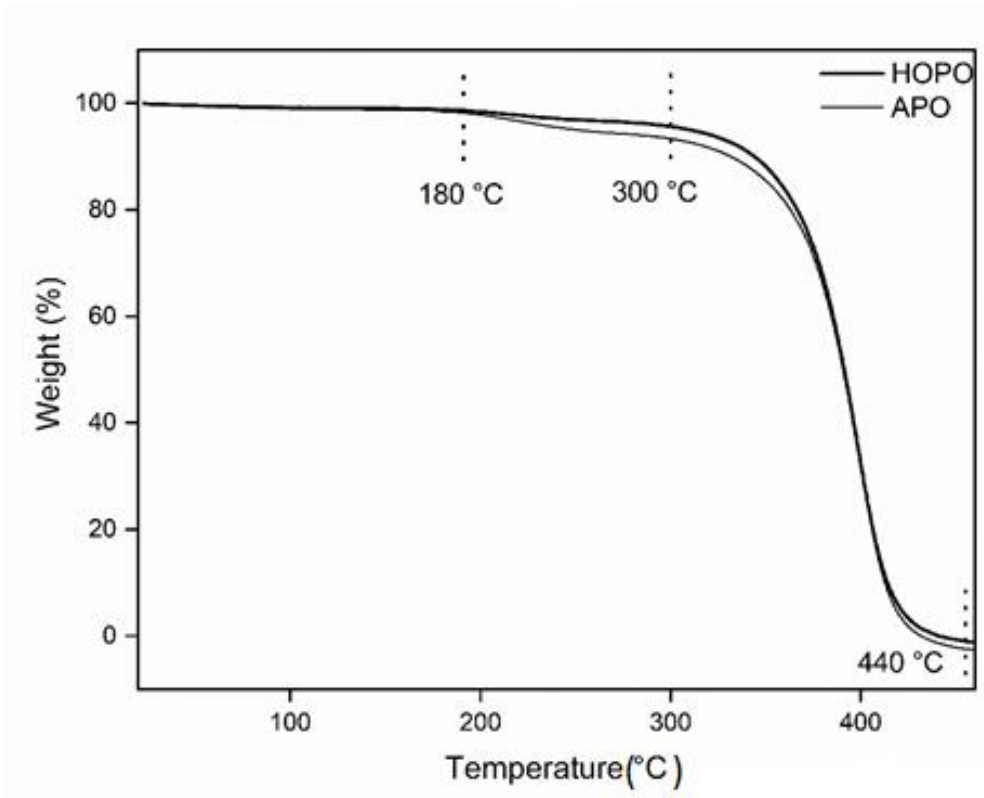


Figure 3-3: TGA curves of palm oil APO and HOPO

### 3.4 Conclusions

This study determined the physicochemical, physical, and thermal properties of hybrid palm oil obtained from an interspecific hybrid cultivar (*E. oleifera* × *E. guineensis*), which was compared to the palm oil obtained from the African cultivar (*E. guineensis*). The oils presented chemical differences; however, both showed an appropriate chemical profile required for commercial exploitation. Moreover, small differences in density and viscosity were found between the oils, with no relevance for the materials' processing design. Nevertheless, the thermal analysis demonstrated that the hybrid species' oil presented distinguished melting/crystallization behavior, affecting industrial operations, such as fractionation and olein and stearin yields. Furthermore, besides the higher content of unsaturated fatty acids, HOPO was more stable than APO due to a higher antioxidant content. The results presented here are useful to establish operation conditions for

processes using palm oil from hybrid oil palm, a cultivar that is arousing the industry's interest due to its resistance to pests.

## References

1. United States Department of Agriculture (USDA). Oilseeds: World Markets and Trade. Available online: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf> (accessed on January 2021).
2. Oosterveer, P. Sustainability of Palm Oil and Its Acceptance in the EU. *J. Oil Palm Res.* **2020**, *32*, 365–376, doi:10.21894/jopr.2020.0039.
3. Sampaio, K.A.K.A.; Ayala, J.V.; Van Hoed, V.; Monteiro, S.; Ceriani, R.; Verhé, R.; Meirelles, A.J. Impact of Crude Oil Quality on the Refining Conditions and Composition of Nutraceuticals in Refined Palm Oil. *J. Food Sci.* **2017**, *82*, 1842–1850, doi:10.1111/1750-3841.13805.
4. Pirker, J.; Mosnier, A.; Kraxner, F.; Havlík, P.; Obersteiner, M. What Are the Limits to Oil Palm Expansion? *Glob. Environ. Chang.* **2016**, *40*, 73–81, doi:10.1016/j.gloenvcha.2016.06.007.
5. Mozzon, M.; Pacetti, D.; Lucci, P.; Balzano, M.; Frega, N.G. Crude Palm Oil from Interspecific Hybrid *Elaeis Oleifera* × *Elaeis Guineensis*: Fatty Acid Regiodistribution and Molecular Species of Glycerides. *Food Chem.* **2013**, *141*, 245–252, doi:10.1016/j.foodchem.2013.03.016.
6. Ribeiro, J.A.A.; Almeida, E.S.; Neto, B.A.D.; Abdelnur, P.V.; Monteiro, S. Identification of Carotenoid Isomers in Crude and Bleached Palm Oils by Mass Spectrometry. *LWT Food Sci. Technol.* **2018**, *89*, 631–637, doi:10.1016/j.lwt.2017.11.039.
7. Mozzon, M.; Pacetti, D.; Frega, N.G.; Lucci, P. Crude Palm Oil from Interspecific Hybrid *Elaeis Oleifera* × *E. Guineensis*: Alcoholic Constituents of Unsaponifiable Matter. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2015**, *92*, 717–724, doi:10.1007/s11746-015-2628-1.
8. Buscato, M.H.M.; Zaia, B.G.; De Godoi, K.R.R.; Ribeiro, A.P.B.; Kieckbusch, T.G. Modification of Palm Oil Crystallization by Phytosterol Addition as a Tool for Structuring a Low Saturated Lipid Blend. *Brazilian J. Chem. Eng.* **2018**, *35*, 169–180, doi:10.1590/0104-6632.20180351s20160351.
9. Vidoca, L.P.; Almeida, E.S.; Cardoso, M.F.; Otavio, L.; Valadares, L.F.; Monteiro, S. Extraction of Carotene from Crude Hybrid Palm Oil Using Polymeric Resin. *J. Food Eng.* **2020**, *278*, 109944, doi:10.1016/j.jfoodeng.2020.109944.
10. Hardon, J.J. Interspecific Hybrids in the Genus *Elaeis* II. Vegetative Growth and Yield of F1 Hybrids *E. Guineensis* × *E. Oleifera*. *Euphytica* **1969**, *18*, 380–388, doi:10.1007/BF00397785.
11. Montoya, C.; Lopes, R.; Flori, A.; Cros, D.; Cuellar, T.; Summo, M.; Espeout, S.; Rivallan, R.; Risterucci, A.M.; Bittencourt, D.; et al. Quantitative Trait Loci (QTLs) Analysis of Palm Oil Fatty Acid Composition in an Interspecific Pseudo-Backcross

- from *Elaeis Oleifera* (H.B.K.) Cortés and Oil Palm (*Elaeis Guineensis* Jacq.). *Tree Genet. Genomes* **2013**, *9*, 1207–1225, doi:10.1007/s11295-013-0629-5.
12. Mozzon, M.; Foligni, R.; Mannozi, C. Current Knowledge on Interspecific Hybrid Palm Oils as Food and Food Ingredient. *Foods* **2020**, *9*, 631, doi:10.3390/foods9050631.
  13. Basiron, Y. Palm Oil. In *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*; Shahidi, F., Ed.; John Wiley & Son: New York, NY, USA, 2005; Volume 2, pp. 333–430.
  14. Che Man, Y.B.; Haryati, T.; Ghazali, H.M.; Asbi, B.A. Composition and Thermal Profile of Crude Palm Oil and Its Products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76*, 237–242, doi:10.1007/s11746-999-0224-y.
  15. Hishamuddin, E.; Nagy, Z.K.; Stapley, A.G.F. Thermodynamic Analysis of the Isothermal Fractionation of Palm Oil Using a Novel Method for Entrainment Correction. *J. Food Eng.* **2020**, *273*, 109806, doi:10.1016/j.jfoodeng.2019.109806.
  16. Mancini, A.; Imperlini, E.; Nigro, E.; Montagnese, C.; Daniele, A.; Orrù, S.; Buono, P. Biological and Nutritional Properties of Palm Oil and Palmitic Acid: Effects on Health. *Molecules* **2015**, *20*, 17339–17361, doi:10.3390/molecules200917339.
  17. West, R.; Rousseau, D. Tripalmitin-Driven Crystallization of Palm Oil: The Role of Shear and Dispersed Particles. *JAOCs J. Am. Oil Chem. Soc.* **2020**, *97*, 989–999, doi:10.1002/aocs.12397.
  18. Gibon, V.; Danthine, S. Systematic Investigation of Co-Crystallization Properties in Binary and Ternary Mixtures of Triacylglycerols Containing Palmitic and Oleic Acids in Relation with Palm Oil Dry Fractionation. *Foods* **2020**, *9*, 1891, doi:10.3390/foods9121891.
  19. Wan Nik, W.B.; Ani, F.N.; Masjuki, H.H. Thermal Stability Evaluation of Palm Oil as Energy Transport Media. *Energy Convers. Manag.* **2005**, *46*, 2198–2215, doi:10.1016/j.enconman.2004.10.008.
  20. Ceriani, R.; Paiva, F.R.; Goncalves, C.B.; Batista, E.A.C.; Meirelles, A.J.A. Densities and Viscosities of Vegetable Oils of Nutritional Value. *J. Chem. Eng. Data* **2008**, *53*, 1846–1853, doi:10.1021/je800177e.
  21. Freitas, S.V.D.; e Silva, F.A.; Pastoriza-Gallego, M.J.; Piñeiro, M.M.; Lima, A.S.; Coutinho, J.A.P. Measurement and Prediction of Densities of Vegetable Oils at Pressures up to 45 MPa. *J. Chem. Eng. Data* **2013**, *58*, 3046–3053, doi:10.1021/je400474w.
  22. AOCS. *Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*; America Oil Chemists' Society: Champaign, IL, 1998.
  23. Siew, W.L.; Tang, T.S.; Tan, Y.A. . *PORIM: Test Methods*; Palm Oil Research Institute of Malaysia: Kuala Lumpur, Malaysia, 1995.
  24. Ansolin, M.; de Souza, P.T.; de Almeida Meirelles, A.J.; Batista, E.A.C. Tocopherols and Tocotrienols: An Adapted Methodology by UHPLC/MS Without Sample Pretreatment Steps. *Food Anal. Methods* **2017**, *10*, 2165–2174, doi:10.1007/s12161-016-0768-z.
  25. Vigli, G.; Philippidis, A.; Spyros, A.; Dais, P. Classification of Edible Oils by Employing <sup>31</sup>P and <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy in Combination with Multivariate

- Statistical Analysis. A Proposal for the Detection of Seed Oil Adulteration in Virgin Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5715–5722, doi:10.1021/jf030100z.
26. De Graef, V.; Dewettinck, K.; Verbeken, D.; Foubert, I. Rheological Behavior of Crystallizing Palm Oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2006**, *108*, 864–870, doi:10.1002/ejlt.200600102.
  27. España, M.D.; Mendonça, S.; Carmona, P.A.O.; Guimarães, M.B.; da Cunha, R.N.V.; Souza, M.T.; Cunha, R.N.V.; Souza, M.T. Chemical Characterization of the American Oil Palm from the Brazilian Amazon Forest. *Crop Sci.* **2018**, *58*, 1982–1990, doi:10.2135/cropsci2018.04.0231.
  28. Braipson-Danthine, S.; Gibon, V. Comparative Analysis of Triacylglycerol Composition, Melting Properties and Polymorphic Behavior of Palm Oil and Fractions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2007**, *109*, 359–372, doi:10.1002/ejlt.200600289.
  29. Gibon, V.; De Greyt, W.; Kellens, M. Palm Oil Refining. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2007**, *109*, 315–335, doi:10.1002/ejlt.200600307.
  30. Sen, C.K.; Khanna, S.; Roy, S. Tocotrienols: Vitamin E beyond Tocopherols. *Life Sciences* **2006**, *78*, 2088–2098, doi:10.1016/j.lfs.2005.12.001.
  31. Codex Alimentarius. *Codex Standard For Named Vegetable Oils CXS 210-1999*; online: <http://www.fao.org/3/y2774e/y2774e04.htm> (accessed on January 2021) .
  32. Danthine, S.; De Clercq, N.; Dewettinck, K.; Gibon, V. Monitoring Batch Lipase Catalyzed Interesterification of Palm Oil and Fractions by Differential Scanning Calorimetry. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2014**, *115*, 2219–2229, doi:10.1007/s10973-014-3645-2.
  33. de Oliveira, G.M.; Badan Ribeiro, A.P.; dos Santos, A.O.; Cardoso, L.P.; Kieckbusch, T.G. Hard Fats as Additives in Palm Oil and Its Relationships to Crystallization Process and Polymorphism. *LWT Food Sci. Technol.* **2015**, *63*, 1163–1170, doi:10.1016/j.lwt.2015.04.036.
  34. Kodali, D.R. Trans Fats: Health, Chemistry, Functionality, and Potential Replacement Solutions. In *Trans Fats Replacement Solutions*; Kodali, D.R., Ed.; AOCS Press: Urbana, Illinois, 2014; pp. 1–39, doi:10.1016/B978-0-9830791-5-6.50006-X.
  35. Foon, C.S.; Liang, Y.C.; Mat Dian, N.L.H.; May, C.Y.; Hock, C.C.; Ngan, M.A. Crystallisation and Melting Behavior of Methyl Esters of Palm Oil. *Am. J. Appl. Sci.* **2006**, *3*, 1859–1863, doi:10.3844/ajassp.2006.1859.1863.
  36. Castro, R.I.; Gallego, J.; García, M.F.; Marican, A.; Forero-Doria, O. Thermal Study and Composition of Edible Oils Combined by TG/DTG Analysis through Predictive Statistical Model. *J. Therm. Anal. Calorim.* **2020**, *1–8*, doi:10.1007/s10973-020-09693-w

**CAPÍTULO 4 - EFFECTS OF THERMAL TREATMENT AND  
BLEACHING ON THE CONCENTRATION OF CAROTENE AND  
OXIDATION PRODUCTS IN PALM OILS**

---

*Artigo a ser submetido a European Journal of Lipid Science and Technology*

## 4 Effects of Thermal Treatment and Bleaching on the Concentration of Carotene and Oxidation Products in Palm Oils

*Erislene S. Almeida<sup>a</sup>, Osorio Carmona, Paula<sup>b</sup>, Mendonça, Simone<sup>b</sup>, Ivanildo José da Silva Júnior<sup>c</sup>, Simone Monteiro<sup>a,\*</sup>*

*<sup>a</sup> University of Brasilia, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, Brasil*

*<sup>b</sup> EMBRAPA Agroenergy, Brasilia, DF, Brazil*

*<sup>c</sup> University of Ceará, Campus do Pici, Fortaleza, Brazil*

**Abstract.** *This work aimed to study the effect of bleaching and heating on carotene concentration and oxidation products in palm oil. Palm oils from two different species were bleached with different adsorbents. Then, bleached and crude palm oils were submitted to heating under controlled conditions. A strong influence of temperature on the formation of dienes and trienes, secondary oxidation products, was observed. The studied bleaching earth presented a noticeable difference in the formation of dienes and trienes. The influence of acid and neutral bleaching earths on the final concentration of carotenes in bleached oil was determined; both earths removed more carotenes from the APO. Finally, the higher the carotene thermal degradation and the higher the carotene removal by adsorption, the greater the oxidation observed in the oil.*

**Keywords:** *oxidation; vegetable oils; refining; carotene.*

## 4.1 Introduction

In everyday and industrial use, there are several situations in which vegetable oils are submitted to high temperatures. For instance, before it is ready for human consumption, crude palm oil (CPO) undergoes a refining process that aims at removing compounds such as phospholipids, free fatty acids, oxidation products, pigments, metals and other undesirable components <sup>1</sup>. CPO refining consists of bleaching (at temperatures about 100 °C) and deacidification/deodorization (at temperatures ranging from 150 °C to 260 °C and pressure lower than 5 mmHg )<sup>1,2</sup>. The main purpose of the bleaching process is to remove, by adsorption, metals that catalyze the oxidation process, and deodorization is to remove free fatty acids and other volatile compounds <sup>1</sup>.

The thermal stress in which vegetable oils are submitted during refining accelerates oxidative reactions, leading to primary and secondary oxidation products. Combining the high temperatures employed in the refining processes, the possible presence of unsaturated fatty acids and metals would make the oxidative reaction even more critical.

Oxidative reactions can be catalyzed by exposure to light, heat, enzymes, metals, and microorganisms, leading to different processes: photooxidation, thermal oxidation, enzymatic oxidation or autoxidation <sup>3,4</sup>. Photooxidation is the reaction of unsaturated lipids with singlet oxygen while autoxidation with triplet oxygen <sup>5</sup>. The enzymatic oxidation, catalyzed by enzymes and, thus, are highly specific <sup>3</sup>.

The oxidation process can be accelerated at higher temperatures, above 100 °C, called thermal oxidation, which causes an increase in the contents of free fatty acids and polar matter, foam, color and viscosity <sup>4,6</sup>. Unsaturated fatty acids are often affected by such reactions. It has been accepted that both autoxidation and thermal oxidation of unsaturated fatty acids occurs through a free radical chain reaction that proceeds through three steps, called initiation, propagation, and termination <sup>4</sup>.

Autoxidation, the most common oxidation mechanism, consists of a free-radical chain reaction of lipids through free radical reactions, also called lipid peroxidation<sup>3,5</sup>. The autoxidation of lipids mainly generates hydroperoxides and volatile compounds, such as aldehydes and ketones<sup>7</sup>. For lipids containing C = C bonds, the autoxidation phase consists of removing hydrogen from atmospheric oxygen, forming the free radical, which is stabilized by the displacement of the conjugated double bond<sup>8,9</sup>. In the propagation phase, the free radical formed reacts with O<sub>2</sub> forming the peroxy radical, which acts by removing hydrogens from other fatty acids. In the termination phase, a non-radical species is formed from the two radical species. The speed of autoxidation depends on the number of double bonds present in the molecule<sup>10</sup>, as unconjugated double bonds are more reactive<sup>11</sup>. Oxidation reactions form conjugated double bonds, forming dienes and trienes, which strongly absorb at 232 and 268 nm, respectively<sup>10</sup>.

Light /ionizing radiation and metal ions, or high temperatures (such as those used during deep frying and refining), catalyzes autoxidation<sup>4</sup>. Additionally, some bleaching earths used during bleaching, mainly those acid activated, may catalyze oxidation by forming conjugated dienes and, later, conjugated triene<sup>10,11</sup>. In addition, the acidic and catalytic activity of those adsorbents can also lead to the decomposition of hydroperoxide into aldehydes and ketones<sup>12</sup>.

The autoxidation propagation phase may be postponed by the presence of antioxidants naturally occurring in vegetable oil, such as carotenes and tocopherols<sup>13</sup>. These compounds interrupt the reaction stabilizing the free radical generated during the initiation phase<sup>14</sup>, directly interfering with the oxidative stability of the oil. The combination of these antioxidants results in synergistic action<sup>15</sup>.

The antioxidant activity of carotenoids is due to a large amount of conjugated double bonds, which creates a rich environment in electrons. It gives these compounds the



ability to be efficient antioxidants <sup>1</sup>. The antioxidant activity of carotenoids is due to their ability to quench singlet oxygen and deactivate free radicals in the absence of singlet oxygen.<sup>16,17</sup> However, under certain conditions, such as high temperatures, some carotenes may also show pro-oxidant activity <sup>18</sup>. Also, they may undergo a thermal degradation process, as happens during the refining step called deodorization <sup>2</sup>. The antioxidant activity of  $\beta$ -carotene exhibits a strong dependence on oxygen concentration: at low oxygen pressure,  $\beta$ -carotene acts as a chain-breaking antioxidant, while with increasing oxygen pressures, it is readily autoxidized and exhibits behavior pro-oxidant <sup>19 20</sup>. In the case of tocopherols, the antioxidant activity is due to the stabilization of the radical that occurs because they behave as an electron donor that breaks the chain by competing with the substrate for the peroxy radicals that carry the chain, normally present in higher concentrations in the lipid system <sup>6</sup>.

The type of bleaching earth may be involved in the oil oxidation process <sup>21</sup>. Acid bleaching earth has acidic sites, which can bind to specific molecules <sup>22</sup>. Acid bleaching earths act as an acid catalyst, adsorptive agent, cation exchanger <sup>23</sup>. Studies point out that these earths can convert precursors present in the oil into conjugated dienes and conjugated trienes <sup>22</sup>. In addition, the acidic and catalytic activity of this earth can also lead to the decomposition of hydroperoxide, forming, in addition to the conjugated polyenes already mentioned, by-products such as aldehydes and ketones <sup>23</sup>.

In this sense, this work aims to evaluate the influence of different bleaching earths on the oil oxidation of palm oil, a vegetable oil with high antioxidant content.

## 4.2 Material and Methods

### 4.2.1 Material

Commercial crude oils obtained from two different oil palm – *Elaeis guineensis* and the interspecific hybridization of *Elaeis guineensis* x *Elaeis oleifera*, here so-called African (APO) and Hybrid palm oil or Palm Oil with Higher Oleic Content (HOPO), respectively – were kindly supplied by Denpasa (Santa Bárbara do Pará, PA, Brazil). The adsorption experiments were performed using two types of commercial bleaching earth widely used in the vegetable oil industry: the acid-activated adsorbent (ABE) Tonsil OPT 210 FF, manufactured by acid activation of calcium bentonite, which was kindly provided by Clariant (Germany); the neutral adsorbent (NBE) Pure Flo B 80, composed by bentonite, that was kindly supplied by Oil Dri (USA). Moreover, it was tested three adsorbents synthesized by Adsorption Separations Research Group (GPSA), of the Federal University of Ceará: LDH (Layered Double Hydroxide), PCH (Porous clay heterostructures) and sepiolite. Their synthesis and characterization are described elsewhere <sup>17,18,24</sup>.

Layered double hydroxides (LDH) are anionic clays, which can be found in nature or can be synthesized <sup>24</sup>. são minerais com capacidade de troca aniônica, em contraste com os minerais de argila mais comuns <sup>25</sup>. They are minerals with anion exchange capacity, in contrast to the more common clay minerals <sup>26</sup>. The PCH used in this work was prepared from natural montmorillonite, with an incorporation of zirconium in the pillars during the synthesis <sup>26</sup>. These materials consist of silica pillars sandwiched between layers of clay. The intercalation process gives rise to materials with greater thermal and hydrothermal stability, significant surface acidity and ion exchange property <sup>26</sup>. Sepiolite is a fibrous mineral clay silicate, a characteristic that differs from common layer silicates and has fine channels parallel to the fiber axis <sup>27,28</sup>. It is a material that has a significant ability to adsorb

colored pigments due to its large specific surface area and porosity <sup>27</sup>. The adsorption properties of sepiolite are closely related to purity, pore structure, surface groups and surface charges.

#### 4.2.2 Analysis

Thermal degradation was evaluated by the formation of conjugated dienes and trienes and by the degradation of total carotenes and the percentage of degraded carotenes. Primary and secondary oxidation was evaluated by measuring the peroxide and p-anisidine value, respectively (AOCS official methods: Cd 8-53 and Cd 18-90) <sup>13</sup> and the total oxidation, TOTOX, which is obtained by the expression  $2 \times (\text{peroxide value}) + \rho\text{-anisidine}$  <sup>13</sup>. The deterioration of the bleaching index (DOBI) was measured using a UV-vis spectrophotometer. DOBI is a good test to assess the quality of a crude palm oil, as it informs the initial oxidation state of the oil <sup>29,30</sup>. This index corresponds to the spectrophotometric absorbance rate at 446 nm (maximum unoxidized carotenes) for the absorbance at 268 nm (maximum oxidized carotenes) of crude oil diluted in hexane <sup>31</sup>. Conjugated dienes and trienes were determined by UV-vis spectrometry at 232 and 268 nm, respectively, in oil samples diluted in iso-octane (AOCS Official method: Ch 5-91) <sup>10</sup>

Total carotenes present in the oil after the bleaching process followed the methodology proposed by PORIM (1990), and was expressed as  $\beta$ -carotene, were determined by UV-vis spectrometry (Varian – Cary 5000) <sup>32</sup>.  $\beta$ -carotene solutions (Sigma Aldrich) were used as the standard to construct the calibration curve.  $\beta$ -carotene solutions (Sigma Aldrich) were used as the standard to construct the calibration curve. Quantification was performed by linear fitting ( $R^2 > 0.9985$ ).

The isomers  $\alpha$ -,  $\beta$ - and 9-cis- $\beta$ -carotene isomers were quantified by HPLC. The analysis was performed with samples of raw HOPO and APO and bleached <sup>33</sup> HOPO, at 3 temperatures, with 2.5 and 5% of commercial adsorbents using. Chromatographic analyses were performed using HPLC (Agilent 1290 Infinity LC) equipped with a quaternary pump, degasser, equipped with a diode array detector (G4212A), set for data acquisition at 450 nm, autosampler and column oven. Chromatographic separation of the compounds followed what was proposed by Carmona et al. (2018) <sup>34</sup>. The injection volume was 10  $\mu$ L. The total time of the chromatographic run was 55 minutes. The retention times of alpha-, beta- and 9-cis-beta-carotene were 34.848; 38.425 and 40.150 min, respectively. Commercial standards (Sigma Aldrich) and spectral data were used to identify carotenoid peaks. The 9-cis  $\beta$ -,  $\beta$ - and  $\alpha$ -carotene isomers were quantified using calibration curves. The results were expressed in  $\mu$ g of carotenoids per g of oil.

### **4.2.3 Experimental procedure**

#### *Batch adsorption (bleaching)*

Conditions similar to industrial bleaching were replicated on a lab scale to study the effect of different types of bleaching earths on oxidation product formation and carotenes removal. Oil samples were bleached using the methodology proposed by Silva et al.(2014) <sup>35</sup>. The bleached oils were analyzed for formation of dienes and trienes, total carotenes and isomers of carotenes remaining in the bleached oil: commercial adsorbents were worked at temperatures of 90, 105 and 19 °C and with different concentrations of bleaching earths, ranging from 2.5, 3.0 and 5.0%; with LDH, PCH and sepiolite, the tests were carried out using 3% of adsorbent and a temperature of 105 °C.

### *Thermal Degradation*

In each test, 50 g of crude palm oil was placed into 100 mL Erlenmeyer flasks. Then, the following steps were performed: addition of 0.03% w/w of citric acid (to chelate metals), as a 30% w/w aqueous solution; high shear mixing at 20,000 rpm during 1 min to allow contact between aqueous and oil phases (mixer, Turratec, Tecnal, Brazil). Then, Erlenmeyer was closed with a cotton swab, through which nitrogen was purged into the oil for approximately 5 minutes.

The methodology for studying oil thermal degradation kinetics for HOPO and APO oils was adapted from the literature <sup>36</sup>. This system was placed over a heating plate for approximately 225 minutes with a continuous nitrogen purge. The oil temperature was monitored, and the experiment lasted until the oil temperature reached 210 °C. Throughout the experiment, oil fractions (approximately 0,1 g) were collected at 150, 165, 180, 190, 200 and 210 °C. Samples were analyzed regarding conjugated dienes and trienes, and total carotenes, both by UV-vis spectrometry, for UV reading approximately 0.04 mg of sample was solubilized in 10 mL of hexane,  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes by HPLC, for HPLC analysis approximately 0.04mg of sample was solubilized in 1 mL of acetone.  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes were quantified in these samples. Chromatographic analyzes were performed with oil fractions subjected to heating, collected at 150, 165, 180, 190, 200 and 210 °C, according to the methodology proposed by Almeida et al. (2021)<sup>37</sup>. The concentration of  $\alpha$  and  $\beta$ -carotenes in the oil was determined through a calibration curve with their respective standards. The amount of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene degraded was obtained by difference, as described in the total carotenes methodology.

## 4.3 Results and Discussion

### 4.3.1 Oil quality characterization

The oils showed good DOBI value <sup>29,38</sup>. Three for HOPO and APO with 1.9. This data provides information on the oxidation status of crude palm oil; it is obtained from the numerical ratio of  $\beta$ -carotene (pro-vitamin A) and its secondary oxidation products <sup>39</sup>. Peroxide values (PV) were 6.6 and 10.0 meq/kg for HOPO and APO, respectively, which is in accordance with the Codex Alimentarius Standard for cold-pressed oils (<15 meq/kg) <sup>31</sup>. P-anisidine values were 10.0 and 6.9 for HOPO and APO oils, respectively. The p-anisidine value measures the content of aldehydes generated during the decomposition of hydroperoxides. It is well established that more unsaturated oils are less stable to oxidation reactions. So, besides both oils being at initial oxidation state as preconized by the Codex Alimentarius. High oxidized crude palm oil is known to have poor bleachability, requires more bleaching earth and severe refining conditions, and is avoided by refiners <sup>1</sup>.

TOTOX calculated for the two oils was 23.2 for HOPO and 26.9 for APO. TOTOX gives the total oxidation value of the oil, and is obtained by adding twice the peroxide value plus the p-anisidine value, providing a good overall oil quality parameter better than the isolated peroxide and anisidine values <sup>13</sup>, as it allows to correlate the level of peroxides and aldehydes, representative of the effective deterioration state <sup>4</sup>. Considering the crude oils, APO is slightly more oxidized than HOPO, as expected, as considering the peroxide value and TOTOX, which relates the peroxide value and  $\rho$ -anisidine, of both APO oils has a slightly higher value.

In Figures 4-1a and b, it is possible to observe the UV-Vis spectrum and the formation profile of dienes and trienes, 232 nm and 268 nm, respectively, in crude HOPO

and APO after bleaching with commercial adsorbents ABE and NBE. The presence of dienes in oils is linked to the formation of primary oxidation products due to the oxidation of polyunsaturated fatty acids to hydroperoxides. The unconjugated double bonds of unsaturated lipids undergo rearrangement to form dienes<sup>11,19</sup>, presenting intense absorption in 232nm<sup>4</sup>. Trienes occur when polyunsaturated fatty acids containing more than three double bonds undergo oxidation, and the conjugation can be extended to include another double bond<sup>31,40</sup>, conjugated trienes absorb at 268 nm<sup>4</sup>. There are different techniques for detecting these oxidation products, but ultraviolet detection has advantages, as it is simple, fast, requires a small amount of sample<sup>4</sup>. Considering the commercial adsorbents, ABE and NBE both showed a good ability to remove carotenes for both APO and HOPO.

Regarding the formation of dienes and trienes, there was a direct relation of peaks intensity at 232 and 268 nm and temperature. As can be seen, the smallest peaks are related to experiments carried out at 90 ° C and the largest to those carried out at 120 ° C. As a product of oil oxidation, the formation of dienes and trienes is potentiated by heating<sup>12,26</sup>. An increase in UV absorption in the 232 and 268nm regions is indicative of the formation of oxidation products<sup>4</sup>.

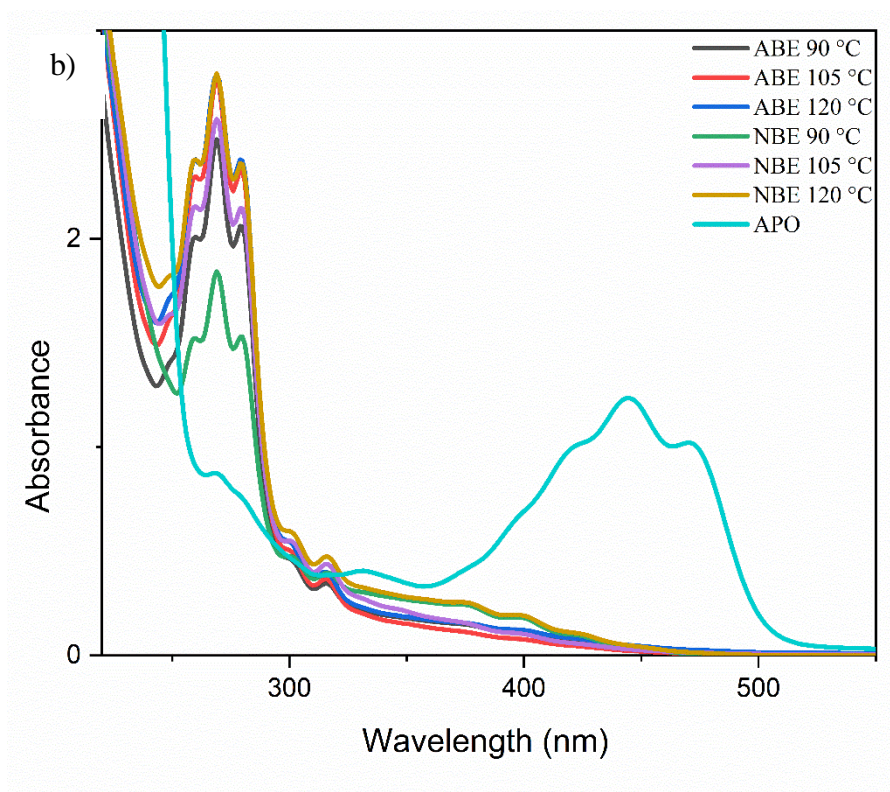
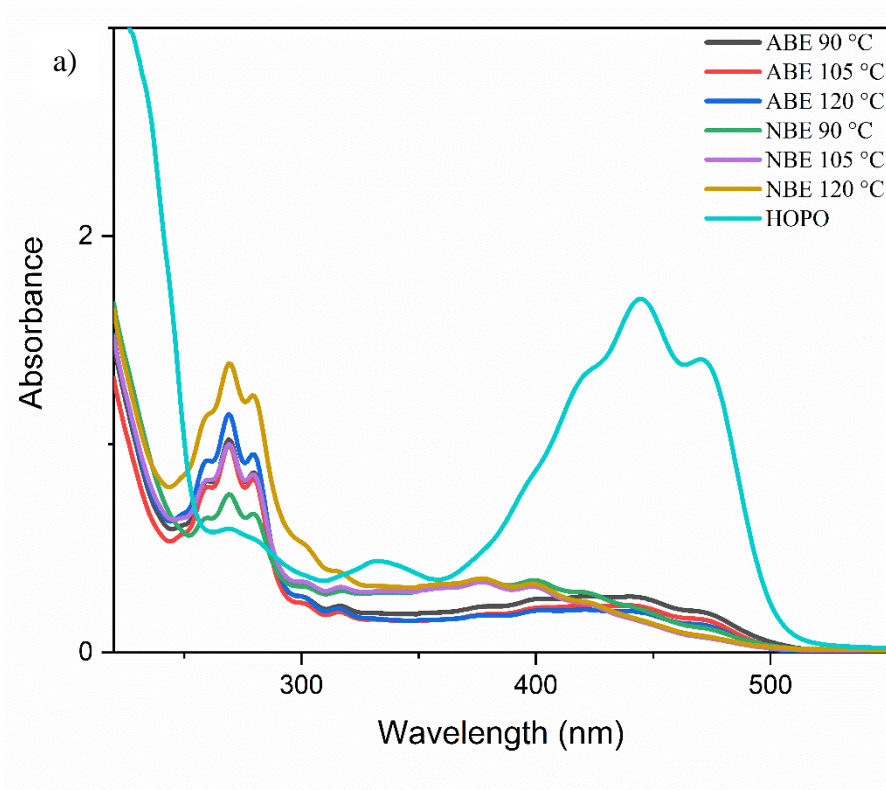
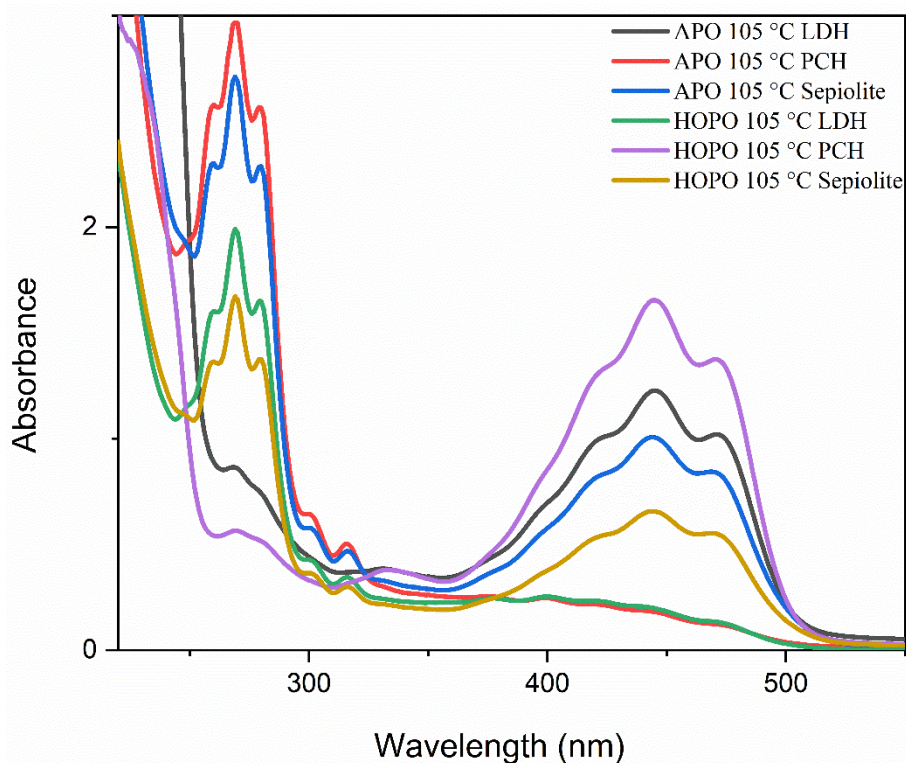


Figura 4-1: Uv-vis absorption spectrum of crude a) HOPO b) APO and after the addition of carotenes by ABE and NBE adsorbents



Regarding the HOPO, the observations regarding the temperature of the experiments and peak intensity in the region of 230 to 270 nm are also applied. When comparing the APO and HOPO, there is a considerable difference between the absorbance values obtained for the two oils. Higher absorbance values at 232 nm indicate higher peroxide content and early stage of oxidation<sup>40</sup>. It is possible to correlate conjugated dienes and peroxide value, and APO has a higher peroxide value. Furthermore, the HOPO presented lower absorbance, possibly due to the higher concentration of carotenes and tocopherols in oil (antioxidants). The presence of antioxidant compounds during the heating of the oil slows the formation of conjugated dienes and trienes<sup>40</sup>.

Figure 4-2 presents the spectra of HOPO and APO bleached with LDH, PCH and Sepiolite, adsorbents first used to bleach palm oil in this work. Firstly, as those adsorbents are not traditionally used for bleaching, the region between 400 to 500 nm was studied to evaluate carotene removal. The PCH showed a performance comparable to commercial adsorbents to remove carotenes, i.e., signal extinction due to considerable carotene adsorption.



*Figura 4-2: APO and HPO UV-vis spectra after carotene adsorption onto LDH, PCH and Sepiolite.*

Oil bleached with LDH adsorbent showed lower than carotene removal, with the maintenance of carotene typical spectra of maximum absorption at 450 nm and shoulders at 425 and 477 nm. The PCH present pore volume almost twice higher than LDH,  $0.77 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  for PCH against  $0.45 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$  for LDH, in addition to a larger surface area,  $644 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  and  $74 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$  for PCH and LDH, respectively, [26] [28], which explains the greater amount adsorbed of the PCH. Furthermore, LDH is an anionic material, while PCH is a cationic clay<sup>26</sup> and sepiolite has been reported to adsorb cationic dyes<sup>41</sup>. Carotenes, when undergoing a degradation process, in a polar environment form a peroxy anion and a cation, which is then transformed into a radical carotenoid cation<sup>35</sup>. Carotene in palm oil are in a non-polar oily matrix, the negative sites of bleaching earths can form a polar layer close to its surface, supporting reactions associated with polar environments, allowing sites with a negative charge to adsorb these cations<sup>35</sup>, causing cationic compounds to be

preferentially adsorbed. Sepiolite showed intermediate performance between LDH and PCH.

Almeida et al. (2019)<sup>42</sup> extensively studied carotenes adsorption by ABE and NBE. The authors observed a higher carotenes adsorption by ABE and attributed this to the higher pore size and surface area. The works of Aguiar et al. (2017)<sup>26</sup> and Gondim et al.(2018)<sup>24</sup> determined the structural properties of LDH synthesized using the same methodology used in this work. The PCH presents pore volume almost twice higher than LDH. Thus, those results corroborate those found in the literature correlating adsorbent pore size with carotene adsorption.

Regarding oxidation products, an inverse correlation of intensity of peaks in the region was observed from 230 to 270 nm and carotene removal. The PCH, which presents the better carotene removal, also presented the higher peak at the oxidation products region. On the other hand, LDH presented a poor carotene removal and did not present a signal in this region. Similarly, sepiolite showed intermediate behavior between PCH and LDH. Carotenes are potent antioxidants, and those results suggest that their presence is important to avoid oxidation reactions during bleaching. B-carotene, which is one of the main carotenes found in palm oil, can protect lipids from oxidation as it reacts with peroxy radicals forming a radical stabilized by resonance, inhibiting propagation reactions and promoting the breakdown of oxidation reactions in the chain<sup>43,44</sup>

Moreover, as previously explained, a low carotene removal may not mean poor adsorbent performance. If good phosphorus and iron removal occur without oxidation reactions, the carotenes may be further degraded in the subsequent process of deacidification<sup>1</sup>. This phenomenon is industrially known as heat bleaching<sup>38</sup>.

Thus, the results show that further testing would be necessary to determine the performance of LDH adsorbent on the removal of other compounds and to be able to evaluate its capacity as adsorbent not only for LDH but also for PCH and Sepiolite.

### **4.3.2 Carotenes removal by adsorption**

Total carotene content was 431 and 954 mg/kg for crude APO and HOPO, respectively (Table 4-1). After processing with LDH, it can be observed for both APO and HOPO that the carotenes adsorbed were less than 5%. Still, there was a slight alteration. But there was just a subtle alteration in dienes and trienes region, 232 and 268 nm, Figure 4- 2. Sepiolite adsorbed between 20 and 50% of carotenes. Those results are in accordance with previous studies on carotenes removal by adsorption. Sabah et al. (2007) <sup>45</sup>, using acid-activated sepiolite, removed about 95% of canola oil of  $\beta$ - carotene under optimized bleaching conditions. PCH adsorbed more than 85 % of carotenes from both palm oils. No experimental data were found in the literature using PCH for vegetable oil purification processes.

The following behavior was observed independently of the used adsorbent: a fewer carotenes left in the bleached oil, the higher the intensity of the peaks in the dienes and trienes region. These results confirm the action of carotenes as an antioxidant agent during oil processing <sup>4</sup>. The temperature influenced the formation of oxidation products. It was also observed that the HOPO had a lower formation of oxidation products, possibly due to the higher presence of carotenes. Regarding the influence of adsorbents on the formation of dienes and trienes, it is necessary to perform new tests with different concentrations of adsorbents, as they may also act as pro-oxidants under some conditions.

*Table 4-1: Total carotene content and adsorbed on HOPO and APO, bleached crude oils, considering different types of adsorbents and worked temperatures (Total carotene: APO 451.3 and HPO 934.3mg/Kg)*

Adsorbent	Total Carotene (mg/Kg)		% Adsorbed Carotene	
	PORIM (1990) <sup>32</sup>		APO	HOPO
	APO	HOPO		
LDH	431.15	954.30	0.56	2.08
PCH	62.42	914.38	85.70	88.08
Sepiolite	346.50	111.28	20.64	54.45
ABE 90 °C	12.83	425.31	97.06	78.25
ABE 105 °C	7.29	203.08	98.33	81.78
ABE 120 °C	18.05	170.11	95.87	84.20
NBE 90°C	11.45	147.53	97.98	84.15
NBE 105°C	10.09	148.01	97.69	89.12
NBE 120°C	15.29	101.64	96.5	88.42

### 4.3.3 Oxidation during heating treatment

A difference was observed in the dienes and trienes region (232 to 268 nm). The APO formed a different peak profile, with only the one in the 268 (triene) steeper region, and the 'shoulders' formed before and after this was less evident. This fact was not observed in the bleached HOPO, Figure 4.4 and b. A possible explanation would be some compound in the African crude oil that was not present in the bleached oil because it was removed by adsorption. It was also possible to observe the higher signal intensity in the region between 230 and 270 nm for the APO compared to the HOPO, as was observed in the bleached oil. These differences were not observed for the HOPO.

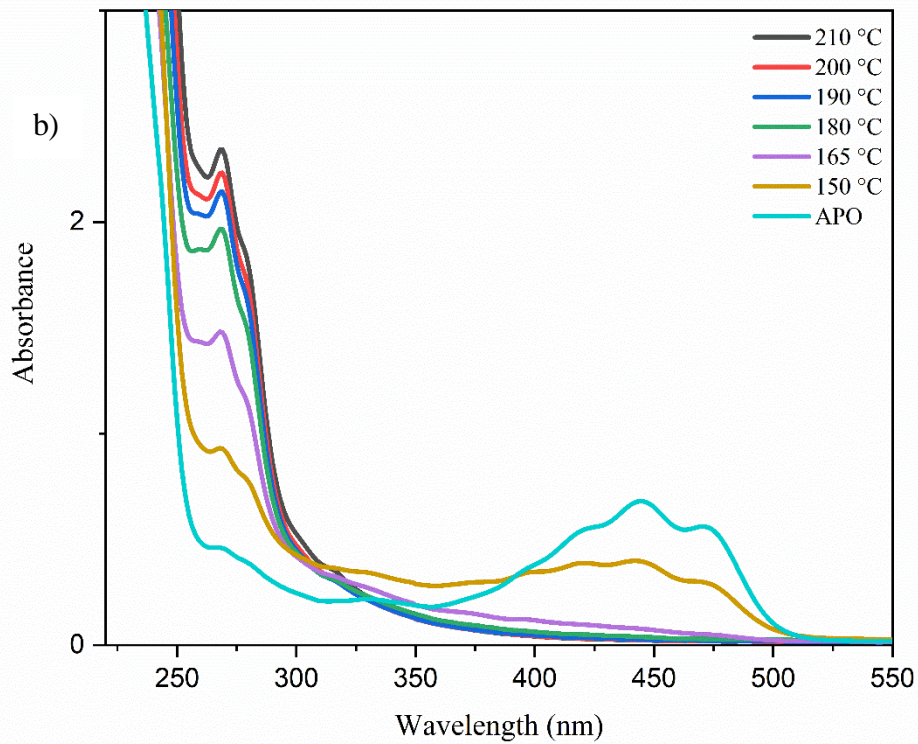
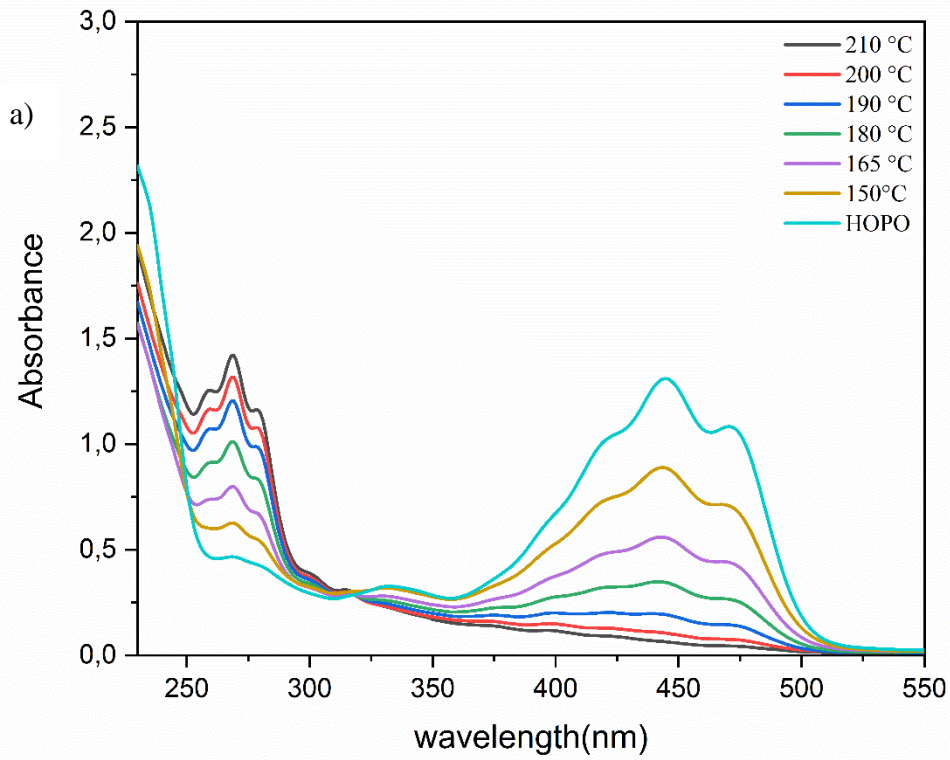


Figura 4-3: Heated oils. Comparison between HOPO (a) and APO (a) concerning the total carotene content remaining in the oil and formation of dienes and trienes



#### 4.3.4 Thermal degradation of carotenoids

Carotenes present in APO were more sensitive to heating than those in HOPO. At 150 °C, there was already a degradation greater than 95% of both  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene (Figure 4.4 and Table 4-2). In HOPO, however, degradation was more accentuated at temperatures above 190 °C. The heating of the oil leads to the thermal degradation of the carotene<sup>18</sup>, forming other carotenoid compounds. For example, the formation of oxidized carotenes such as apocarotenoids, *cis* isomers, epoxides may occur<sup>46,47</sup>.

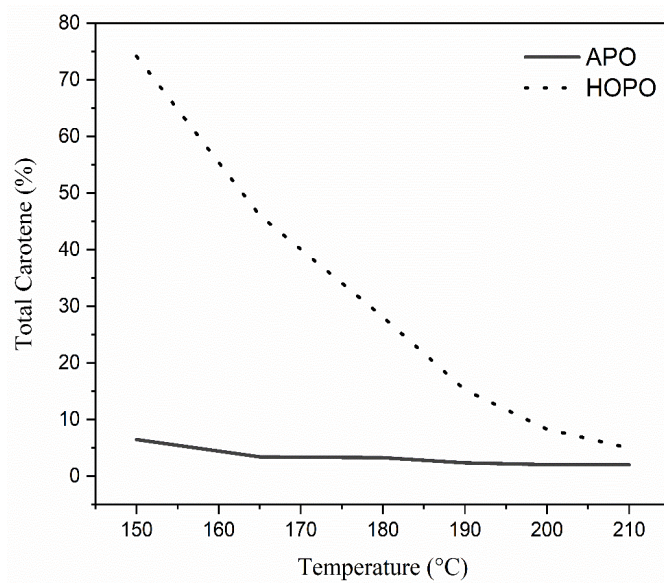


Figura 4-4: Carotenes remaining in the HOPO and APO after heating (150 to 210 °C)

Table 4-2: Degradation of carotenes from African (APO) and hybrid (HOPO) palm oils submitted to heating in a nitrogen atmosphere. The results of carotenes are expressed as a percentage of total carotenes and  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes remaining in the oil after heating

Temperature (°C)	Total carotene (%)	[ $\alpha$ ] (%)	[ $\beta$ ] (%)
APO			
25	100*	100**	100***
150	6.53	1.51	4.13
165	3.45	ND <sup>1</sup>	ND
180	3.29	ND	ND
190	2.37	ND	ND
200	2.06	ND	ND
210	2.05	ND	ND
HOPO			
25	100*	100**	100***
150	74.14	7.82	50.48
165	46.05	4.44	27.45
180	28.13	2.69	13.76
190	15.25	1.84	5.96
200	8.31	0.98	0.81
210	4.99	0.69	0.00

\* 100% carotene: 431.15 and 954.3mg/Kg for APO and HOPO, respectively; \*\*100%  $\alpha$ -carotene: 50.62 and 59.0.3 mg/Kg for APO and HOPO, respectively; \*\*\* 100%  $\beta$ -carotene: 379.8 and 504 mg/Kg for APO and HOPO, respectively; <sup>1</sup>ND: Not detected

Table 4-2 shows that the carotenes present in APO were more sensitive to heating than those in HOPO. At 150 °C, there was already a degradation greater than 95% of both  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene. In HOPO, however, degradation was more accentuated at temperatures above 190 °C. The heating of the oil leads to the thermal degradation of the carotenes <sup>18</sup>, forming other carotenoid compounds. For example, the formation of oxidized carotenes such as apocarotenoids, cis isomers, epoxides may occur <sup>46,47</sup>. Even though the HPLC analyzes indicate that  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes are not detectable in the heated oils, the UV-Vis analysis shows that there are remaining carotenes (Table 4.2). This behavior can be



explained by the fact that the UV-vis analysis is less specific than chromatographic and can detect other species of carotenoids, such as isomers, carotene oxidation products. It should be remembered that HPLC analysis is highly specific, the method developed and the available standards only allowed to quantify  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes. Therefore, these residual carotenes quantified by UV-vis can be other types of carotenes that have undergone, for example, an oxidation or epoxidation process. In this work the oxidized products of B-carotene were not identified

#### 4.3.5 Carotenoid isomers quantification in bleached oil

The *trans* configuration is the most common in carotenoids in nature <sup>43</sup>. Because they are highly unsaturated molecules, carotenoids are subject to oxidation and *cis/trans* isomerization, reactions that can be catalyzed by contact with acids, heat treatment, exposure to light and adsorption on an active surface <sup>43,44</sup>. As carotenoids present in vegetable oils and other foods are exposed to some of these conditions during storage and processing, it is important to analyze the formation of oxidation products and geometric isomers, such as 9-*cis*-beta carotenes, and adsorption in the concentration of these compounds, mainly because these reactions lead to loss of color and biological activity and the formation of volatile compounds that give desirable or undesirable flavor in some foods <sup>16,44,48</sup>.

The quantification of the  $\alpha$ -,  $\beta$ - and 9-*cis*- $\beta$ -carotene isomers was done in both HOPO and APO. Still, the quantification in oil bleached with ABE and NBE was done only in HOPO. In addition to a higher concentration of the compounds we wish to quantify, previous work by this research group showed that the adsorption profile between the two oils is similar <sup>31</sup>. The chromatograms were obtained according to described chromatographic conditions. The selectivity and specificity for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and 9-*cis*-beta-

carotene are indicated by the sharp and symmetrical peaks, as well as the lack of significant interfering peaks from other oil components<sup>47</sup>. Retention times were 34.8, 38.4 and 40.1 min for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and 9-cis- $\beta$ -carotene, respectively, figure 4-5.

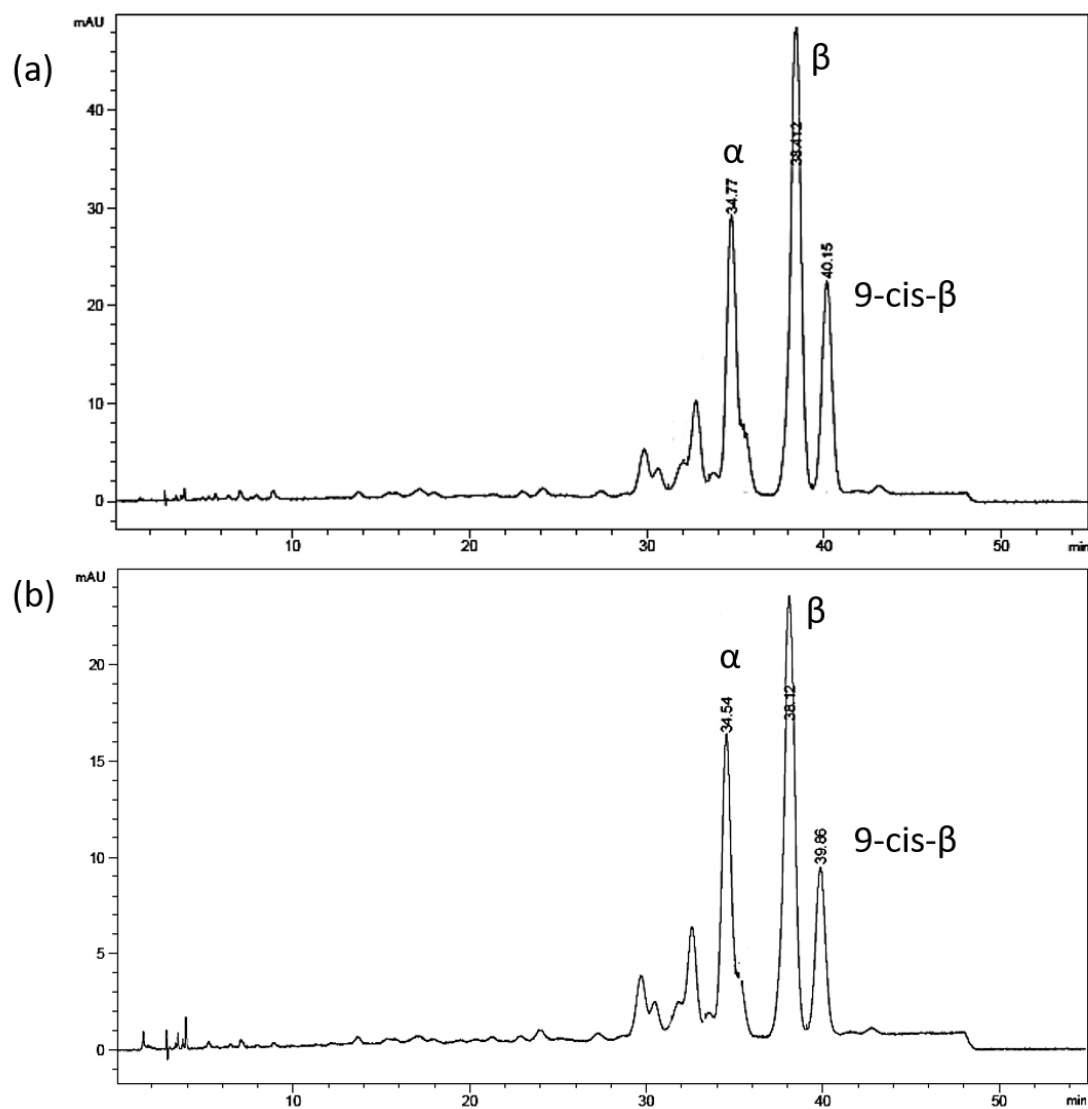


Figura 4-5: Representative chromatogram of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -carotene and 9-cis- $\beta$ -carotene in crude palm oils by HPLC: (a) Hybrid palm oil, (b) African palm oil.

Crude HOPO and APO have the three studied carotene isomers. In APO,  $\beta$ -carotene (193 mg/kg) appeared in the highest concentration, followed by  $\alpha$ -carotene (121 mg/kg) and 9-cis- $\beta$ -carotene (74 mg/kg). Carotenoids of APO are mainly in the forms of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenoids<sup>45</sup>. HOPO presented higher concentrations of all isomers.  $\beta$ -carotene (409 mg/kg)

appeared in the highest concentration, followed by  $\alpha$ -carotene (237 mg/kg) and 9-*cis*- $\beta$ -carotene (184 mg/kg). To the extent of our knowledge, it is the first time that 9-*cis*- $\beta$ -carotene isomers are being quantified in HOPO. 9-*cis*- $\beta$ -carotene may be attributed to heating during the extraction process and storage, as it is one of the most important isomers formed due to high temperatures<sup>49</sup>. Also, the oxidation process by heat and light induces E/Z isomerization<sup>50</sup>. The sum of  $\alpha$ -,  $\beta$ - and 9-*cis*- $\beta$ -carotene were 830 and 388 mg/kg for HOPO and APO, respectively. Those results correspond to approximately 90% of total carotenes measured by UV-vis. The lower specificity of UV/vis spectrometry explains this difference<sup>47</sup> and corroborates that  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes are the main carotenes in palm oil<sup>4</sup>.

This quantitative analysis showed that the acid bleaching earth adsorbed more carotenes for the three studied temperatures than the neutral one (Figure 4-6). The 5% acid adsorbent adsorbed all 9-*cis*- $\beta$ -carotene at all temperatures worked, and at 120 °C the amount of the three isomers was below the equipment limit of detection. In general, this isomer was more adsorbed by both bleaching earths, showing a greater affinity between 9-*cis*- $\beta$ -carotene and the surface of the adsorbents. For the acid adsorbent, at both concentrations and studied temperatures, the  $\beta$ - isomer was more adsorbed than  $\alpha$ -carotene. For the neutral adsorbent, this behavior was only observed in 5% and at temperatures of 105 °C and 120 °C. Comparing the quantity of the isomers present in the crude oil and the bleached oil, considering the acid adsorbent, there was a decrease in the concentration of all the isomers (Figure 4-6) as the temperature increased. The reduction was greater for the 9-*cis*- $\beta$ -carotene isomer, followed by the  $\beta$ -carotene and, finally,  $\alpha$ -carotene (for both 2.5% and 5% adsorbent). It was also observed that the concentration reduction by NBE was less accentuated. 9-*cis*- $\beta$ -carotene was also more adsorbed at all temperatures and concentrations tested, followed by  $\beta$ - and  $\alpha$ -carotene. Thus, there was higher adsorption at higher temperatures and adsorbent concentrations.

The acid adsorbent showed better results, showing that the studied bleaching earth present different capacities for removing the carotene isomers. The direct implication of this different adsorption capacity is the final color of the oil. According to GURAK et al. (2014)<sup>50</sup>, the color of carotenoids depends on their chemical structure, concentration and interaction with other molecules. It is worth mentioning that, according to RIBEIRO et al. (2018)<sup>38</sup>,  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes are not detected in fully refined oils, and the final color is mainly due to compounds derived from oxidation reactions, especially carotenoids.

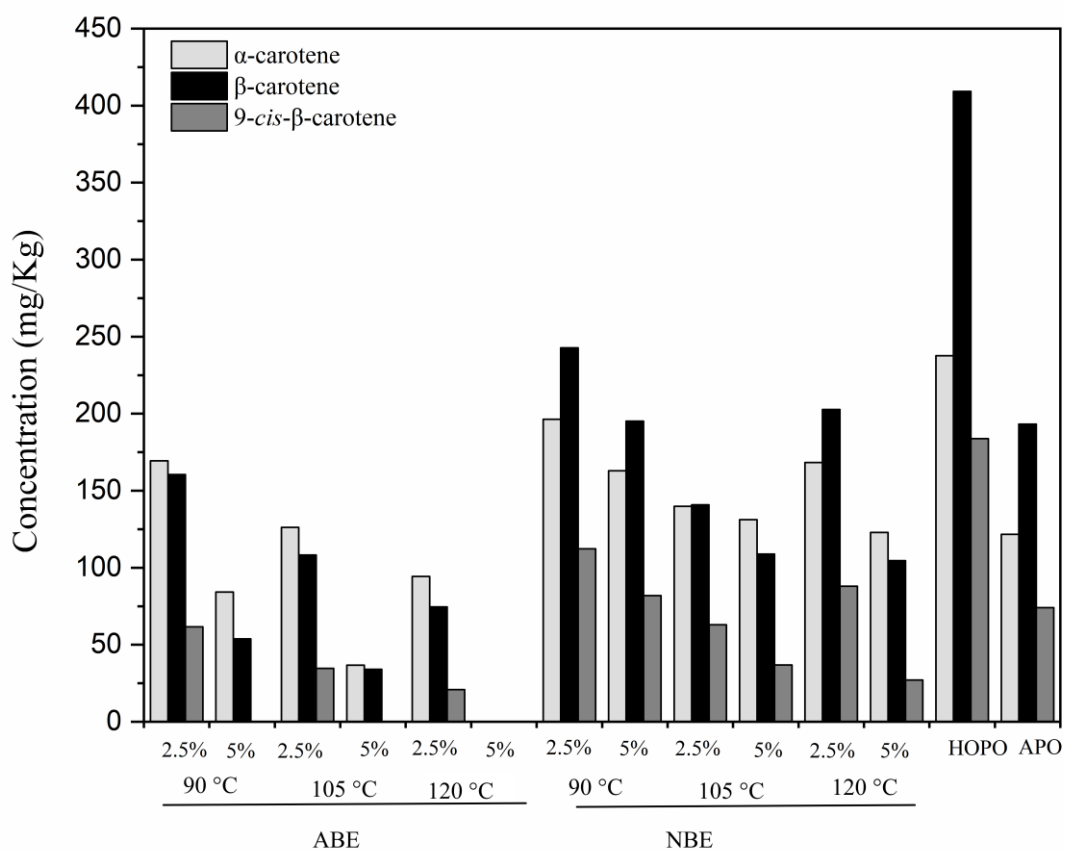


Figura 4-6: Carotenes adsorption for oil without pre-treatment, crude HOPO and APO, and oils bleached at 90 °C, 105 °C and 120 °C in 2.5% adsorbent and 5% ABE and NBE

## 4.4 Conclusion

From the five tested adsorbents, four were capable of removing carotenes from crude palm oil. The only exception was LDH since it adsorbed less than 5% of the total carotenes present in the oil. A correlation was observed between oxidation products and carotenes concentration in the liquid phase after the adsorption process, showing the importance of these compounds to protect the oil from oxidation during the bleaching temperatures. It is fundamental to perform further experiments for metal removals to evaluate the efficiency of adsorbents as bleaching earth thoroughly. Chromatographic analyzes also showed that the acid adsorbent adsorbs more carotenes from palm oil in the two types of chromatographic study, even in different bleaching earths concentrations and at different temperatures.

## References

1. Gibon, V., De Greyt, W. & Kellens, M. Palm oil refining. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **109**, 315–335 (2007).
2. De Greyt, W. & Kellens, M. Deodorization. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (2005) doi:<https://doi.org/10.1002/047167849X.bio027>.
3. Shahidi, F. & Zhong, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem. Soc. Rev.* **39**, 4067–4079 (2010).
4. Shahidi, F. & Zhong, Y. Lipid Oxidation: Measurement Methods. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (2005) doi:<https://doi.org/10.1002/047167849X.bio050>.
5. Wu, Y. *et al.* Influence of photooxidation on the lipid profile of rapeseed oil using UHPLC-QTOF-MS and multivariate data analysis. *Anal. Methods* **11**, 2903–2917 (2019).
6. Frankel, E. E. *Lipid Oxidation*. (Oily Press Lipid Library, 2005).
7. Laguerre, M., Lecomte, J. & Villeneuve, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Prog. Lipid Res.* **46**, 244–282 (2007).
8. Zeng, M., Heine, N. & Wilson, K. Evidence that Criegee intermediates drive autoxidation in unsaturated lipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**, 201920765 (2020).
9. D. Julian McClements e Eric A. Decker. Lipídeos. in *Química de alimentos de*

- Fennema* (org. Srinivasan Damodaran, Kirk L. Parkin, O. R. F.) 890 (2010).
10. Schaich, K. M. Lipid Oxidation: Theoretical Aspects. in *In BAILEY'S INDUSTRIAL OIL AND FAT PRODUCTS* (org. Shahidi, F.) (John Wiley & Sons, Ltd, 2005).
  11. Pratt, D. A., Tallman, K. A. & Porter, N. A. Free radical oxidation of polyunsaturated lipids: New mechanistic insights and the development of peroxy radical clocks. *Acc. Chem. Res.* **44**, 458–467 (2011).
  12. Monteiro e Silva, S. *et al.* Effect of type of bleaching earth on the final color of refined palm oil. *LWT - Food Sci. Technol.* **59**, 1258–1264 (2014).
  13. Scrimgeour, C., Gao, Y., Oh, W. Y. & Shahidi, F. *Chemistry of Fatty Acids. Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (2020). doi:10.1002/047167849x.bio005.pub2.
  14. Nogala Kalucka, M. Lipophilic Vitamins. in *Chemical, Biological, and Functional Aspects of Food Lipid* (org. Sikorski, Z. E.) 500 (CRC Press Taylor & Francis Group, 2011).
  15. Wanasundara, P. K. J. P. D. & Shahidi, F. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. in *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (Wiley, 2005). doi:10.1002/047167849X.bio002.
  16. Rodriguez-Amaya, D. B. *A Guide to Carotenoid Analysis in Foods.* (1999).
  17. Shahidi, F., Zhong, Hy. J. & Ambigaipalan, P. Antioxidants: Regulatory Status. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* 1–21 (2020) doi:https://doi.org/10.1002/047167849X.bio035.pub2.
  18. Hambly, A. J., van Duijneveldt, J. S. & Gates, P. J. Identification of  $\beta$ -carotene oxidation products produced by bleaching clay using UPLC-ESI-MS/MS. *Food Chem.* **353**, 129455 (2021).
  19. Palozza, P. Prooxidant Actions of Carotenoids in Biologic Systems. *Nutr. Rev.* **56**, 257–265 (1998).
  20. Ha, D.-O., Park, C. U., Kim, M.-J. & Lee, J. Antioxidant and prooxidant activities of  $\beta$ -carotene in accelerated autoxidation and photosensitized model systems. *Food Sci. Biotechnol.* **21**, 607–611 (2012).
  21. DIJKSTRA, A. J. Recovering Oil From Spent Bleaching Earth. *INFORM - International News on Fats, Oils, and Related Materials* 52 (2017).
  22. Dijkstra, A. The Lipid Handbook - 3rd edition. *Modif. Process. food uses* 263–354 (2007).
  23. Silva, S. M. *et al.* Effect of type of bleaching earth on the final color of refined palm oil. *LWT - Food Sci. Technol.* **59**, 1258–1264 (2014).
  24. Gondim, D. R. *et al.* Influence of buffer solutions in the adsorption of human serum proteins onto layered double hydroxide. *Int. J. Biol. Macromol.* **106**, 396–409 (2018).
  25. Olf, H.-W., Torres-Dorante, L. O., Eckelt, R. & Kosslick, H. Comparison of different synthesis routes for Mg–Al layered double hydroxides (LDH): Characterization of the structural phases and anion exchange properties. *Appl. Clay Sci.* **43**, 459–464 (2009).
  26. Aguiar, J. E. *et al.* Adsorption study of reactive dyes onto porous clay heterostructures. *Appl. Clay Sci.* **135**, 35–44 (2017).

27. Saneei, M., Goli, S. & Keramat, J. Optimization of oil bleaching parameters, using response surface methodology, for acid-activated sepiolite from Iran. *Clay Miner.* **50**, 639–648 (2015).
28. Tian, G., Wang, W., Kang, Y. & Wang, A. Study on thermal activated sepiolite for enhancing decoloration of crude palm oil. *J. Therm. Anal. Calorim.* **117**, 1211–1219 (2014).
29. Tan, C.-H. *et al.* Changes in oxidation indices and minor components of low free fatty acid and freshly extracted crude palm oils under two different storage conditions. *J. Food Sci. Technol.* **54**, 1757–1764 (2017).
30. Ribeiro, J. A. A., Almeida, E. S., Neto, B. A. D., Abdelnur, P. V. & Monteiro, S. Identification of carotenoid isomers in crude and bleached palm oils by mass spectrometry. *LWT - Food Sci. Technol.* **89**, 631–637 (2018).
31. De Leonardis, A., Cuomo, F., Macciola, V. & Lopez, F. Influence of free fatty acid content on the oxidative stability of red palm oil. *RSC Adv.* **6**, 101098–101104 (2016).
32. PORIM. Test methods: Carotene content. *Palm Oil Res. Inst. Malaysia* (1990).
33. Achir, N., Randrianatoandro, V. A., Bohuon, P., Laffargue, A. & Avallone, S. Kinetic study of  $\beta$ -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **112**, 349–361 (2010).
34. Carmona, P. A. O. *et al.* Effect of Solids Content and Spray-Drying Operating Conditions on the Carotenoids Microencapsulation from Pressed Palm Fiber Oil Extracted with Supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Bioprocess Technol.* **11**, 1703–1718 (2018).
35. Silva, S. M. *et al.* Effect of type of bleaching earth on the final color of refined palm oil. *LWT - Food Sci. Technol.* **59**, 1258–1264 (2014).
36. Sampaio, K. A. *et al.* Thermal Degradation Kinetics of Carotenoids in Palm Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **90**, 191–198 (2013).
37. Almeida, E. S., Carmona, Paula Osorio Mendonça, S., Júnior, I. J. da S. & Monteiro, S. Effects of Thermal Treatment and Bleaching, Similar to Industrial, on the Concentration of Carotene and Oxidation Products in Palm Oils. *Appl. Sci. (in Press)*. (2021).
38. Ribeiro, J. A. A., Almeida, E. S., Neto, B. A. D., Abdelnur, P. V. & Monteiro, S. Identification of carotenoid isomers in crude and bleached palm oils by mass spectrometry. *LWT - Food Sci. Technol.* **89**, (2018).
39. Codex, A. Standard for Named Vegetable Oils CXS 210-1999.
40. Yang, J. H., Tran, T. T. T. & Le, V. V. M. Effects of natural antioxidants on the palm olein quality during the heating and frying. *J. Food Meas. Charact.* **14**, 2713–2720 (2020).
41. Santos, S. C. R. & Boaventura, R. A. R. Adsorption of cationic and anionic azo dyes on sepiolite clay: Equilibrium and kinetic studies in batch mode. *J. Environ. Chem. Eng.* **4**, 1473–1483 (2016).
42. Almeida, E. S. *et al.* Elucidating how two different types of bleaching earths widely used in vegetable oils industry remove carotenes from palm oil: Equilibrium, kinetics and thermodynamic parameters. *Food Res. Int.* **121**, (2019).

43. Zeb, A. Effects of  $\beta$ -carotene on the thermal oxidation of fatty acids. *African J. Biotechnol.* **10**, 15346–15352 (2011).
44. Britton, G., Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H. Special Molecules, Special Properties BT - Carotenoids: Volume 4: Natural Functions. in (orgs. Britton, G., Liaaen-Jensen, S. & Pfander, H.) 1–6 (Birkhäuser Basel, 2008). doi:10.1007/978-3-7643-7499-0\_1.
45. Sabah, E., Çinar, M. & Çelik, M. S. Decolorization of vegetable oils: Adsorption mechanism of  $\beta$ -carotene on acid-activated sepiolite. *Food Chem.* **100**, 1661–1668 (2007).
46. Colle, I. J. P., Lemmens, L., Knockaert, G., Van Loey, A. & Hendrickx, M. Carotene Degradation and Isomerization during Thermal Processing: A Review on the Kinetic Aspects. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **56**, 1844–1855 (2016).
47. Silva, S. M. *et al.* Characterization of Oil Extracted from Buriti Fruit (*Mauritia flexuosa*) Grown in the Brazilian Amazon Region. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **86**, 611–616 (2009).
48. DELIA B. RODRIGUEZ-AMAYA, M. K. *HarvestPlus handbook for carotenoid analysis*. (INTERNATIONAL FOOD POLICY RESEARCH INSTITUTE (IFPRI), INTERNATIONAL CENTER FOR TROPICAL AGRICULTURE (CIAT), 2004).
49. Henry, L. K., Catignani, G. L. & Schwartz, S. J. The influence of carotenoids and tocopherols on the stability of safflower seed oil during heat-catalyzed oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **75**, 1399–1402 (1998).
50. Gurak, P. D., Mercadante, A. Z., González-Miret, M. L., Heredia, F. J. & Meléndez-Martínez, A. J. Changes in antioxidant capacity and colour associated with the formation of  $\beta$ -carotene epoxides and oxidative cleavage derivatives. *Food Chem.* **147**, 160–169 (2014).



**CAPÍTULO 5 - IDENTIFICATION OF CAROTENOID ISOMERS IN CRUDE  
AND BLEACHED PALM OILS BY MASS SPECTROMETRY**

---

Artigo publicado na *LWT – Food Science and Technology*, Vol. 89, March 2018, Pages  
631-637 ISSN: 0023-6438

## 5 Identification of Carotenoid Isomers in Crude and Bleached Palm Oils by Mass Spectrometry

José A. A. Ribeiro<sup>a</sup>, Erislene S. de Almeida<sup>b</sup>, Brenno A. D. Neto<sup>b</sup>, Patrícia V.

Abdelnur<sup>a,c</sup>, Simone Monteiro<sup>b</sup>

<sup>a</sup> EMBRAPA Agroenergia, Brasília, DF, Brazil

<sup>b</sup> Institute of Chemistry, University of Brasília, Brasília, DF Brazil

<sup>c</sup> Institute of Chemistry, Federal University of Goiás, Goiânia, GO Brazil

**Abstract:** *In this work, a method for identification of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene isomers in palm oil samples was developed by UHPLC-MS/MS. The fragmentation patterns of both isomers were studied and a diagnostic ion was assigned to  $\alpha$ -carotene ( $m/z$  388). The developed method was used to identify isomers in crude palm oils from two cultivars (*E. guineensis*, here so-called native oil and *E. guineensis*  $\times$  *E. oleifera*, here so-called interspecific hybrid) and bleached oil with two types of commercial bleaching earths (neutral and acid activated). It was noticed that  $\alpha$ - and  $\beta$ - isomers are present in both crude oils, nevertheless  $\beta$ -carotene is the most abundant. The reduction of  $\alpha$ - and  $\beta$ - isomers in the bleached native oil was very similar after treatment with the two different types of adsorbents. For the interspecific hybrid oil, the acid adsorbent provided a reduction of the two forms, while the neutral adsorbent reduced mostly the  $\beta$ -form.*

**Keywords:** *edible oil refining, color inversion, adsorption,  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene*

## 5.1 Introduction

The oil palm is one of the most important oil crops in the world, due to its high productivity and perennial nature. The oil extracted from the fruits is currently the most consumed vegetable oil (Mozzon, Pacetti, Lucci, Balzano, & Frega, 2013). According to the most recent Statistical Yearbook from the Food and Agriculture Organization of the United Nations (Food and Agriculture Organization of United Nation, 2017), the world production of palm oil exceeded 57 million tons in 2014.

The crude palm oil (CPO), before it is ready for human consumption, undergoes a refining process that aims at removing compounds such as phospholipids, free fatty acids, oxidation products, pigments and other undesirable components. Actually, it is really important to remove carotenoids from palm oil as they are responsible for the dark orange color, that would derail its use in a wide range of food and pharmaceutical products such as ice creams, breads, margarines and cosmetics (Gibon, De Greyt, & Kellens, 2007). The  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes, which are precursors of vitamin A, are the main carotenoids found in CPO (Ng & Choo, 2016). CPO is submitted to a physical refining (Gibon et al., 2007) to avoid a large neutral oil loss, i.e., triacylglycerols. The physical refining comprises an integrated bleaching/degumming followed by a deacidification step. The first one aims to remove phospholipids, by precipitation, and part of carotenoids, via adsorption. The second step removes free fatty acids by volatilization at high temperature (usually above 200 °C) and low absolute pressures (below to 5 mbar). During the deacidification step, the remaining carotenoids are thermally degraded. In fact, some refineries only remove about 20% of carotenoids by adsorption mostly because after 20 min at 240 °C about 98% of carotenoids are destroyed, in a phenomenon known as heat bleaching. After the refining procedures, palm oil becomes a light-yellow oil. However, sometimes the oil color cannot be completely removed. It is well accepted that there is no correlation between carotenoids

content nor color of bleached oil and the color of fully refined palm oil (Gibon et al., 2007; Silva et al., 2014).

A major problem of this procedure is the economic loss because carotenoids are valuable substrates being destroyed during the whole refining process. It is estimated a daily loss enough to meet the world population requirement of vitamin A ingestion (Mayamol, Balachandran, Samuel, Sundaresan, & Arumughan, 2007). Another drawback is the identification and quantification of carotenoid isomers in bleached oils, especially considering they will thermally undergo in varied color intensity by-products during deacidification/deodorization step, which may lead to a dark fully refined oil.

Several studies concerning the  $\beta$ -carotene removal from vegetable oil by adsorption are noted in the literature. For instance, the work carried out by Silva et al. (2013) investigated the total carotenoids removal from palm oil onto commercial bleaching earths under industrial bleaching conditions, meaning high temperatures, low pressures and without solvent. Silva et al. (2014) also studied the effect of different types of bleaching earth on the decolorization over bleached palm oil submitted to deacidification process. Pohndorf, Cadaval Jr, and Pinto (2016) described the removal of total carotenoids from rice bran oil onto commercial acid activated bleaching earth. Moreover, focused on palm oil carotenoids, Mba, Dumont, and Ngadi (2017) studied the thermostability of carotenoids in crude palm oils during deep-fat frying, concerning quality losses. Iftikhar, Tan, and Zhao (2017) studied the enrichment of  $\beta$ -carotene by supercritical extraction. All those previous works have quantified carotenes by UV-vis spectroscopy. This analysis allows solely the total carotenes quantification. So, there is a lack in the literature about how processing may affect different carotenoid isomers.

Carotenoid isomers presents different biological activities (Rodriguez & Rodriguez-Amaya, 2007) and color (Gurak, Mercadante, González-Miret, Heredia, &

Meléndez-Martínez, 2014). Any carotenoid containing an unmodified  $\beta$ -ionone along one polyene chain containing at least 11 carbon atoms may be metabolized to vitamin A (retinol).  $\beta$ -carotene contains two  $\beta$ -ionone ring produces two molecules of retinal, which is then reduced to retinol (Fernández-García et al., 2012). The provitamin A activity is given in relation to  $\beta$ -carotene, which possess 100 % activity,  $\alpha$ -carotene presents only one ring and possess 53 % provitamin A activity. Carotenoids lacking this ring, such as lycopene, are not capable to form vitamin A (Saini, Nile, & Park, 2015), yet they have the ability of quenching singlet oxygen and deactivate free radicals, important to the prevention of certain types of cancer, cardiovascular diseases and macular degeneration (Müller, Caris-Veyrat, Lowe, & Böhm, 2016). The color of carotenoids is related to the number of conjugated double bounds (c.d.b.). It is necessary at least 7 c.d.b. for a carotenoid to have a perceptible color. Moreover, the carotenoids color goes from red to yellow when the values decrease (Meléndez-Martínez, Britton, Vicario, & Heredia, 2007). In this sense,  $\beta$ -carotene presents darker color than  $\alpha$ -carotene. There is also a large dependence of c.d.b. on the absorption spectra: the longer the chromophore, the higher were the wavelengths of maximum absorption (Meléndez-Martínez et al., 2007).

Actually, the study performed by Silva et al. (2014) presents some evidence that the adsorbent used during palm oil bleaching catalyzes the  $\beta$ -carotene isomerization, interfering, therefore, in the color of fully refined palm oil. The authors carried out several fully physical refining procedures (bleaching and deacidification) using different amounts of both neutral (NBE) and acid activated (ABE) bleaching earths. The oil bleached with NBE presented lower total carotenoids content when compared with ABE. The same oil presented darker color after deacidification, showing a lower color reduction due to heat bleaching. The results were found in agreement with the established knowledge that there is no correlation between the carotenoids content after bleaching and the palm oil color

after heat bleaching (Dijkstra & Segers, 2007). Only ABE proved to be efficient to remove secondary oxidation products. Carotenoids are known to be susceptible to oxidation and isomerization reactions as a consequence of their highly unsaturated chain. However, as mentioned above, the authors quantified only the total carotenes remaining in the bleached oil and suggest that the identification of the isomers is fundamental for understanding the color inversion, i.e. the remaining color of fully refined palm oil.

Advancing in the effort of clarifying the color inversion, the goal of this work was to evaluate the carotenoids isomers remaining in oil bleached with different types of adsorbents (acid activated and neutral) with identification of residual carotenoids derivatives by UHPLC-ESI-MS analysis. Furthermore, ESI-MS/MS allowed for a precise identification of main vitamin A precursors.

## **5.2 Material and Methods**

### **5.2.1 Oil Characterization**

Crude oils obtained from two different oil palm – *Elaeis guineensis* and the interspecific hybridization of *Elaeis guineensis* × *Elaeis oleifera*, here so-called native and hybrid palm oil – were kindly supplied by Denpasa (Santa Bárbara do Pará, PA, Brazil). The oil samples were characterized regarding standard quality parameters. Fatty acids profiles were determined by gas chromatography (GC-FID 7890A, HP-88 column [60 m × 0.25 mm × 0.2 μm], Agilent Technologies, USA) according to the official method Ce 1-62 of American Oil Chemists' Society (AOCS, 1998). Free fatty acid (FFA) contents were determined by titration according to the official method Ca 5-40 and results were expressed as percentage of palmitic acid (AOCS, 1998). Total carotene content, expressed as β-carotene, was determined measuring the absorbance at 446 nm of samples homogenized

and diluted in hexane (Spectrophotometer SpectraMax M3, Molecular Devices, USA) (PORIM, 1990).

The deterioration of bleachability index (DOBI) was measured using a UV-vis spectrophotometer. This index corresponds to the ratio of the spectrophotometric absorbance at 446 nm (non-oxidized carotenes maximum) to the absorbance at 268 nm (oxidized carotenes maximum) of crude oil diluted in hexane. At last, the DOBI value is obtained by Eq.1 (De Leonardis, Cuomo, Macciola, & Lopez, 2016).

$$\text{DOBI} = \frac{\text{absorbance at 446 nm}}{\text{absorbance at 268 nm}} \quad (1)$$

DOBI values between 2.5 and 4.0 indicate average to good crude oil quality. Values below 2.0 indicate a poor-quality crude palm oil which is difficult to bleach (Gibon et al., 2007).

## 5.2.2 Chemical Standards

Triglyceride mix (tricaprin, tricaprylin, trilaurin, trimyristin, tripalmitin) and mono-, di-, triglyceride mix (1-monoolein, 1,2-diolein, 1,3-diolein, triolein) were purchased from Supelco (USA). *Trans*- $\beta$ -Apo-8'-carotenal,  $\beta$ -carotene and  $\alpha$ -carotene were purchased from Sigma Aldrich (USA). All the chemicals (formic acid and ammonium formate) and solvents (hexane, chloroform, methanol and isopropanol) were LC-MS or HPLC grade.

Four stock solutions were prepared as followed. Stock solution of  $\beta$ -carotene (S1) was prepared by dissolving 2 mg of the standard in 1 mL of chloroform. Stock solution of mono-, di- and triglyceride mix (S2) was prepared by dissolving the entire ampoule content (40 mg) in 4 mL of hexane. Stock solution of triglyceride mix (S3) was prepared by dissolving the entire ampoule content (100 mg) in 4 mL of hexane:chloroform (1:1). Stock solution of *trans*- $\beta$ -Apo-8'-carotenal was prepared by dissolving 2 mg of the standard in 1 mL of chloroform (S4). Finally, a solution containing the main acylglycerols present in

vegetable oils and high concentration of carotenoids was prepared by mixing 0.5  $\mu\text{L}$  of S1, 0.8  $\mu\text{L}$  of S2, 0.4  $\mu\text{L}$  of S3 and 0.5  $\mu\text{L}$  of S4, diluted with 1 mL of methanol, resulting in a final concentration of 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of each acylglycerol and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of each carotenoid ( $\beta$ -carotene relative concentration to each acylglycerol similar to those reported by Mozzon et al. (2013)). This solution was used to establish the UHPLC analysis conditions to identify  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes in oil samples without previous derivatization neither other preparation procedure rather than solubilization.

### **5.2.3 Adsorbents**

The adsorption experiments were performed using two types of commercial bleaching earths widely used in the vegetable oil industry. The acid activated adsorbent Tonsil OPT 210 FF, manufactured by acid activation of calcium bentonite, which was kindly provided by Clariant (Germany). The neutral adsorbent Pure Flo B 80, composed by bentonite was kindly provided by Oil Dri (USA).

### **5.2.4 Bleaching experiments**

Batch adsorption experiments were carried out according to methodology adapted from Silva et al. (2013), reproducing the industrial bleaching of palm oil. In each test, 50 g of crude palm oil was placed into 100 mL flasks and heated to 90  $^{\circ}\text{C}$  (Rotavapor, Gehaka, RD 180, Brazil). Then, the following steps were performed: addition of 0.09% m/m of citric acid, as a 30% m/m aqueous solution high shear mixing at 15,000 rpm (mixer, Turratec, Tecnal, Brazil); addition 3.0% m/m of the selected adsorbent (bleaching earth); maintenance of the mixture at 90  $^{\circ}\text{C}$  under atmospheric pressure during 15 min; applying vacuum ( $<50$  mbar of absolute pressure) during 30 min (necessary time to reach adsorptive



equilibrium) at 90 °C. The adsorption process was interrupted by removing the bleaching earth by filtration over Buchner funnel and paper filter (pore size 11 µm).

## 5.2.5 Analytical techniques

### *Chromatographic separation*

Chromatographic analyses were performed using a Shimadzu UHPLC System, model Nexera X2, equipped with quaternary pump, degasser, autosampler and column oven. Chromatographic separation of the compounds was achieved at 40 °C using a Shim-pack XR-ODS (C18) column (50 × 2.0 mm i.d.; 2.2 µm particle size) purchased from Shimadzu (Japan). Solvent A was methanol/formic acid 0.1%/ammonium formate 10 mM. Solvent B was isopropanol/formic acid 0.1%/ammonium formate 10 mM. Solvents were delivered at a total flow rate of 0.4 mL/min. The elution gradient used was as follows: 0–4 min linear gradient from 0% to 50% B; 4–8 min isocratic 50% A and 50% B; 8–8.01 min return to 100% A; 8.01-12 min reconditioning of the column with 100% A isocratic.

About 10 mg of crude and bleached oil samples were dissolved in 1 mL of chloroform and subsequently diluted to 1 mg/mL with methanol. The injection volume was 0.5 µL for standard mix and diluted oil samples. To preserve MS detector source from contamination, during the analysis of diluted oil samples, the chromatographic flow was directed to waste on 4.5 min by means of a diverter valve.

MS detection was carried out with maXis ESI-qTOF mass spectrometer (Bruker Daltonics, Germany) operated in electrospray positive mode. Typical instrument settings were as followed: capillary voltage, 4500 V; dry gas temperature, 200 °C; dry gas flow, 9 L/min; nebulizer gas flow, 4 bar; funnel/multipole, RF 250 Vpp. Ions were detected from  $m/z$  300 to 1600 at acquisition rate of 2 Hz. The instrument was operated in auto MS/MS using stepping mode, with collision energy ranging from 15 to 60 eV. MS/MS spectra of

$\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes isomers were the average of fragmentation acquired under two collision-induced energies (CID): 15.5 and 46.6 eV. Mass calibration was performed using ESI-L Low Concentration Tuning Mix (Agilent Technologies, USA). Therefore, data were processed using the software Bruker Data Analysis 4.2 (Bruker Daltonics). Molecular formula for detected compounds was generated using SmartFormula algorithm. CompoundCrawler was employed to query correct molecular formula in open-access databases (CheBi, Kegg and Metlin).

## **5.3 Results and Discussion**

### **5.3.1 Crude Oil Characterization**

Native and hybrid interspecific crude palm oils were characterized regarding fatty acids profile, FFA, DOBI value and total carotenes. Table 5.1. shows fatty acids profile obtained by gas chromatography. The most abundant fatty acid in the interspecific hybrid oil is oleic (corresponding to about 55% in mass), followed by palmitic acid (corresponding to about 27% in mass). For the native oil, oleic and palmitic acids were the most abundant, 37.7 and 35.4% in mass, respectively. Interspecific hybrid oil presented almost 70% of unsaturated fatty acids, whilst the native presented 50%. These differences influence on the viscosity of both oils: the native oil has solid aspect whereas the interspecific hybrid is liquid at room temperature.

Table 5-1: Oil Characterization: Fatty acids profile, DOBI, free fatty acid (expressed as percentage of palmitic) and total carotenes content.

Trivial Name	Number of carbon:insaturation	Mass (%)	
		Hybrid	Native
Caproic	C6:0	0.17	-
Lauric	C12:0	0.15	-
Myristic	C14:0	0.35	1.83
Palmitic	C16:0	26.81	35.43
Palmitoleic	C16:1	0.20	0.80
Stearic	C18:0	3.48	11.62
Oleic	C18:1	55.73	37.70
Elaidic	C18:1	-	0.87
<i>cis</i> -Vaccenic	C18:1	0.88	0.69
Linoleic	C18:2	11.16	10.10
Linolenic	C18:3	0.44	0.61
Arachidic	C20:0	0.29	0.37
<i>cis</i> -11-Eicosanoic	C20:1	0.16	-
Behenic	C22:0	0.06	-
Lignoceric	C24:1	0.11	-
Saturated	-	31.31	49.25
Unsaturated	-	68.69	50.75
DOBI		4.9	3.4
FFA (%)		1.7	3.1
Total Carotene (mg/kg)			
Crude Oil		1,857	988
Bleached Acid		694	410
Bleached Neutral		1078	455

The DOBI values were 3.4 and 4.9 for native and hybrid, respectively (Table 1). The higher DOBI value indicates lower amount of oxidized carotene content, and consequently, it is easier to remove the color during the refining procedures (Gibon et al., 2007). Free fatty acids were 3.1 and 1.7% for native and hybrid oils, respectively. Interspecific hybrid presented two times more total carotenes than native (1,857 and 988

mg/kg, respectively). Therefore, it is clear that the interspecific hybrid oil has better quality parameters, and its color will be easier to be removed during the refining steps. The removal of palm oil color is important to ensure its applicability in a wide range of industrial products, such as food and cosmetics.

### **5.3.2 Total carotene content**

Table 1 shows the results of the total carotene analysis of crude oil and bleached using 3.0% (m/m) of adsorbent. According to study performed by Silva et al. (2013), after 30 minutes of contact between palm oil and the adsorbent Tonsil 210FF OPT, the adsorptive equilibrium for total carotenes is reached, and consequently, it is not possible any further reduction. It is possible to notice that the acid bleaching earth presented a slightly larger reduction of the total carotenes, 58 and 62% for the native and interspecific hybrid oils, respectively. Neutral bleaching earth showed a reduction of 54 and 42% for native and interspecific hybrid oils, respectively. It is interesting to notice that the total carotene content in the bleached oils with both adsorbents was very similar for the native oil. However, for interspecific hybrid oil, the difference is more outstanding, possible due to its higher initial concentration of carotenes. In fact, each adsorbent has different maximum adsorption capacities and the equilibrium of the adsorbent process will be dictated by the concentration of adsorbate on the surface of the adsorbent instead of the concentration of the adsorbent in the liquid (Silva et al., 2013). Another possible explanation is the effect of the oil viscosity in the adsorption process. It is well established that oils containing high concentrations of unsaturated fatty acids in their composition present a lower viscosity variation at different temperatures when compared to those with lower unsaturation content (Ceriani, Gonçalves, & Coutinho, 2011; Granero et al., 2014). The viscosity of the oil is an important parameter to be considered in the adsorption

process, as this will influence its mechanisms: (1) diffusion across the liquid film surrounding the adsorbent particle; (2) diffusion in the liquid contained in the pores and/or along pore walls, so called intra-particle diffusion (Gonsalvesh, Marinov, Gryglewicz, Carleer, & Yperman, 2016). Thus, it is possible that the mechanisms involved in the carotene adsorption process from the different palm oils are different due to differences in viscosity.

### 5.3.3 Chromatography

The first step was to develop a UHPLC method to separate and detect  $\beta$ -carotene from an oily matrix without any pretreatment. A vegetable oil with high carotenoids content was represented by a standard mixture of triacylglycerols, diacylglycerols, monoacylglycerol, *trans*- $\beta$ -Apo-8'-carotenal and  $\beta$ -carotene. A reproducible separation of the fatty compounds was achieved with the C18 column in a total chromatographic run of 6 min. The identification of fatty compounds was carried out by comparing the retention times and the MS spectral data for oils to those obtained for the standards (for more details, see supplementary information). Peaks were sharp, symmetrical and almost all compounds were efficiently separated, except for 1,2- and 1,3-diolein, that co-eluted at 2.2 min, and tripalmitin and triolein, that partially co-eluted at 5.6 min (Figure 5.1).

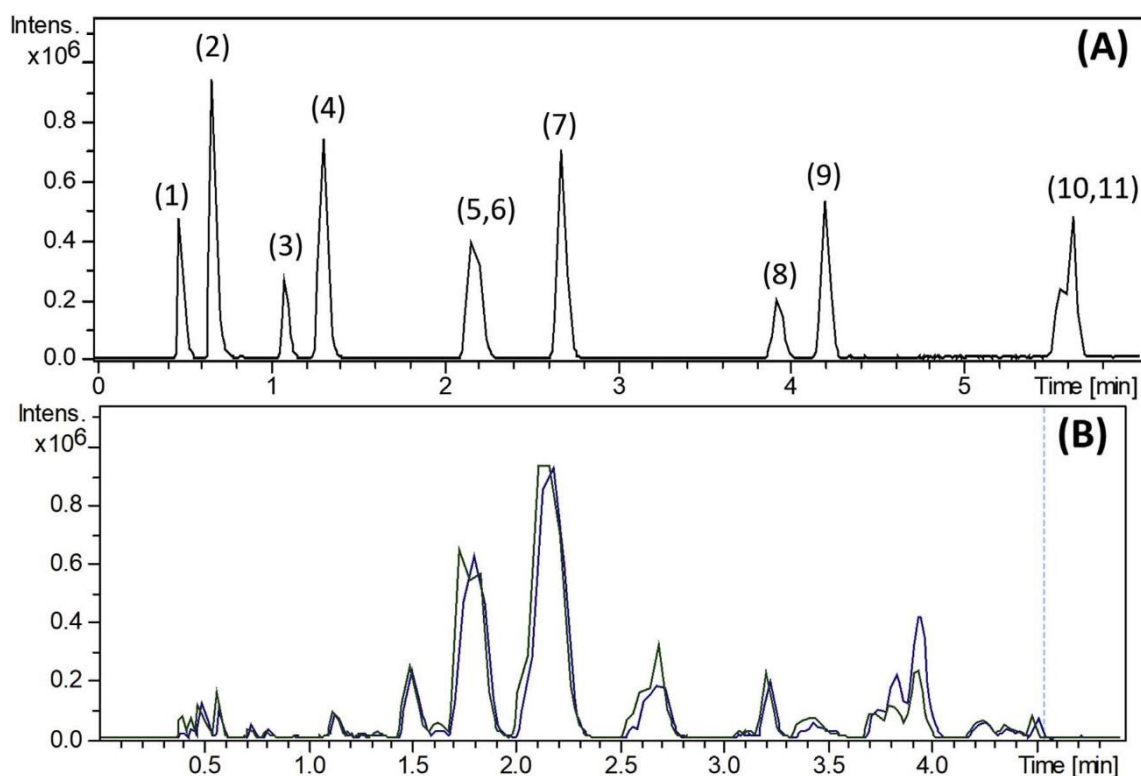


Figure 5-1: Representative chromatogram of model system representing a vegetable oil with high  $\beta$ -carotene content: (1) monoolein (RT: 0.5 min); (2) tricaprylin (RT: 0.7 min), (3) *trans*- $\beta$ -apo-8'-carotenal (RT: 1.1 min), (4) tricaprins (RT: 1.3 min), (5) 1,2- and 1,3- dioleins (RT: 2.2 min), (6) trilaurin (RT: 2.7 min), (7)  $\beta$ -carotene (RT: 3.9 min), (8) trimyristin (RT: 4.2 min), (9) tripalmitin and triolein (RT: 5.6 min).

### 5.3.4 MS/MS Analysis

Table 5-2 presents the data of 10 compounds separated and identified from the standard solution, including retention time, molecular formula, experimental and calculated  $m/z$  and the major adduct detected. Among the acylglycerols, only monoolein was identified sodiated, being all the others identified as  $\text{NH}_4$  adduct ion. *trans*- $\beta$ -Apo-8'-carotenal was identified as protonated adduct, whereas  $\beta$ -carotene was identified in the radical cationic form.

Table 5-2: Fatty acid compounds identified in the model system representing a vegetable oil with high  $\beta$ -carotene content by UHPLC-ESI-MS.

Peak #	Retention time (min)	Compound	Molecular formula	Mass to charge ( $m/z$ )		Ion
				Calculated	Experimental	
1	0.5	1-Monoolein	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>	379.2819	379.2847	[M+Na] <sup>+</sup>
2	0.7	Tricaprylin	C <sub>27</sub> H <sub>50</sub> O <sub>6</sub>	488.3946	488.4003	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
3	1.1	<i>trans</i> - $\beta$ -Apo-8'-carotenal	C <sub>30</sub> H <sub>40</sub> O	417.3152	417.3187	[M+H] <sup>+</sup>
4	1.3	Tricaprin	C <sub>33</sub> H <sub>62</sub> O <sub>6</sub>	572.4885	572.4933	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
5	2.2	1,2-Diolein <sup>a</sup>	C <sub>39</sub> H <sub>72</sub> O <sub>5</sub>	638.5718	638.5748	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
5	2.2	1,3-Diolein <sup>a</sup>	C <sub>39</sub> H <sub>72</sub> O <sub>5</sub>	638.5718	638.5748	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
6	2.7	Trilaurin	C <sub>39</sub> H <sub>74</sub> O <sub>6</sub>	656.5824	656.5873	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
7	3.9	$\beta$ -Carotene	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	536.4376	536.4425	M <sup>+</sup>
8	4.2	Trimyristin	C <sub>45</sub> H <sub>86</sub> O <sub>6</sub>	740.6763	740.6814	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
9	5.6	Tripalmitin <sup>b</sup>	C <sub>51</sub> H <sub>98</sub> O <sub>6</sub>	824.7702	824.7744	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>
9	5.6	Triolein <sup>b</sup>	C <sub>57</sub> H <sub>104</sub> O <sub>6</sub>	902.8171	902.8224	[M+NH <sub>4</sub> ] <sup>+</sup>

<sup>a</sup> Co-eluted at 2.2 min.

<sup>b</sup> Partially co-eluted at 5.6 min.

We also evaluated the chromatographic separation and MS identification of a mixture of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene (Figure S10, available in the supplementary material), once these are the most important carotenoids in crude palm oil (NG & CHOO, 2016). The separation of the isomers  $\alpha$ - and  $\beta$ - was accomplished through the developed UHPLC method, and retention times were 3.8 and 3.9 min, respectively. Both compounds could be identified by ESI-MS/MS (Figure 5.2a) and the  $\alpha$ -carotene has a diagnostic ion of  $m/z$  388 (Figure 5.2 b). The main fragmentation of these two isomers was proposed in the Figure 5.3.

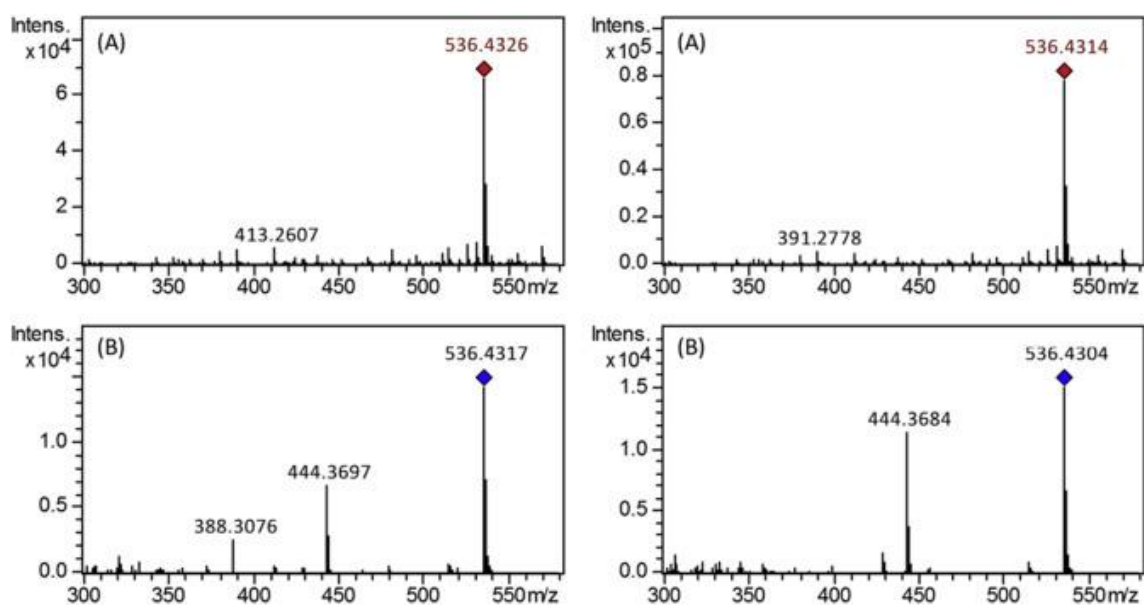


Figure 5-2: Left) (A) High resolution ESI(+)-MS spectrum of  $\alpha$ -carotene (radical cation) (B) ESI(+)-MS/MS spectrum of  $\alpha$ -carotene (precursor ion of  $m/z$  536). Right) (A) High resolution ESI(+)-MS spectrum of  $\beta$ -carotene (radical cation) (B) ESI(+)-MS/MS spectrum of  $\beta$



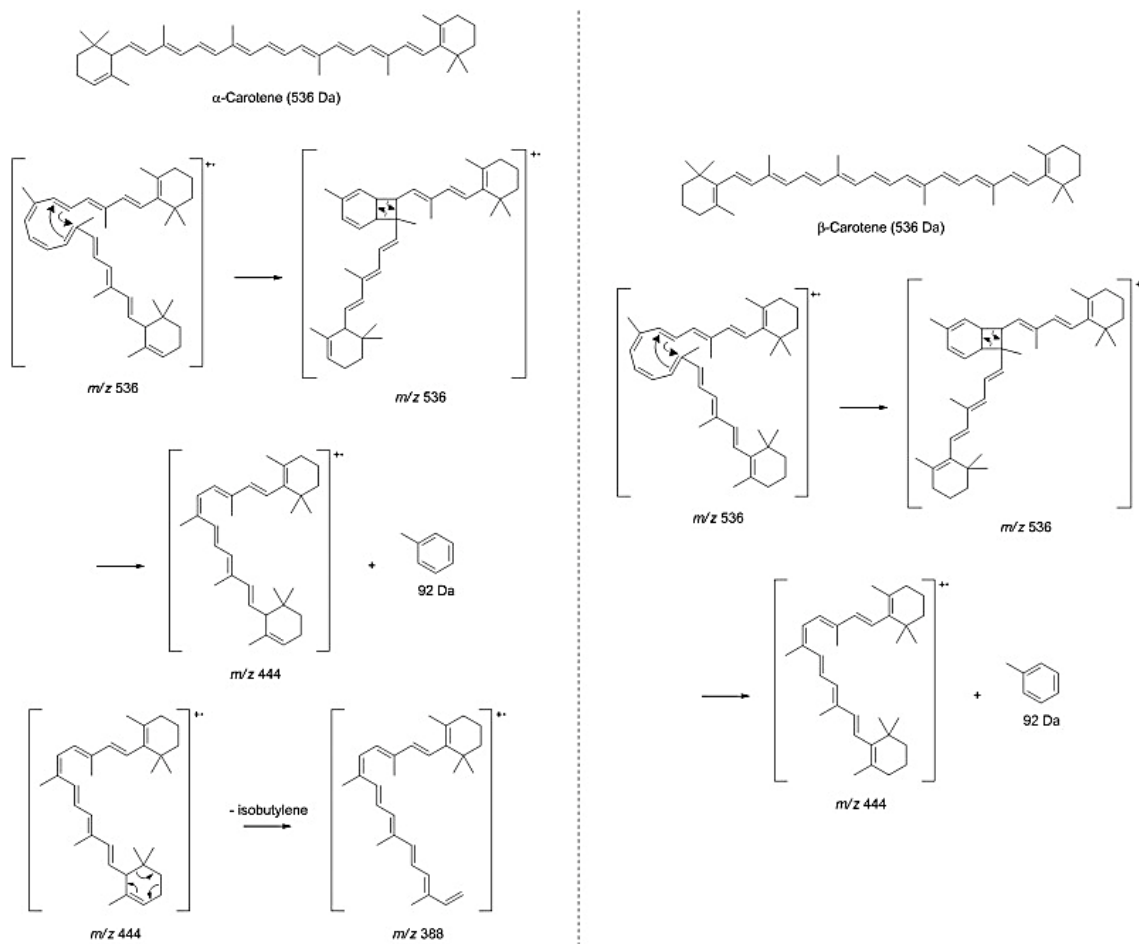


Figure 5-3: Proposed fragmentation pattern for carotene isomers main fragments. (Left) Rationale for the  $\alpha$ - isomer fragmentation. (Right) Rationale for the  $\beta$ - isomer fragmentation.

Both isomers (radical cations) showed a toluene (92 Da) neutral loss affording the radical cation of  $m/z$  444. Nevertheless, the  $\alpha$ -carotene spectrum has a diagnostic ion of  $m/z$  388 from an isobutylene (56 Da) neutral loss affording a conjugated radical cation. If is considered that the  $\beta$ -carotene already has a complete conjugated system, the isobutylene loss is not a logical fragmentation, therefore the different gas phase reactivity from these isomers arises from position of the C=C bond noted in the 6-membered ring. The radical cation formation position is likely to be the same of protonated carotenes, as discussed elsewhere (Neto et al., 2016). The observed results seem to be in accordance with previous reports using FAB-MS/MS (Vanbreemen, Schmitz, & Schwartz, 1995) and other MS

techniques, as reviewed (Rivera, Christou, & Canela-Garayoa, 2014). Although the similar results, the rationale for the diagnostic ion has barely been discussed.

All the other compounds of the standard mixture had their ESI-MS/MS acquired and were detected as protonated (or as Na<sup>+</sup> or as NH<sub>4</sub><sup>+</sup> adducts). All these spectra may be found in the supplementary material (Figures S1-S9) and their high-resolution MS (also see Table 2) as their structural characterization were in accordance with the expected structures.

### **5.3.1 Carotenoids identification in bleached oils**

The  $\alpha$ - and  $\beta$ - carotene isomers identification was performed in oils obtained from native and hybrid oil palm cultivars, before and after bleaching experiments using 3.0% (m/m) of bleaching earth. Figure 3a shows the chromatograms obtained for the native oil. It is possible to observe that the crude oil presents  $\alpha$ - and  $\beta$ - carotene isomers, which correspond to the peaks in 3.8 and 3.9 min, respectively (Figure 5.4a – red line). After the treatment with the adsorbents (Figure 5.4a – blue and green lines), the concentration of carotenoids was reduced, and the  $\beta$ - isomer peak (3.9 min) was very close to the baseline. There was also a reduction, however less expressive, of the  $\alpha$ - isomer. The peak intensity of the isomers was very similar after each treatment.

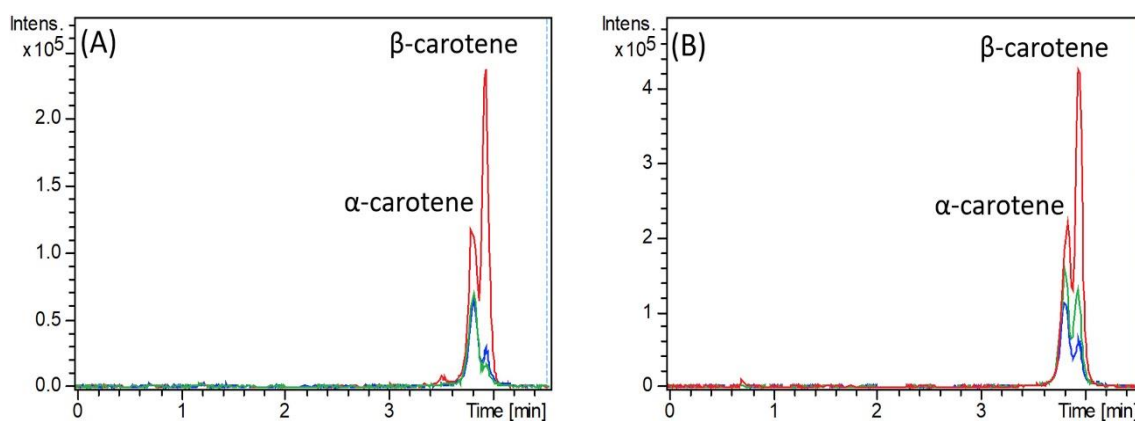


Figure 5-4: Representative ion extracted chromatogram ( $m/z$  536) of (A) native and (B) interspecific hybrid palm oil: crude (red); bleached with acid active adsorbent (Tonsil OPT 210 FF) (blue), bleached with neutral adsorbent (Pure Flo B-80) (green). The black line

Furthermore, figure 3b shows the chromatogram of hybrid oil. Alike the native oil, the crude oil had both isomers. However, a different behavior was observed using different bleaching earths. Bleached oil with the neutral one (Figure 5.4b – green line) had higher reduction of  $\beta$  isomer concentration, whereas lower difference was observed in the peak intensity of the  $\alpha$ . Bleached oil with the acid adsorbent (Figure 5.4b – blue line) presented reduction of both forms, also presenting a small reduction of the concentration of the  $\alpha$  and substantial reduction of the concentration of  $\beta$ . Those results may reflect the selective adsorption between  $\alpha$ - and  $\beta$ -isomers, being the last one preferably adsorbed.

From those results, it is evident that the studied bleaching earths have different capacities to remove carotene isomers, resulting in diverse carotenoid profile in bleached oils and, consequently, diverse by-products. Although, none of the previous works in literature has identified carotenoid isomers in bleached oils. This result confirms what was reported by Silva et al. (2014), which evaluated the effect of using different bleaching earth on the color of fully refined palm oil. Silva et al. (2014) have also evaluated the ability of different types of bleaching earth in the removal of total carotenes in the batch bleaching procedures, and the final color of the oils after being submitted to the deodorization process (heat bleaching). It was noted that the acid bleaching earth had a higher concentration of

carotenes after bleaching, albeit, after the deodorization stage the oil had a lighter coloration. The authors suggested that this effect can be explained by the different forms of carotenes remaining in the oil after adsorption. According to Gurak et al. (2014), the color of carotenoids depends on their chemical structure, their concentration and interaction with other molecules. It is important to highlight that  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotenes are not detected in fully refined oils and the final color is mostly due to high molecular compounds derived from oxidation reactions, especially carotenoids.

## 5.4 Concluding remarks

This work showed an important progress in understanding how the adsorption process affects the remaining carotenoids isomers in bleached palm oil, what is essential for improvements in palm oil refining towards a more cost-effective and sustainable process. A pioneer method was developed to identify  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene in oil samples by UHPLCMS/MS, which was applied to identify them in bleached palm oils. In addition, the fragmentation pattern of carotenoids was analyzed and the rationale for the  $\alpha$ -carotene diagnostic ion ( $m/z$  388) was widely discussed. This work fulfills a gap in the literature, once none of the previous works discussed the fragmentation pattern of  $\alpha$ - and  $\beta$ -carotene to this extent. The analysis was carried out on crude palm oils obtained from two different oil palm cultivars: native (*E. guineensis*) and interspecific hybrid (*E. guineensis*  $\times$  *E. oleifera*). Both oils presented  $\alpha$ - and  $\beta$ - two isomers, being  $\beta$  isomer the most important. Thereupon, the isomers were identified in bleached oils with commercial bleaching earths, that are widely used in the vegetable oil industry. It was also observed that for the native oil, the reduction of the two isomers after the adsorption process was very similar. Finally, for the hybrid oil, the remaining isomers in the bleached oil were considerably different: the concentration of the  $\beta$ -isomer reduced considerably after bleaching with both bleaching

earths, whereas the concentration of  $\alpha$ -isomer only showed considerable reduction after bleaching with the acid clarifying earth. Further studies are still needed to explain why there was such a difference in the behavior of different oils.

## References

- AOCS. (1998). *Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*. Champaign, IL: American Oil Chemists' Society.
- Ceriani, R., Gonçalves, C. B., & Coutinho, J. A. P. (2011). Prediction of viscosities of fatty compounds and biodiesel by group contribution. *Energy & Fuels*, 25, 3712-3717.
- De Leonardis, A., Cuomo, F., Macciola, V., & Lopez, F. (2016). Influence of free fatty acid content on the oxidative stability of red palm oil. *RSC Advances*, 6, 101098-101104.
- Dijkstra, A., & Segers, J. (2007). Production and refining of fats and oils. In F. D. Gunstone, J. L. Harwood & A. J. Dijkstra (Eds.), *Lipid Handbook* (pp. 143-262). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., Jarén-Galán, M., Garrido-Fernández, J., Pérez-Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2012). Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. *Food Research International*, 46, 438-450.
- Food and Agriculture Organization of United Nation, F. (2017). *Food and Agriculture Data: Crops processed*. from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QD>
- Gibon, V., De Greyt, W., & Kellens, M. (2007). Palm Oil Refining. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 315-335.
- Gonsalvesh, L., Marinov, S., Gryglewicz, G., Carleer, R., & Yperman, J. (2016). Preparation, characterization and application of polystyrene based activated carbons for Ni(II) removal from aqueous solution. *Fuel Processing Technology*, 149, 75-85.
- Granero, M. G., Rocha, B. B., Chaves, M. A., Brasil, F. C. G., Aracava, K. K., Rodrigues, C. E. C., Ceriani, R., & Gonçalves, C. B. (2014). Viscosities and densities of systems containing fatty compounds and alcoholic solvents. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 92, 1939-1950.
- Gurak, P. D., Mercadante, A. Z., González-Miret, M. L., Heredia, F. J., & Meléndez-Martínez, A. J. (2014). Changes in antioxidant capacity and colour associated with the formation of  $\beta$ -carotene epoxides and oxidative cleavage derivatives. *Food Chemistry*, 147, 160-169.
- Iftikhar, Tan, H., & Zhao, Y. (2017). Enrichment of  $\beta$ -carotene from palm oil using supercritical carbon dioxide pretreatment-solvent extraction technique. *LWT - Food Science and Technology*, 83, 262-266.

- Mayamol, P. N., Balachandran, C., Samuel, T., Sundaresan, A., & Arumugan, C. (2007). Process technology for the production of micronutrient rich red palm olein. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84, 587-596.
- Mba, O. I., Dumont, M.-J., & Ngadi, M. (2017). Thermostability and degradation kinetics of tocochromanols and carotenoids in palm oil, canola oil and their blends during deep-fat frying. *LWT - Food Science and Technology*, 82, 131-138.
- Meléndez-Martínez, A. J., Britton, G., Vicario, I. M., & Heredia, F. J. (2007). Relationship between the colour and the chemical structure of carotenoid pigments. *Food Chemistry*, 101, 1145-1150.
- Mozzon, M., Pacetti, D., Lucci, P., Balzano, M., & Frega, N. G. (2013). Crude palm oil from interspecific hybrid *Elaeis oleifera* × *Elaeis guineensis*: Fatty acid regiodistribution and molecular species of glycerides. *Food Chemistry*, 141, 245-252.
- Müller, L., Caris-Veyrat, C., Lowe, G., & Böhm, V. (2016). Lycopene and Its Antioxidant Role in the Prevention of Cardiovascular Diseases—A Critical Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 1868-1879.
- Neto, F. C., Guaratini, T., Costa-Lotufo, L., Colepicolo, P., Gates, P. J., & Lopes, N. P. (2016). Re-investigation of the fragmentation of protonated carotenoids by electrospray ionization and nanospray tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 30, 1540-1548.
- Ng, M. H., & Choo, Y. M. (2016). Improved Method for the Qualitative Analyses of Palm Oil Carotenes Using UPLC. *Journal of Chromatographic Science*, 54, 633-638.
- Pohndorf, R. S., Cadaval Jr, T. R. S., & Pinto, L. A. A. (2016). Kinetics and thermodynamics adsorption of carotenoids and chlorophylls in rice bran oil bleaching. *Journal of Food Engineering*, 185, 9-16.
- PORIM. (1990). PORIM test methods: Carotene content. Kuala Lumpur: Palm Oil Research Institute of Malaysia.
- Rivera, S. M., Christou, P., & Canela-Garayoa, R. (2014). Identification of carotenoids using mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 33, 353-372.
- Rodriguez, E. B., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2007). Formation of apocarotenals and epoxy-carotenoids from beta-carotene by chemical reactions and by autoxidation in model systems and processed foods. *Food Chemistry*, 101, 563-572.
- Saini, R. K., Nile, S. H., & Park, S. W. (2015). Carotenoids from fruits and vegetables: Chemistry, analysis, occurrence, bioavailability and biological activities. *Food Research International*, 76, 735-750.
- Silva, S. M., Sampaio, K. A., Ceriani, R., Verhé, R., Stevens, C., De Greyt, W., & Meirelles, A. J. A. (2013). Adsorption of carotenes and phosphorus from palm oil onto acid activated bleaching earth: Equilibrium, kinetics and thermodynamics. *Journal of Food Engineering*, 118, 341-349.
- Silva, S. M., Sampaio, K. A., Ceriani, R., Verhé, R., Stevens, C., De Greyt, W., & Meirelles, A. J. A. (2014). Effect of type of bleaching earth on the final color of refined palm oil. *LWT - Food Science and Technology*, 59, 1258-1264.

Vanbreemen, R. B., Schmitz, H. H., & Schwartz, S. J. (1995). Fast-atom-bombardment tandem mass-spectrometry of carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 384–389.

## Supplementary material

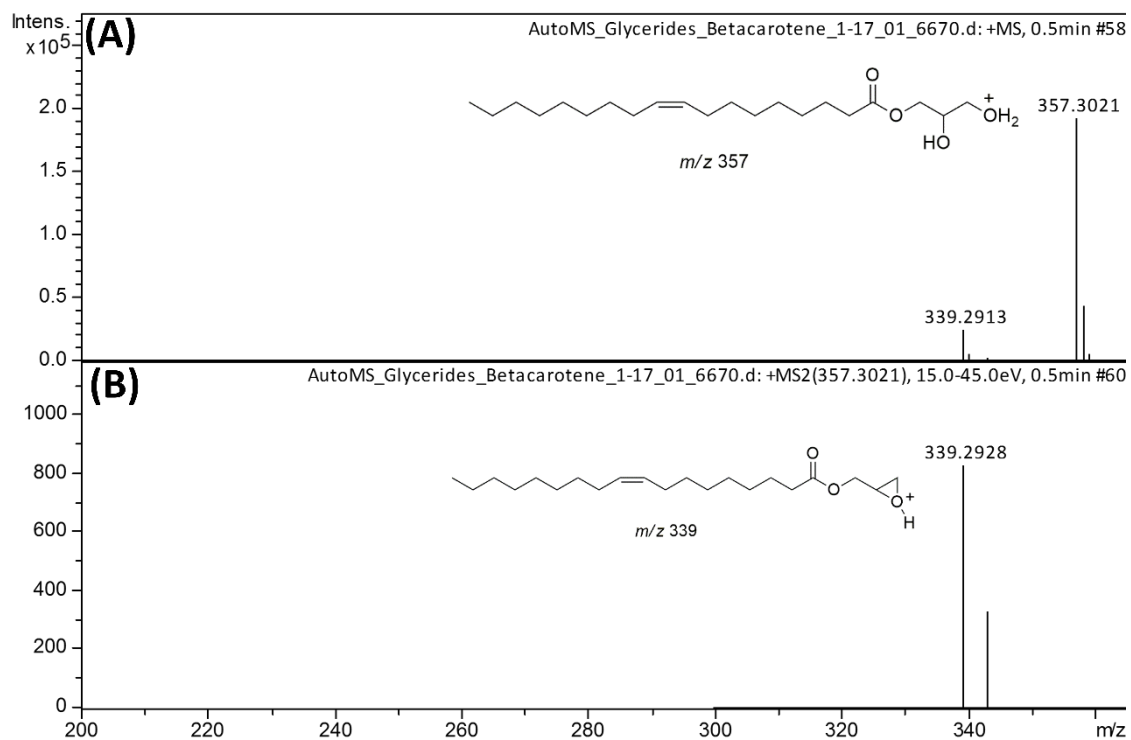


Figure S5.1: (A) High resolution ESI(+)-MS spectrum of monoolein ( $[M+H]^+$  of m/z 357); (B) ESI(+)-MS/MS spectrum of monoolein (precursor ion of m/z 357).



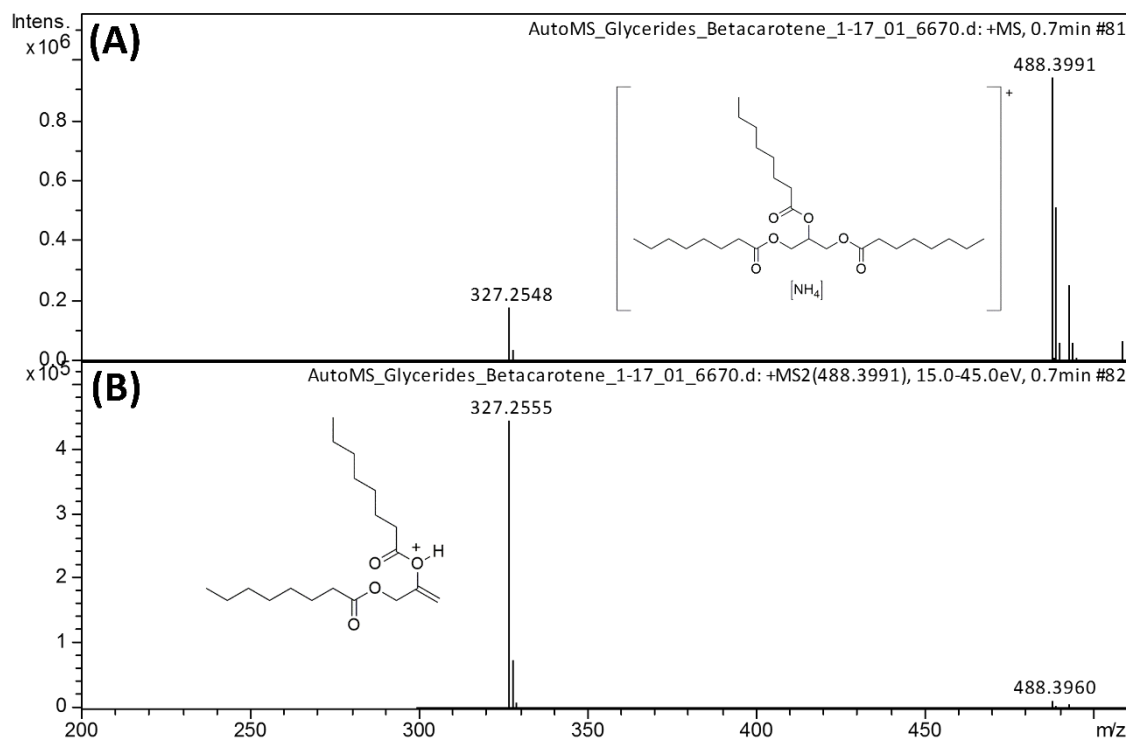


Figure S5.2: (A) High resolution ESI(+)-MS of tricaprylin ( $[M+NH_4]^+$ ). The ion of  $m/z$  493 ( $[M+Na]^+$ ) was also noted in the spectrum; (B) ESI(+)-MS/MS of tricaprylin (precursor ion of  $m/z$  488).

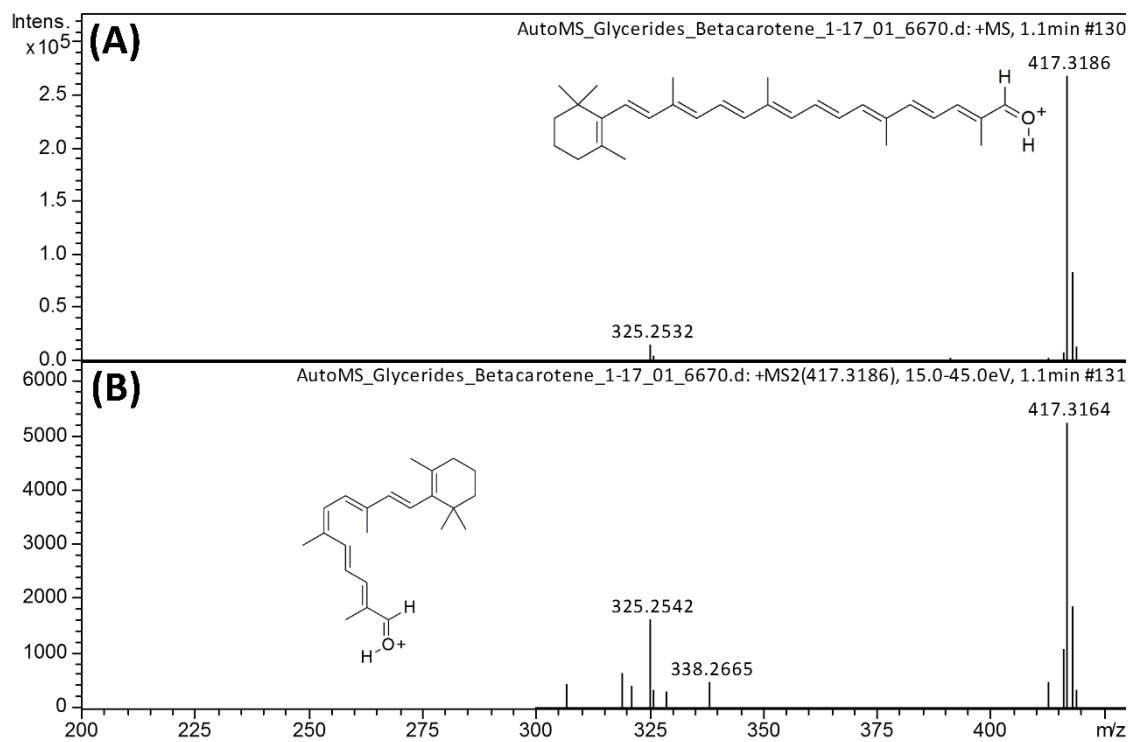


Figure S5.3: (A) High resolution ESI(+)-MS of trans- $\beta$ -apo-8'-carotenal ( $[M+H]^+$ ); (B) ESI(+)-MS/MS of trans- $\beta$ -apo-8'-carotenal (precursor ion of m/z 417).

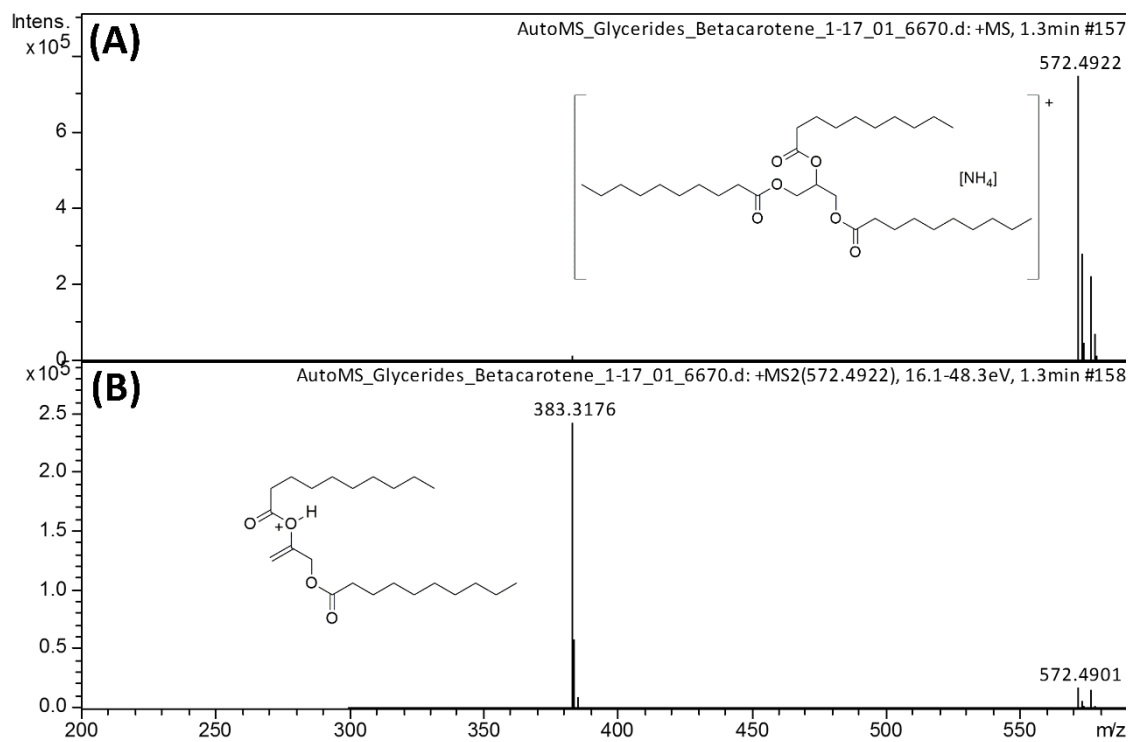


Figure S5.4: (A) High resolution ESI(+)-MS of tricaprin ( $[M+NH_4]^+$ ); (B) ESI(+)-MS/MS of tricaprin (precursor ion of  $m/z$  572).

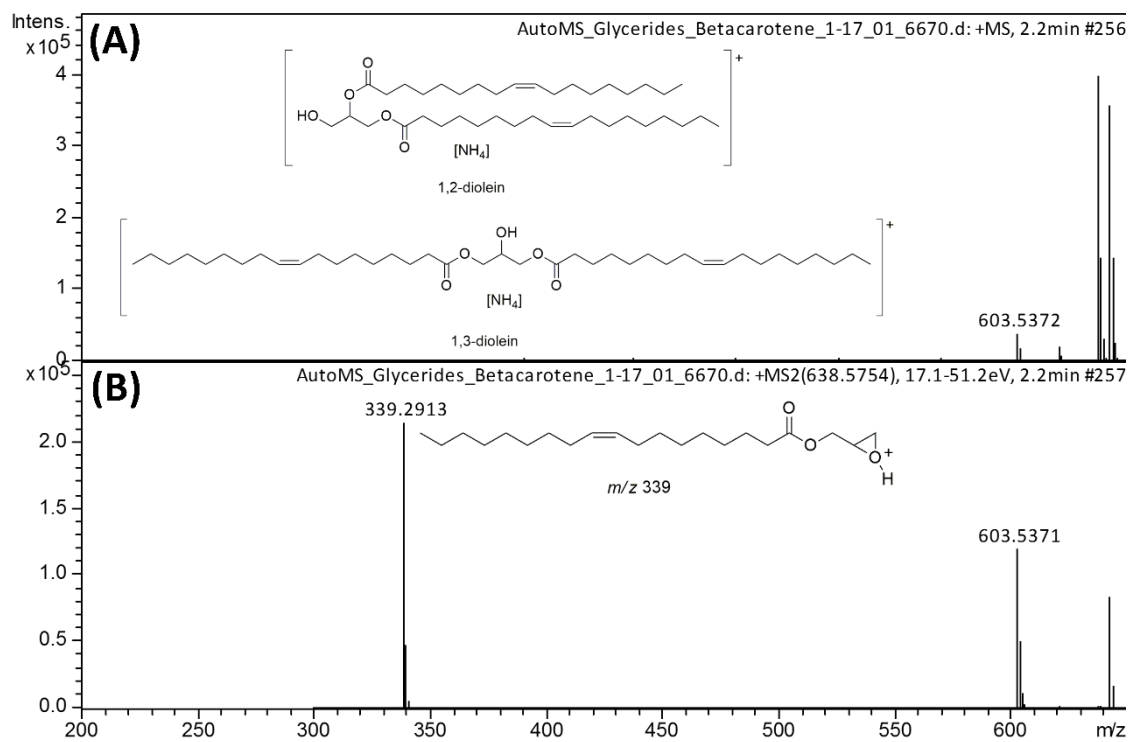


Figure S5.5: (A) High resolution ESI(+)-MS of 1,2-diolein and 1,3-diolein ( $[M+NH_4]^+$ ); (B) ESI(+)-MS/MS of 1,2- and 1,3-diolein (precursor ion of  $m/z$  638).

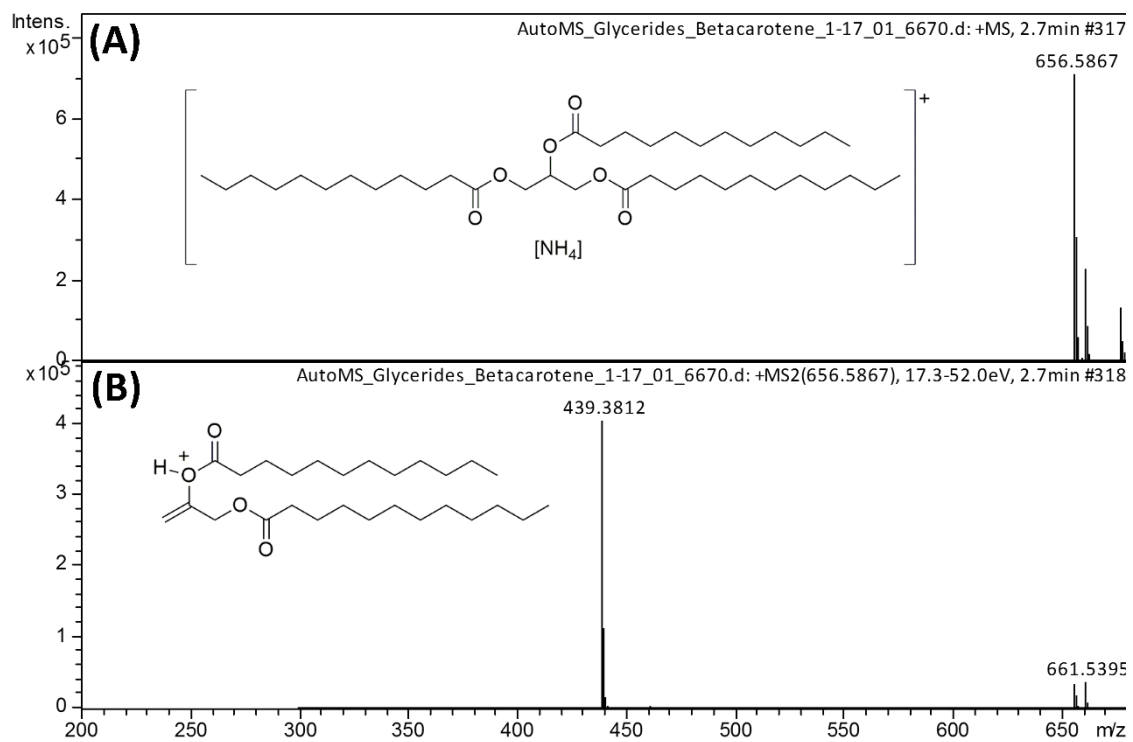


Figure S5.6: (A) High resolution ESI(+)-MS of trilaurin ( $[M+NH_4]^+$  of  $m/z$  656 or  $[M+Na]^+$  of  $m/z$  661); (B) ESI(+)-MS/MS of trilaurin (precursor ion of  $m/z$  661).

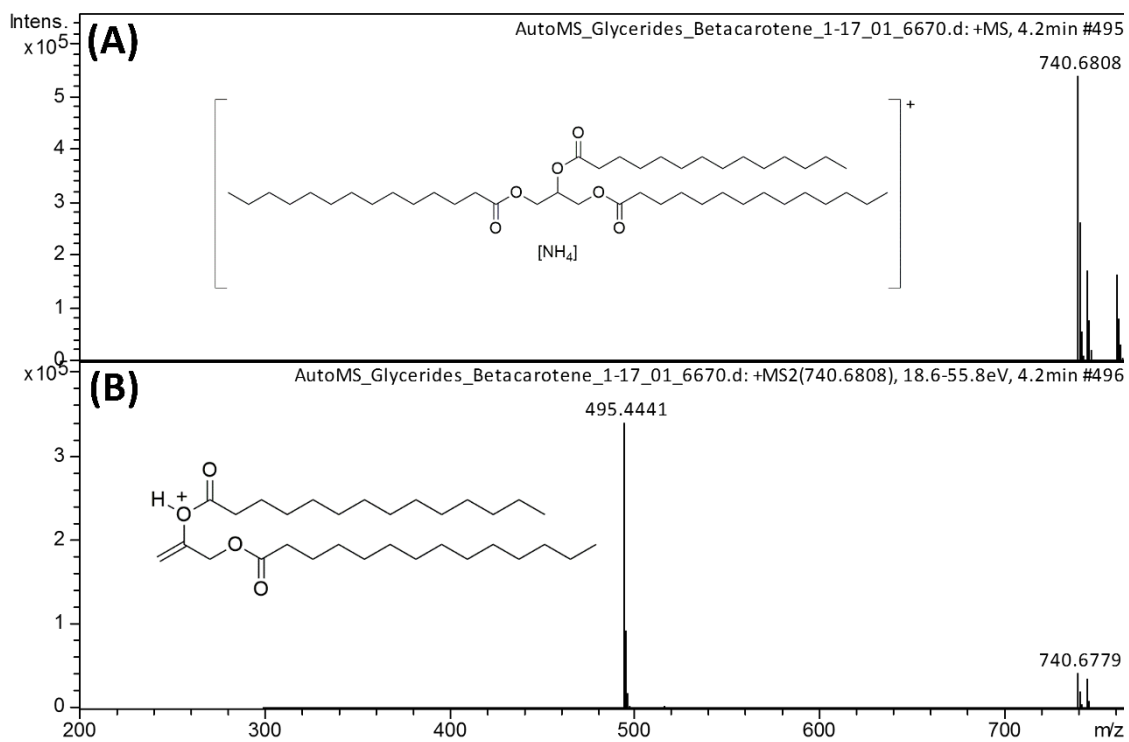


Figure S5.7. (A) High resolution ESI(+)-MS of trimyristin ( $[M+NH_4]^+$ ); (B) ESI(+)-MS/MS of trimyristin (precursor ion of  $m/z$  740).

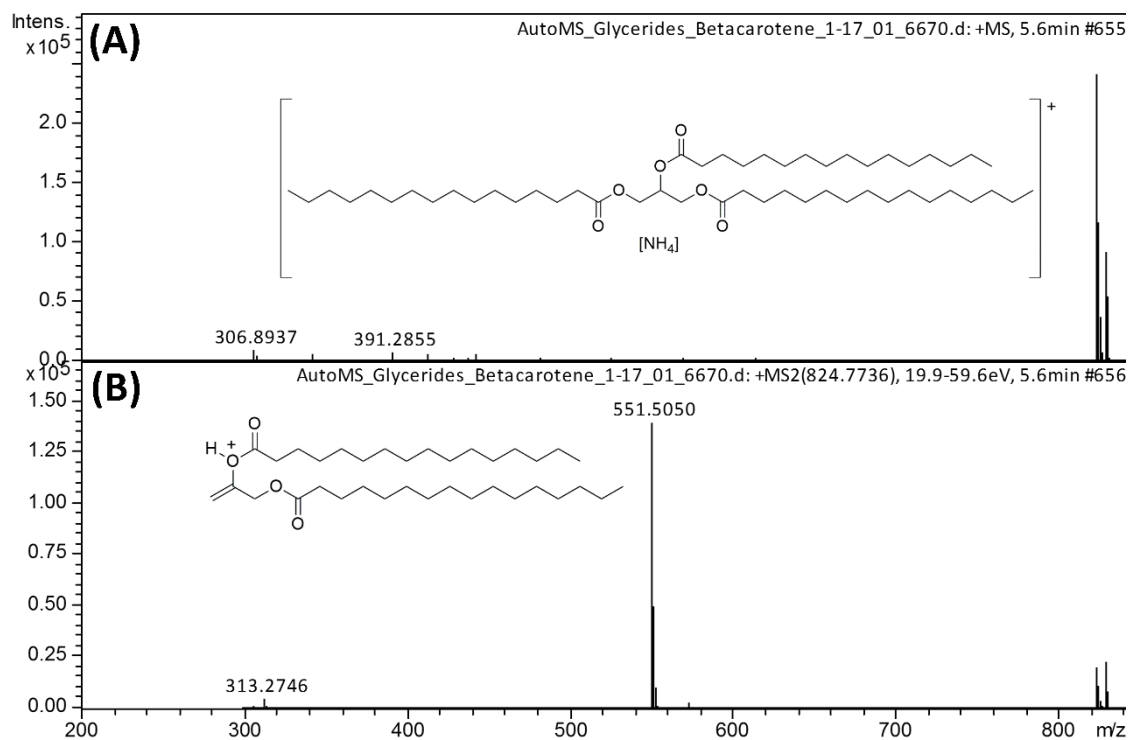


Figure S5.8: High resolution ESI(+)-MS of tripalmitin ( $[M+NH_4]^+$ ); (B) ESI(+)-MS/MS of tripalmitin (precursor ion of  $m/z$  824).

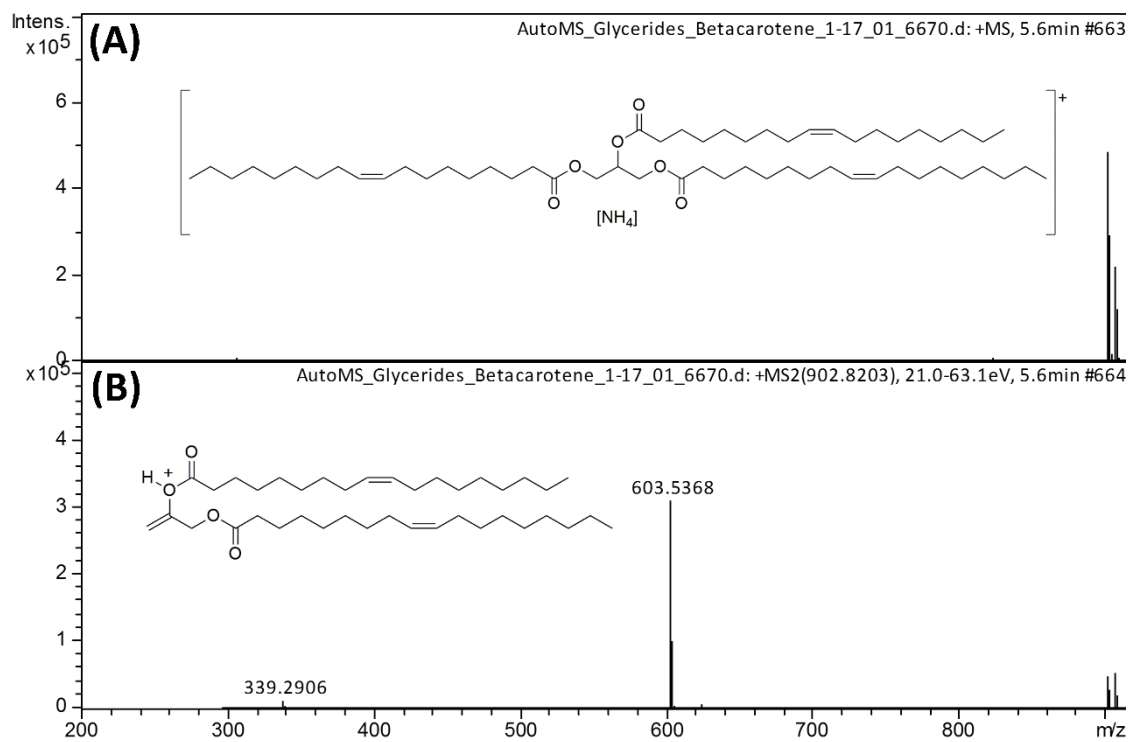


Figure S5.9: High resolution ESI(+)-MS of triolein ( $[M+NH_4]^+$ ); (B) ESI(+)-MS/MS of triolein (precursor ion of  $m/z$  902).



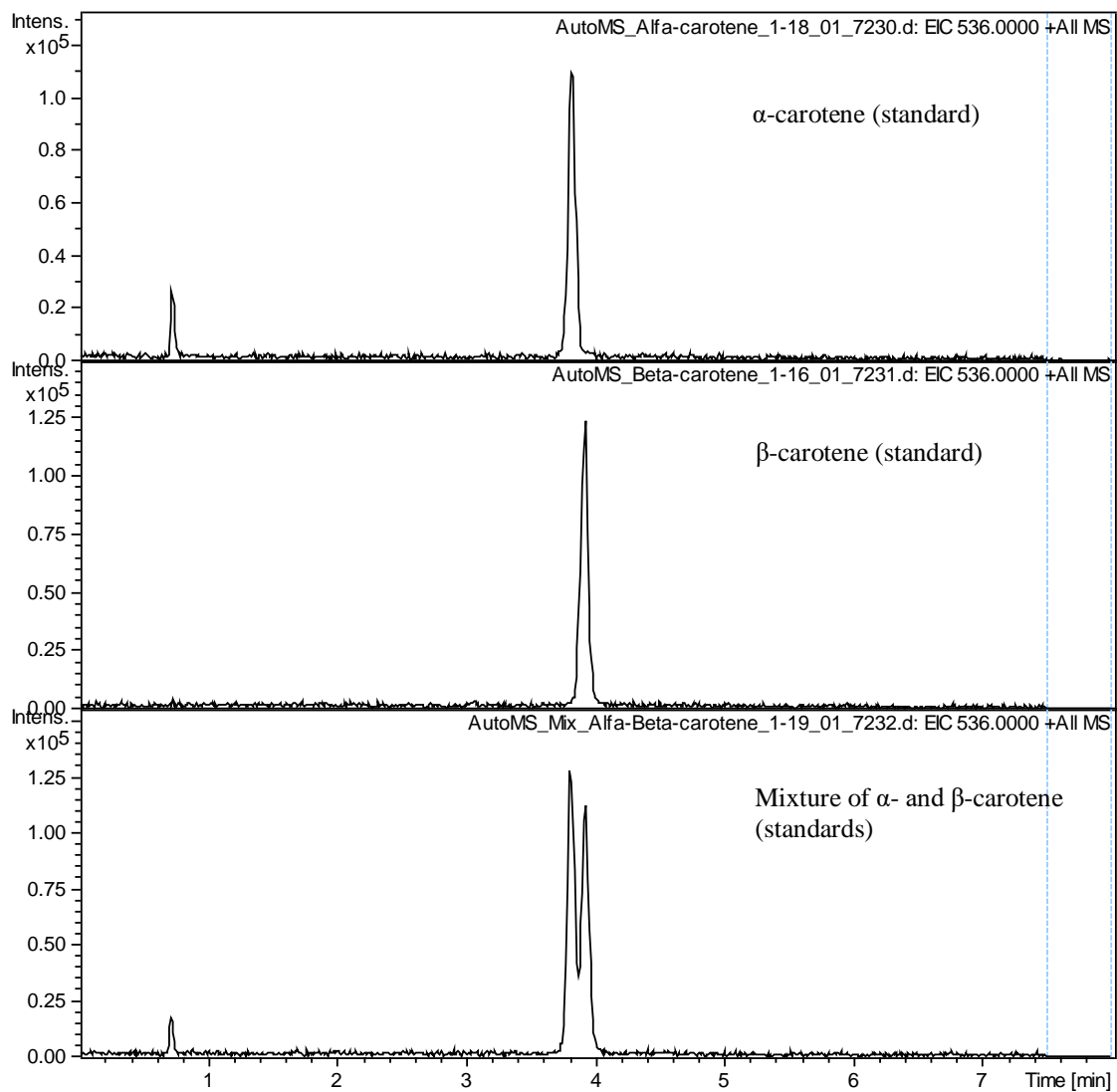


Figure S5.10: Representative chromatogram of a mixture of  $\alpha$ -carotene (RT: 3.8 min) and  $\beta$ -carotene (3.9 min).

## **CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO GERAL**

---

## 6 Conclusão

Este trabalho teve como objetivo avaliar condições de branqueamento, similar ao processamento industrial do óleo, para determinar seu impacto na formação de produtos de oxidação e alterações nas concentrações de carotenos no óleo de palma. Foi estudado o óleo de palma híbrido interespecífico e, para efeitos de comparação, o óleo de palma africano. Primeiramente, foi realizado um estudo aprofundado da composição dos óleos. Os óleos apresentaram uma diferente composição em ácidos graxos. Essa diferença, além de ser um meio de identificar os óleos, é fundamental para explicar as diferenças, mesmo que sutis, em suas propriedades físicas. Também é por meio dessa diferença que justifica as diferenças em suas propriedades térmicas. A composição em compostos minoritários como carotenos e tocoferóis foram qualitativamente similares, porém o óleo interespecífico apresentou valores mais elevados de ambos os componentes.

Como segunda etapa deste trabalho, foi avaliado o desempenho de adsorventes na adsorção de carotenos. Quanto aos adsorventes comerciais testados, um neutro e um acidamente ativado, foi observada uma diferença na capacidade de remoção de isômeros de carotenos. O adsorvente acidamente ativado conseguiu remover de forma similar todos os isômeros testados:  $\alpha$ -,  $\beta$  e 9-*cis*- $\beta$ -carotenos. O adsorvente neutro apresentou grande capacidade de remoção apenas do  $\beta$ -caroteno. Uma possível explicação para essa diferença e a diferença de tamanhos de poros dos adsorventes.

Dentre os adsorventes sintetizados para este trabalho, o PCH apresentou desempenho similar aos adsorventes comerciais. O LDH adsorveu poucos carotenos, o que pode ser explicado pela sua menor área superficial em comparação aos outros adsorventes, e a suas características aniônica. Em contrapartida, o óleo branqueado com este adsorvente mostrou menor teor de produtos de oxidação. A sepiolita apresentou desempenho intermediário entre os dois adsorventes. Além disso, foi observada correlação entre a

formação de produtos de oxidação e a concentração de carotenos na fase líquida após branqueamento, mostrando a importância desses compostos para proteger o óleo da oxidação durante as temperaturas de branqueamento. É fundamental realizar novos experimentos para remoção de metais para avaliar completamente a eficiência de adsorventes como terra branqueadora, já que as terras visam adsorver metais além dos pigmentos. Quanto a formação de produtos de degradação, nas condições trabalhadas, a temperatura elevada mostrou maior influência na formação de dienos e trienos, do que as terras, porém são necessários estudos utilizando essas terras em diferentes concentrações.

O trabalho se mostra de grande relevância, pois a caracterização física, química e térmica do óleo de palma híbrido preenche uma lacuna atual da literatura. Além disso, mostrou um importante progresso no entendimento de como o processo de adsorção afeta os isômeros de carotenóides remanescentes no óleo de palma branqueado, já que foi observada uma seletividade das terras em adsorver o isômero  $\beta$ -caroteno, e a quantidade de produtos de oxidação formados, o que é essencial para melhorias no refino do óleo de palma.

**DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE DOUTORADO**

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifico e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

25 de agosto de 2021  
Brasília, (dia) de (mês) de (ano).

Assinatura do/a discente: Christine Silva de Almeida

Programa: Tecnologias Químicas e Biológicas

Nome completo: Christine Silva de Almeida

Título do Trabalho: Efeito da etapa adsorbtiva no teor de carotenoides do óleo de palma processado

Nível: ( ) Mestrado (X) Doutorado

Orientador/a: Simone Monteiro e Silva