

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SEME YOUSSEF REDA

ESTUDO COMPARATIVO DE ÓLEOS VEGETAIS SUBMETIDOS A ESTRESSE
TÉRMICO

PONTA GROSSA
2004

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SEME YOUSSEF REDA

ESTUDO COMPARATIVO DE ÓLEOS VEGETAIS SUBMETIDOS A ESTRESSE
TÉRMICO

Dissertação apresentada para a
obtenção do título de mestre na
Universidade Estadual de Ponta
Grossa, Área de Avaliação
Tecnológica de Matérias-Primas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Irajara
Borba Carneiro.

Co-orientador: Prof. Dr. Egon
Schnitzel.

PONTA GROSSA
2004

AGRADECIMENTOS

A Deus que me dotou de razão, inteligência e vontade, caracteres peculiares de sua natureza imortal!

A Prof^a Dr^a Roseli Aparecida Ferrari (UEPG), pelas sugestões e disponibilidade.

A Dr^a Ivânia Teresinha Albrecht Schuquel (UEM), pelos registros dos espectros de RMN de C¹³ e H¹.

A Prof^a Elenise Sauer Leal (CEFET), pelo registro dos cromatogramas gasosos.

Ao Prof. Dr. José Caetano Zurita de Silva (UEPG), pelos registros dos espectros de XRD.

A Denise Maria de Souza Mendes (Laboratório de físico-química), pela sua colaboração e disponibilidade.

A Ana e Elias por suas presenças sempre animadoras em todos os momentos.

A todos os professores do curso de pós-graduação que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus Senhor dos senhores.

Ao Prof. Dr. Paulo Borba pela contribuição com seus conhecimentos e sugestões na orientação desta dissertação.

Ao Prof. Gilvan Wosiacki pela paciência e disponibilidade em todos os momentos.

A Empresa Cargill do Brasil pela disponibilidade em fornecer os óleos para a realização desse trabalho.

Dedico esse trabalho
aos meus filhos
João Victor e Nathália
que muitas
muitas vezes
me fizeram
companhia nas
horas solitárias
em frente ao
computador.

A dissertação
é uma
descrição
da realidade.

(Gilvan Wosiacki)

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	- Alterações oxidativas de óleos vegetais insaturados em alimentos.....	12
Esquema 2	- Mecanismo de formação de radicais livres.....	13
Esquema 3	- Mecanismo de formação de um monômero cíclico.....	15
Esquema 4	- Produtos da termo-oxidação o ácido linoléico.....	17
Esquema 5	- Formação de epoxialcenais durante a peroxidação lipídica e reação com aminos para produzir derivados pirrólicos.....	31
Esquema 6	- Mecanismo de halogenação de dienos: 1,2 e 1,4.....	37
Esquema 7	- Termo-oxidação e isomerização do ácido linoléico.....	92
Reação I	- Deslocalização eletrônica e a estabilização dos radicais fenoxil pelos antioxidantes fenólicos.....	21
Reação II	- Reação de oxidação do colesterol por radicais livres, na presença de cobre (Cu).....	28
Equação I	- Cálculo da área de um próton.....	40
Equação II	- Cálculo de prótons olefínicos.....	40
Equação III	- Cálculo do total de prótons.....	41
Equação IV	- Cálculo do peso molecular médio dos triacilgliceróis (PM).....	41
Equação V	- Cálculo do índice de iodo (I.I.) por RMN H ¹	41
Equação VI	- Cálculo do índice de iodo (AOCS).....	61
Equação VII	- Cálculo da acidez.....	62
Equação VIII	- Cálculo do índice de peróxidos.....	63
Equação IX	- Cálculo da relação R _{o,a}	102

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Estrutura geral do triacilglicerol.....	4
Figura 2	- Estrutura geral de uma flavonóide e do β -tocoferol.....	21
Figura 3	- Estrutura geral da Capsaicina.....	23
Figura 4	- Estrutura molecular do curcuminóide.....	24
Figura 5	- Estrutura molecular do BHT, ácido cítrico e BHA.....	24
Figura 6	- Estrutura molecular do propil galato e do TBHQ.....	25
Figura 7	- Espectro RMN genérico de um óleo vegetal.....	38
Figura 8	- Característica geral do programa PROTEUS.....	42
Figura 9	- Estruturas tridimensionais da trioleína.....	50
Figura 10	- Espectro genérico de carbono 13 de óleo vegetal.....	51
Figura 11	- Curva TG/DTA e TG/DSC do ácido fítico.....	69
Figura 12	- Curva TG/DSC do ácido cítrico.....	70
Figura 13	- Curva TG/DSC do BHA.....	71
Figura 14	- Curva TG/DSC do BHT.....	72
Figura 15	- Curva TG/DSC do eritorbato de sódio.....	73
Figura 16	- Curva TG/DSC do propil galato.....	74
Figura 17	- Curva TG/DSC do ácido sórbico.....	74
Figura 18	- Curva TG/DSC do ácido ascórbico.....	75
Figura 19	- Curva TG/DSC da SAIB.....	76
Figura 20	- Espectro de infravermelho do óleo de canola em diferentes tempos de aquecimento.....	78
Figura 21	- Espectro de infravermelho do óleo de milho em diferentes tempos de aquecimento.....	78
Figura 22	- Espectro de infravermelho do azeite de oliva em diferentes tempos de aquecimento.....	79
Figura 23	- Espectro de infravermelho do óleo de soja em diferentes tempos de aquecimento.....	79

Figura 24 - Espectro de infravermelho do óleo de canola em diferentes tempos de aquecimento.....	80
Figura 25 - Espectro de infravermelho do óleo de milho em diferentes tempos de aquecimento.....	81
Figura 26 - Espectro de infravermelho do azeite de oliva em diferentes tempos de aquecimento.....	81
Figura 27 - Espectro de infravermelho do óleo de girassol em diferentes tempos de aquecimento.....	82
Figura 28 - Espectro de infravermelho do óleo de soja em diferentes tempos de aquecimento.....	82
Figura 29 - Fotografia do óleo de girassol polimerizado.....	83
Figura 30 - Espectro por difração de raios-x do polímero do óleo de girassol..	84
Figura 31 - Espectro UV do óleo de canola.....	86
Figura 32 - Espectro UV do óleo de milho.....	86
Figura 33 - Espectro UV do azeite de oliva.....	87
Figura 34 - Espectro UV do óleo de soja.....	87
Figura 35 - Espectro UV do óleo de canola.....	88
Figura 36 - Espectro UV do óleo de milho.....	89
Figura 37 - Espectro UV do azeite de oliva.....	89
Figura 38 - Espectro UV do óleo de girassol.....	90
Figura 39 - Espectro UV do óleo de soja.....	90
Figura 40 - Regressão linear entre os métodos: Wijs e RMN H ¹ para o índice de iodo.....	99
Figura 41 - Gráfico de comparação do índice de iodo entre os métodos de Wijs e RMN H ¹	99
Figura 42 - Espectro integrado RMN H ¹ do óleo de canola sem aquecimento e com 8 horas de aquecimento.....	107
Figura 43 - Espectro de RMN de C ¹³ do azeite de oliva desacoplado <i>in natura</i> no modo DEPT e <i>in natura</i> com 80 horas de aquecimento.....	111

LISTA DE SIGLAS

λ	- Comprimento de onda medido em nanômetros
A	- Absorbância
API	- American Petroleum Institute
AVC	- Acidente Vacular Cerebral
BHA	- Butilhidroxi Anisol
BHT	- Tercbutil-hidrotolueno
CAP	- Capsaicina
CG	- Cromatografia Gasosa
CGMS	- Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa
CLAE	- Cromatografia em Camada Líquida de Alta Eficiência
DAC	- Doença da Artéria Coronária
DFG	- German Society for Fat Research
DG	- Dodecil Galato
DNA	- Ácido Desoxi Ribonucléico
DSC	- Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	- Análise Térmica Diferencial
FTIR	- Infravermelho com Transformada de Fourier
HDL	- Lipoproteína de Alta Densidade
LDL	- Lipoproteína de Baixa Densidade
PG	- Propil Galato
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
SAIB	- Acetato Isobutirato de Sacarose
SBA	- Ácido Sórbico

- TBHT - Terc-butilhidroquinona
- TG - Termo Gravimetria
- TOS - Síndrome do Óleo Tóxico
- UV - Ultravioleta
- VLDL - Lipoproteína de Muito Baixa Densidade
- XRD - Difração por Raios-X

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Composição em ácidos graxos dos óleos de girassol (<i>Helianthus annuus</i>) e de canola (<i>Brassica campestris</i>).....	7
Tabela 2	- Teor de gordura saturada e insaturada.....	8
Tabela 3	- Nomenclatura e propriedades físicas de alguns ácidos graxos.....	8
Tabela 4	- Perfil de ácidos graxos identificados como ésteres metílicos dos triacilgliceróis do óleo de Canola.....	64
Tabela 5	- Perfil de ácidos graxos identificados como ésteres metílicos dos triacilgliceróis do óleo de Girassol (<i>Helianthus annuus</i>).....	65
Tabela 6	- Perfil de ácidos graxos identificados como ésteres metílicos dos triacilgliceróis do óleo de Milho (<i>Zea mays</i>).....	65
Tabela 7	- Perfil de ácidos graxos identificados como ésteres metílicos dos triacilgliceróis do óleo de Soja (<i>Glycine max</i>).....	66
Tabela 8	- Perfil de ácidos graxos identificados como ésteres metílicos dos triacilgliceróis do azeite de oliva (<i>Olea europea</i>).....	66
Tabela 9	- Análise físico-química do óleo de Canola.....	95
Tabela 10	- Análise físico-química do óleo de Milho.....	95
Tabela 11	- Análise físico-química do azeite de Oliva.....	95
Tabela 12	- Análise físico-química do óleo de Soja.....	96
Tabela 13	- Análise físico-química do óleo de Canola.....	96
Tabela 14	- Análise físico-química do óleo de Milho.....	96
Tabela 15	- Análise físico-química do azeite de Oliva.....	97
Tabela 16	- Análise físico-química do óleo de Girassol.....	97
Tabela 17	- Análise físico-química do óleo de Soja.....	97
Tabela 18	- Índice de iodo determinado por RMN de H ¹ e pelo método de Wijs em amostras de óleos vegetais <i>in natura</i> e sob aquecimento.....	98
Tabela 19	- Índice de iodo determinado por RMN de H ¹ em amostras vegetais aquecidos em diversos tempos de aquecimento.....	100

Tabela 20 - Perfil de hidrogênios dos triacilgliceróis, obtido da curva de integração do espectro de RMN de H^1 do óleo de canola.....	104
Tabela 21 - RMN de H^1 dos óleos vegetais na segunda fase de aquecimento..	104
Tabela 22 - RMN de H^1 de óleos vegetais na primeira fase de aquecimento.....	105
Tabela 23 - Deslocamentos químicos de C^{13} do óleo de óleos vegetais sob diferentes tempos de aquecimento.....	109
Tabela 24 - Deslocamentos químicos de C^{13} do óleo de canola sob diferentes tempos de aquecimento.....	110

RESUMO

Neste trabalho foram estudados os seguintes óleos vegetais: canola, milho, oliva, girassol e soja; *in natura* e sob estresse térmico: 28 horas (4h/dia) e 80 horas (8h/dia) a 180 – 200°C.

A qualidade dos óleos foi monitorada por técnicas analíticas (determinação dos índices de acidez, iodo, peróxidos e cromatografia gasosa) e espectroscópicas (UV-vis, FTIR, RMN de H¹ e C¹³). Também foi avaliada a estabilidade térmica dos seguintes antioxidantes: propil galato (PG), acetato isobutirato de sacarose (SAIB), terc-butilhidroxitolueno (BHT), ácido cítrico, butil-hidroxianisol (BHA), ácido fítico, ácido ascórbico, eritorbato de sódio e ácido sórbico (SBA), por análise térmica.

Os resultados indicaram que os antioxidantes mais termo-resistentes foram o propil galato (PG) e a acetato isobutirato de sacarose (SAIB); a cromatografia gasosa é útil na determinação do perfil de ácidos graxos do triacilglicerol dos óleos *in natura*; os índices de acidez e peróxidos aumentam com a progressiva deterioração térmica dos óleos. A espectroscopia de UV-vis e FTIR são ferramentas importantes na análise dos óleos *in natura* e sob estresse térmico, pois revelam as alterações envolvidas. A RMN H¹ mostrou-se essencial no controle de qualidade de óleos, pois permite determinar o índice de iodo, o peso molecular (PM) médio do triacilglicerol, o grau de insaturação e o estado de oxidação do óleo *in natura* e sob qualquer tempo de aquecimento. Igualmente a RMN de C¹³ mostrou-se muito útil no controle de qualidade, pois mostra variações significativas no perfil dos δ C¹³ dos óleos *in natura* e sob estresse térmico. As análises espectroscópicas revelaram que sob estresse térmico, os óleos vegetais mais estáveis com aquecimento de 4 horas/dia, por 7 dias foram os óleos de soja, milho, canola e oliva. E com aquecimento de 8 horas/dia, por 10 dias, foram os óleos de canola, milho, oliva, soja e girassol.

Os resultados mostram que as técnicas espectroscópicas - rápidas, sensíveis e precisas – são ferramentas imprescindíveis no controle de qualidade dos óleos vegetais.

Palavras-chave: óleos vegetais, estresse térmico, oxidação térmica, análises espectroscópicas

ABSTRACT

In this work the following vegetal oils had been studied: canola, maize, olive, sunflower and soybean; *in natura* and under stress thermal: 28 hours (4h/day) and 80 hours (8h/day) the 180 - 200C.

The quality of oils was monitored by analytical techniques (determination of the acid, iodine, peroxides values and gaseous chromatography) and spectroscopic technique (UV-vile, FTIR, RMN H¹ and C¹³). Also the thermal stability of following antirust substances was evaluated: propil galato (PG), sucrose acetate isobutirato (SAI), butil-hidroxitolueno (BHT), citric acid, butil-hidroxianisol (BHA), fitic acid, ascorbic acid, sodium eritorbat and sorbic acid (SBA), for thermal analysis.

Our results had indicated that the antirust substances thermal resistant had been the propil galato (PG) and sucrose acetate isobutirato (SAI); the gaseous chromatography is useful in the determination of the profile of triacylglycerol of oils *in natura*; the acid values and peroxides increase with the progressive thermal deterioration of oils. The FTIR and spectroscopy UV-vile are useful in the analysis of oils *in natura* and under it stress thermal, therefore they disclose the alterations involved. The results of RMN H¹ are extremely useful in the quality control of oils, therefore it allows to determine the iodine index, the molecular weight (PM) average of triacilglicerol, the degree of insaturação and the degree of oxidation of the oil *in natura* and under any warm up time. Equally the RMN of C¹³ reveals useful in the quality control, therefore *natura* shows to significant variations in the profile of δ the C¹³ of oils *in* and under it stress thermal. The spectroscopic analyses had shown that under it stress thermal, the vegetal oils that better resist the heating (lesser deterioration) had been: canola, soybean, maize, olive and sunflower.

Our results show that the spectroscopic techniques - fast, sensible and necessary - are powerful tools in the quality control of vegetal oils.

Keywords: vegetal oils, stress thermal, thermal oxidization, spectroscopic analyses

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1	ÓLEO E GORDURAS.....	4
2.1.1	Composição dos óleos e gorduras.....	6
2.1.2	Comportamento dos óleos vegetais sob estresse térmico.....	9
2.1.3	Antioxidantes.....	19
2.1.4	Fisiopatologia dos óleos termo-oxidados.....	26
2.1.5	Controle de qualidade dos óleos vegetais.....	33
2.2	OBJETIVO GERAL.....	55
2.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	55
3	MATERIAL E MÉTODOS	56
3.1	MATERIAL.....	56
3.2	MÉTODOS.....	58
3.2.1	Cromatografia gasosa.....	58
3.2.2	Análise térmica.....	59
3.2.3	Análise por espectroscopia de infravermelho.....	60
3.2.4	Análise por espectroscopia de ultravioleta.....	60
3.2.5	Análise por difração de raios X (XRD).....	60
3.2.6	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 e carbono-13.....	60
3.2.7	Caracterização físico-química dos óleos vegetais.....	61
3.2.7.1	Determinação do índice de iodo.....	61
3.2.7.2	Determinação da Acidez.....	62
3.2.7.3	Determinação do Índice de Peróxido.....	62
3.2.8	Estresse térmico dos óleos vegetais.....	63
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	64
4.2	ANÁLISE TÉRMICA.....	68
4.3	ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE INFRAVERMELHO.....	77
4.4	ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X.....	83
4.5	ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA POR ULTRAVIOLETA-VISÍVEL.....	85
4.6	ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS VEGETAIS.....	93
4.6.1	Índice de Acidez e Peróxido.....	93
4.6.2	Índice de Iodo (RMN e Wijs).....	98
5	CONCLUSÕES	112
	REFERÊNCIAS	114
	ANEXO A: Publicações	128

1 INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais representam um dos principais produtos extraídos de plantas da atualidade (FARIA; LELES; IONASHIRO, et al., 2002) e cerca de dois terços são usados em produtos alimentícios fazendo parte da dieta humana (MALAYSIAN..., 2002). Os lipídeos, juntamente com as proteínas e os carboidratos, são fontes de energia, apresentando grande importância para a indústria, na produção de ácidos graxos, glicerina, lubrificantes, carburantes, biodiesel, além de inúmeras outras aplicações (COSTA NETO, 1993; FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2003).

Os óleos vegetais são constituídos principalmente de triacilgliceróis (> 95 %) e pequenas quantidades de mono e diacilgliceróis (LEHNINGER, 1995).

A obtenção do óleo vegetal bruto, é feita por meio de métodos físicos e químicos sobre as sementes de oleaginosas usando-se um solvente como extrator e prensagem (GONÇALVES; BATISTA; MEIRELLES, 2002; MORETTO; FETT, 1998; MORETTO; FETT; GONZAGA, et al., 2002). Nesta fase, o óleo vegetal contém impurezas como ácidos graxos livres, prejudiciais à qualidade e estabilidade do produto, sendo necessário remover estas impurezas, pelos processos de refino que envolve a remoção do solvente, a degomagem, o branqueamento, a desacidificação e a desodorização (BATISTA; MONNERAT; KATO, et al., 1999).

O uso cotidiano dos óleos vegetais, consagrados entre a população, levou a necessidade de se avaliar melhor o seu grau de resistência, principalmente a sua estabilidade ao armazenamento e estresse térmico. Questões como a que temperatura os óleos comestíveis se decompõem e que produtos são formados quando submetidos ao aquecimento devem ser investigadas.

Na população em geral, é um procedimento comum o consumo de óleos e gorduras, mesmo após terem sido submetidos a altas temperaturas em processos de fritura.

Na fritura, observa-se um processo simultâneo de transferência de calor e massa. O calor é transferido do óleo para o alimento; a água que evapora do alimento é absorvida pelo óleo. Assim, os fatores que afetam a transferência de calor e massa, afetam as propriedades térmicas e físico-químicas do óleo e do alimento (MONGHARBEL, 2002). O processo de fritura é realizado em recipientes abertos, à temperatura elevada (180 – 200°C), em contato direto com o ar . Estas condições provocam modificações físico-químicas nos óleos (termo-oxidação, rancificação), algumas das quais são visíveis como o escurecimento, aumento da viscosidade, formação de espuma e fumaça. Essas transformações afetam as características sensoriais do óleo em uso e influenciam na aceitabilidade do produto frito, além de produzirem efeitos tóxicos como irritação gastrointestinal, inibição de enzimas, destruição de vitaminas e carcinogênese, quando da ingestão contínua e prolongada de produtos rancificados (FRITSCH, 1981; DOBARGANES; PEREZ-CAMINO, 1988; STEVENSON; VAISEY-GENSER; ESKIN, 1984).

O uso de óleos vegetais *in natura* na culinária vem aumentando entre a população, que busca nos tempos atuais, hábitos alimentares mais saudáveis como o consumo de óleos comestíveis ricos em triacilgliceróis insaturados.

Os óleos e gorduras constituem os principais componentes dos alimentos insolúveis em água, possuindo poucos sítios reativos na molécula, de modo que a ocorrência de reações (rancificação) durante o processamento e armazenamento do alimento é menos variada que as de compostos solúveis em água como carboidratos e proteínas (ARAÚJO, 1999).

As reações de rancificação podem ser resumidas como reações de auto-oxidação, envolvendo a formação de radicais livres, responsáveis pela deterioração dos óleos e gorduras. Em resposta a isso, surgiu uma série de antioxidantes de diversos tipos com o propósito de prolongar a vida útil dos óleos vegetais durante o seu armazenamento e prevenir as reações de rancificação. Com isso, fornecem ao consumidor um alimento seguro e agradável ao paladar (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992).

Portanto, faz-se necessário realizar estudos sobre a estabilidade de óleos submetidos a estresse térmico prolongado, pois óleos de frituras reutilizados deterioram a qualidade dos alimentos e são potencialmente nocivos à saúde do consumidor.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ÓLEOS E GORDURAS

Os óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água (hidrofóbicas), de origem animal ou vegetal, formados predominantemente por ésteres de triacilgliceróis, produtos resultantes da esterificação entre o glicerol e ácidos graxos (MORETTO; FETT, 1998). Os triacilgliceróis (Figura 1) são compostos insolúveis em água e a temperatura ambiente, possuem uma consistência de líquido para sólido. Quando estão sob forma sólida são chamados de gorduras e quando estão sob forma líquida são chamados de óleos (GIESE, 1996; FARIA; LELES ; IONASHIRO, et al., 2002). Além de triacilgliceróis, os óleos contêm vários componentes em menor proporção, como mono e diglicerídeos (importantes como emulsionantes); ácidos graxos livres; tocoferol (importante antioxidante); proteínas, esteróis e vitaminas (FARIA; LELES; IONASHIRO, et al, 2002; HIDALGO; ALAIZ; ZAMORA, 2001).

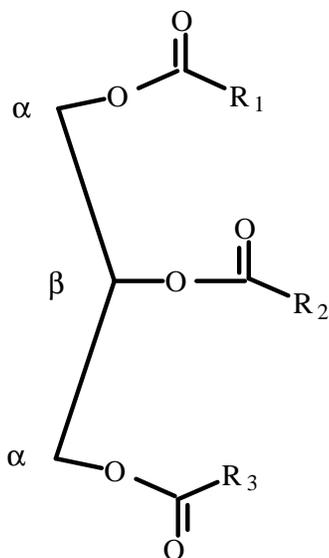


Figura 1 - Estrutura geral de um triacilglicerol [R₁, R₂, R₃ = grupo alquil saturado ou insaturado; podendo ser igual ou diferente].

Segundo Fennema (2000), os óleos oriundos de frutos, como o azeite de oliva, são denominados azeites. Denominação que será empregada neste trabalho.

Os óleos vegetais, possuem de uma a quatro insaturações (ligações duplas) na cadeia carbônica, sendo líquidos à temperatura ambiente; as gorduras são sólidas à temperatura ambiente, devido a sua constituição em ácidos graxos saturados (MORETTO; FETT; GONZAGA, et al., 2002).

Assim, gorduras animais como a banha, o sebo comestível e a manteiga, são constituídas por misturas de triacilgliceróis, que contém um número de saturações maior do que o de insaturações, conferindo-lhes maior ponto de fusão (sólidos à temperatura ambiente) (FENNEMA, 2000). De maneira análoga, os óleos por possuírem um número maior de insaturações, expressam menor ponto de fusão (líquidos à temperatura ambiente) (GIESE, 1996 FARIA; LELES ; IONASHIRO, et al., 2002).

A maioria dos ácidos graxos de óleos comestíveis possuem uma cadeia carbônica de 16 a 18 carbonos, embora o óleo de côco contenha um alto grau de ácido láurico com 12 átomos de carbono na sua constituição (ZALIHA; CHONG; CHEOW, et al., 2003).

2.1.1 Composição dos óleos e gorduras

Os óleos e gorduras apresentam como componentes, substâncias que podem ser reunidas em duas grandes categorias: a) glicerídeos e b) não-glicerídeos.

a) glicerídeos: são definidos como produtos da esterificação de uma molécula de glicerol com até três moléculas de ácidos graxos. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos de cadeia longa, livres ou esterificados, constituindo os óleos e gorduras (MORETTO; FETT; GONZAGA, et al., 2002). Quando saturados possuem apenas ligações simples entre os carbonos e possuem pouca reatividade química. Já os ácidos graxos insaturados, contêm uma ou mais ligações duplas no seu esqueleto carbônico; são mais reativos e mais suscetíveis a termoxidação (GIESE, 1996). Na Tabela 1, são apresentados os ácidos graxos presentes nos óleos de girassol e canola; na Tabela 2, o teor de gordura saturada e insaturada e o teor em ácidos graxos em alguns óleos vegetais estudados neste trabalho e na Tabela 3, a nomenclatura e propriedades físicas de alguns ácidos graxos.

b) não-glicerídeos: em todos os óleos e gorduras, encontramos pequenas quantidades de componentes não-glicerídeos (MORETTO; FETT, 1998). Os óleos vegetais brutos possuem menos de 5% e os óleos refinados menos de 2%. No refino, alguns desses componentes são removidos completamente, outros parcialmente. Aqueles que ainda permanecem no óleo refinado, ainda que em traços, podem afetar as características dos óleos devido a alguma propriedade peculiar, como apresentar ação pró ou antioxidante, ser fortemente odorífero, ter sabor acentuado ou ser altamente colorido (MORETTO; FETT; GONZAGA, et al., 2002). Alguns exemplos de grupos não-glicerídeos são os

fosfatídeos (lecitinas, cefalinas, fosfatidil inositol); esteróis (estigmasterol); ceras (palmitato de cetila); hidrocarbonetos insolúveis (esqualeno); carotenóides; clorofila; tocoferóis (vitamina E); lactonas e metilcetonas (FARIA; LELES ; IONASHIRO, et al., 2002).

Tabela 1 - Composição em ácidos graxos dos óleos de girassol (*Helianthus annuus*) e de canola (*Brassica campestris*).

Ácidos Graxos (%)	Óleo de girassol (<i>Helianthus annuus</i>)	Óleo de canola (<i>Brassica campestris</i>)
12:0	0,0 – 0,1	0,1
14:0	0,0 – 0,2	0,2
16:0	5,0 – 8,0	1,5 – 6,0
16:1	0,0 – 0,3	0,0 – 3,0
18:0	2,5 – 7,0	0,5 – 3,1
18:1	13 – 40	8,0 – 60
18:2	48 – 74	11 – 23
18:3	0,0 – 0,3	5,0 – 13
20:0	0,2 – 0,5	0,0 – 3,0
20:1	0,0 – 0,5	3,0 – 15
20:2	–	0,0 – 1,0
22:0	0,5 – 1,3	0,0 – 2,0
24:0	0,0 – 0,4	0,0 – 2,0
24:1	–	0,0 – 3,0

FONTE: FIRESTONE, 1999.

Tabela 2 - Teor de ácidos graxos em óleos vegetais.

Óleos	Ácido graxo saturado	Ácido graxo monoinsaturado	Ácido graxo poliinsaturado	
			ac. linoléico	ac. Linolênico
CANOLA	6%	58%	26%	10%
GIRASSOL	11%	2%	69%	—
MILHO	13%	25%	61%	1%
OLIVA	14%	77%	8%	< 1%
SOJA	15%	24%	54%	7%

FONTE: MORETTO; FETT, 1998; Modificado.

Tabela 3 - Nomenclatura e propriedades físicas de alguns ácidos graxos

Ácido	Símbolo	Ponto de fusão (°C)
Butírico (butanóico)	4:0	- 4,2
Capróico (hexanóico)	6:0	- 3,4
Caprílico (octanóico)	8:0	16,7
Cáprico (decanóico)	10:0	31,6
Láurico (dodecanóico)	12:0	44,2
Mirístico (tetradecanóico)	14:0	54,4
Palmítico (hexadecanóico)	16:0	62,9
Esterárico (octadecanóico)	18:0	69,6
Araquídico (eicosanóico)	20:0	75,4
Behênico (docosanóico)	22:0	80,0
Lignocérico (tetracosanóico)	24:0	84,2
Oléico (9(Z)-octadecenóico), (ω -9)	18:1 ⁹	16-17
Linoléico (9(Z),12(Z)-octadecadienóico, (ω -6)	18:2 ⁶	5,0
Linolênico (9(Z),12(Z),15(Z) - octadecatrienóico, (ω -3)	18:3 ³	11,0

FONTE: UIEARA, 2004

2.1.2 Comportamento dos óleos vegetais sob estresse térmico

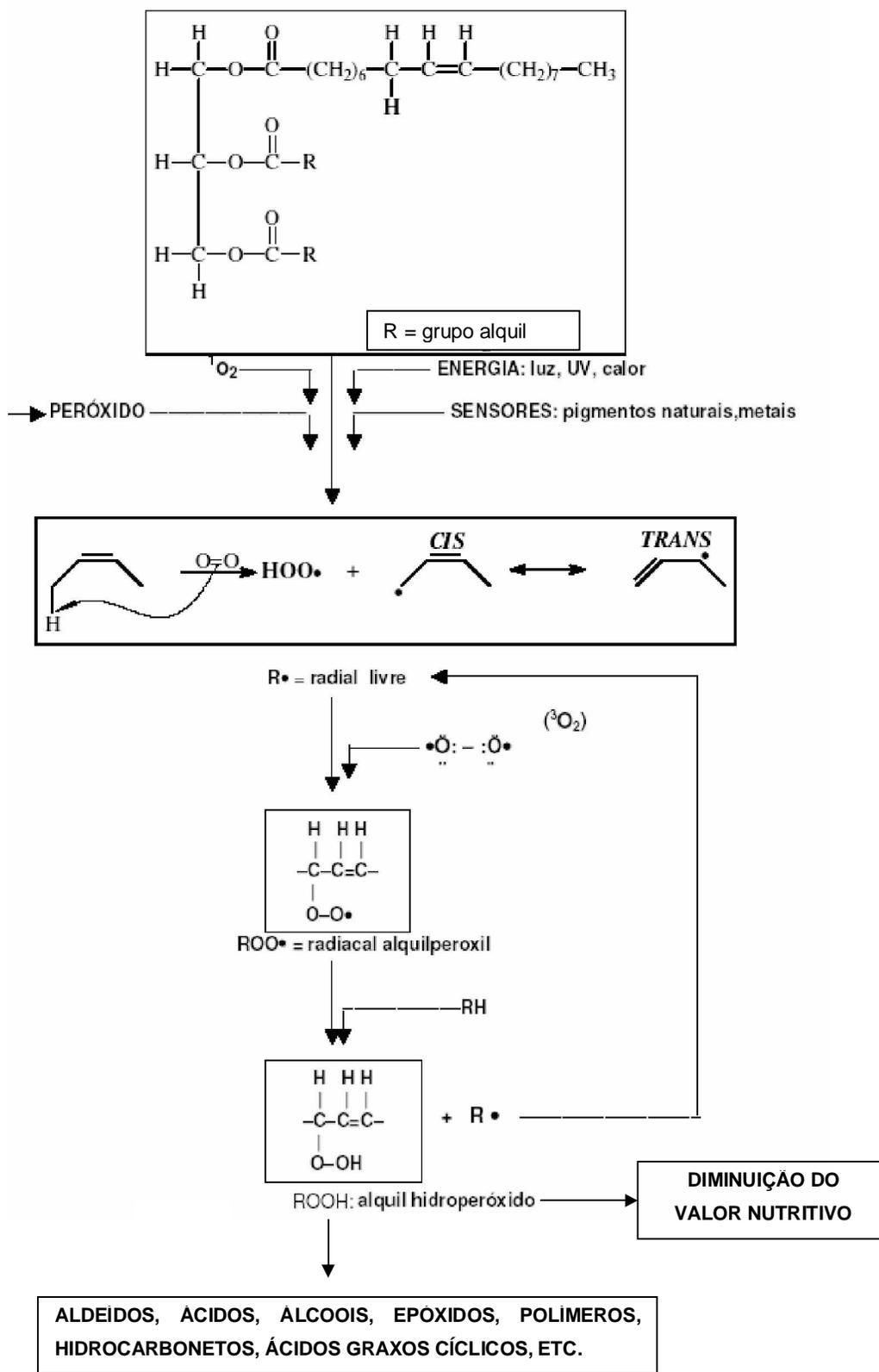
Sabe-se que alimentos contendo óleos e gorduras deterioram durante o armazenamento em atmosfera de oxigênio, devido à auto-oxidação. Mas quando eles são aquecidos a altas temperaturas, o processo da oxidação é acelerado, ocorrendo reações de oxipolimerização e decomposição termo-oxidativa (KOVALSKI, 1990; DOBARGANES; ÉREZ-CAMINO; MÁRQUEZ-RUIZ, 1989). Isto também pode ser observado durante as fases de refino dos óleos vegetais (GOMES; CAPONIO; DELCURATOLO, 2000). Segundo Hellín e Pilar Rueda (1984), as modificações e alterações dos óleos e gorduras, podem ser classificadas como:

- a) auto-oxidação: oxidação que ocorre a temperaturas abaixo de 100°C;
- b) polimerização térmica: oxidação que ocorre a temperaturas que variam entre 200 e 300°C, na ausência de oxigênio;
- c) oxidação térmica: oxidação que ocorre na presença de oxigênio a altas temperaturas (oxipolimerização);
- d) modificações físicas: modificações que ocorrem nas propriedades físicas;
- e) modificações nutricionais: modificações nos aspectos fisiológicos e nutricionais dos óleos;
- f) modificações químicas, que podem ser de três tipos (ARAÚJO, 1999):
 - hidrólise dos triacilgliceróis: resulta na liberação de ácidos graxos, glicerina, mono e diglicerídeos;
 - oxidação: ocorre nos ácidos graxos com ligações duplas;
 - polimerização: extensa condensação de monômeros de ácidos graxos polinsaturados a altas temperaturas por períodos prolongados.

Há alguns anos, aumentou o interesse sobre os efeitos fisiológicos que os óleos e gorduras aquecidos a elevadas temperaturas, principalmente na presença de ar, exercem sobre o organismo humano (PÉREZ-CAMINO; MÁRQUEZ-RUIZ; SALGADO RAPOSO, et al., 1998). No processo de fritura, o alimento é submerso em óleo quente, que age como meio de transferência de calor (HELLÍN; PILAR RUEDA, 1984). Deve-se ainda considerar que parte do óleo utilizado para a transferência de calor é absorvido pelo alimento e torna-se parte da dieta, exigindo-se óleos de boa qualidade no preparo dos alimentos e que permaneçam estáveis por longos períodos de tempo (VARELA; MAREIRAS-VARELA; RUIZ-ROSO, 1983). Durante o aquecimento do óleo no processo de fritura, uma complexa série de reações produz numerosos compostos de degradação. Com o decorrer das reações, as qualidades funcionais, sensoriais e nutricionais se modificam (FARIA; LELES; IONASHIRO, et al., 2002). Quando o alimento é submerso no óleo quente em presença de ar, o óleo é exposto a três agentes que causam mudanças em sua estrutura: água, proveniente do próprio alimento, que leva a alterações hidrolíticas; oxigênio que entra em contato com o óleo e a partir de sua superfície leva a alterações oxidativas e finalmente, a temperatura em que o processo ocorre, resultando em alterações térmicas, como isomerização e reações de cisão (aldeídos e cetonas), formando diversos produtos de degradação, como epóxidos e hidroperóxidos (MORETTO; FETT, 1998). Portanto, as formas de deterioração de óleos vegetais são a hidrólise, a oxidação, e a polimerização (MORETTO; FETT; GONZAGA, et al., 2002). Sendo a oxidação a principal causa de deterioração, ela provoca alterações do sabor, textura, aroma e da cor nos alimentos, ocasionando perda do valor nutricional e gerando toxidez (FENNEMA, 2000). Um esquema geral sobre estas alterações é mostrado no Esquema 1.

A estabilidade térmica dos óleos depende de sua estrutura química: óleos com ácidos graxos saturados são mais estáveis do que os insaturados. Como estes óleos são muito utilizados na culinária e na indústria, tem-se exigido de pesquisadores e técnicos especializados, novos métodos analíticos capazes de avaliar as condições de processamento e estocagem, sendo, portanto, de fundamental importância o conhecimento da estabilidade térmica dos óleos vegetais para um rigoroso controle de qualidade (ARAÚJO, 1999). Segundo a German Society for Fat Research (DGF), por exemplo, o óleo de fritura é considerado deteriorado se a acidez estiver acima de 1%. O que está de acordo com o proposto por Lima e Gonçalves (1995).

Esquema 1 - Alterações oxidativas de óleos vegetais insaturados em alimentos.



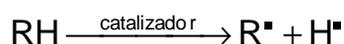
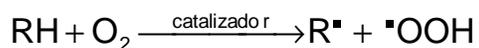
FONTE: ARAÚJO, 1999; Modificado.

Um dos principais fatores que determinam a estabilidade de uma substância, é a sua estrutura molecular (MINN, 1985). Nos óleos vegetais, as insaturações presentes na cadeia carbônica são um alvo de ataque importante de agentes oxidantes como radicais livres, enzimas, metais que atuam como catalisadores de processos oxidativos e da foto-oxidação (MORETTO; FETT, 1998).

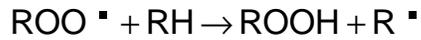
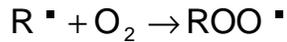
No Esquema 1, o hidrogênio alílico do fragmento do ácido graxo insaturado presente no triacilglicerol (o hidrogênio, do carbono vizinho ao carbono da ligação dupla) é removido pelo oxigênio singlete [$^1\text{O}_2$], ativado termicamente (fase de indução) (MINN, 1985). Em seguida o radical alila formado (derivado do fragmento do ácido graxo insaturado) reage rapidamente com o oxigênio formando o radical alquilperóxil que abstrai hidrogênio alílico de outro fragmento alquil dando seqüência a reação de propagação da cadeia e formando o derivado alquilhidroperóxido. Os peróxidos e hidroperóxidos são clivados, formando compostos de oxidação secundária como aldeídos e cetonas (ADHVARYU; ERHAN; LIU, et al., 2000; ESPÍN; SOLER-RIVAS; WICHERS, 2000), responsáveis pelo odor desagradável (ranço) (KUBOW, 1990), como é mostrado no Esquema 2.

Esquema 2 - Mecanismo de formação de radicais livres.

1 ° passo: iniciação

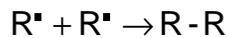


2 ° passo: propagação



- reação em cadeia
- alto consumo de oxigênio
- rápido aumento do índice de peróxido

3 ° passo: término



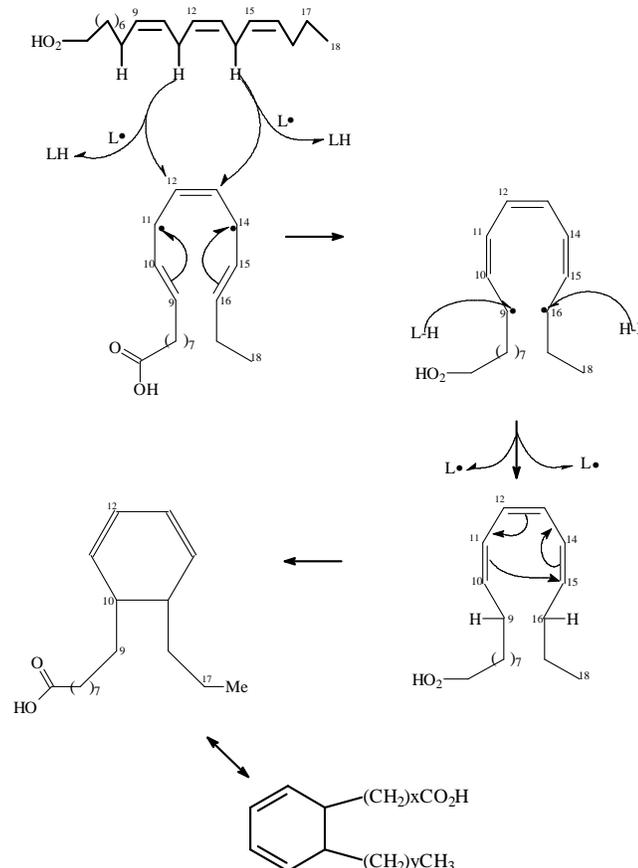
FONTE: LOURY, 1970.

Como a reação de oxidação pode ser definida como o processo de adição de oxigênio ou remoção de hidrogênio ou elétrons, tal reação pode ser acelerada pelo calor, luz (fotoxidação), ionização, traços de metais (Cu e Fe), metaloproteínas e pela enzima lipoxigenase. Um dos mecanismos mais importantes é o da fotoxidação. É um mecanismo independente da formação de radicais livres e da pressão de oxigênio e depende de “sensores” como a clorofila e a mioglobina. Não apresenta período de indução e na presença de luz e oxigênio, transferem energia para a formação de peróxido. Sua principal contribuição à alteração dos óleos e gorduras, está na mudança da configuração da insaturação de *cis* para *trans* (ARAÚJO, 1999; SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998).

Contudo, nos óleos e gorduras de origem vegetal os isômeros *trans* estão praticamente ausentes. Exceto uma pequena quantidade residual que permanece durante a fase de hidrogenação, o que é inevitável. Em alguns produtos como margarinas, porém, foram encontrados valores de ácidos-*trans* excessivamente

elevados (~25%) (BARRERA-ARELLANO; BLOCK, 1993). Durante o refino do óleo, é possível que traços de resíduos indesejáveis como os isômeros *trans* e monômeros cíclicos de ácidos graxos estejam presentes (Esquema 3). No refino do óleo de colza (rico em ácido erúcido, [22:1]), na fase de desodorização são produzidos isômeros *trans* numa porcentagem superior a 5% do total de ácidos graxos do óleo e uma quantidade de monômeros cíclicos de ácidos graxos em torno de 650 mg/kg de óleo, quando condições severas são usadas (5–6h a 250°C). O principal responsável pela formação destes monômeros é alta concentração do ácido linolênico e que sob aquecimento prolongado e por um período de tempo longo, sofre ciclização por meio da reação de Diels–Alder (LAMBELET; GRANDGIRARD; GRAGOIRE, et al, 2003; SOLOMONS,1996).

Esquema 3 - Mecanismo de formação de um monômero cíclico do ácido linolênico.

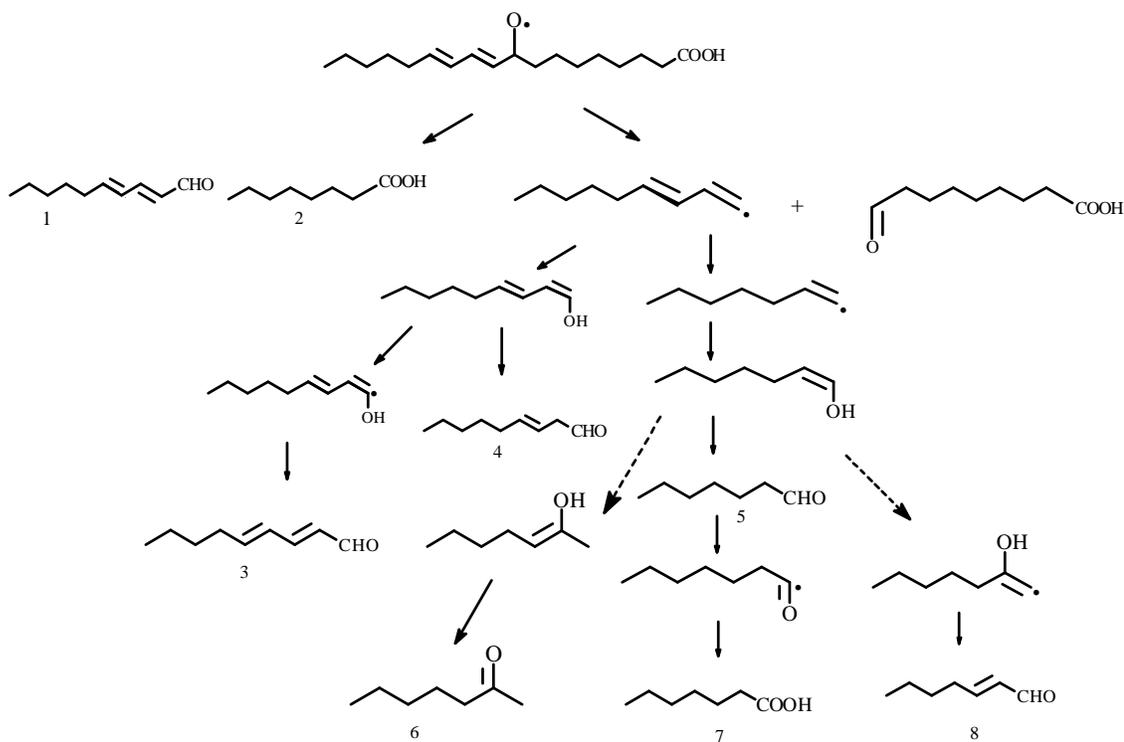


FONTE: MELTZER; FRANKEL; BESSLER, et al., 1981; SOLOMONS, 1996.

Os monômeros cíclicos são compostos resultantes da oxidação dos óleos vegetais e fazem parte dos resíduos não-voláteis. Os monômeros mais comuns, provêm de ácidos graxos com 18 carbonos, poliinsaturados, que ciclizam e sofrem uma dupla substituição no anel (MELTZER; FRANKEL; BESSLER, et al., 1981). A formação de monômeros cíclicos é mais pronunciada nos aquecimentos intermitentes dos óleos vegetais. Dependendo das condições de aquecimento, a concentração de monômeros cíclicos varia de 736 ppm (0,07%) a 1803 ppm (0,18%) no óleo aquecido (ROJO; PERKINS, 1987). Outra preocupação é a formação de polímeros. Há duas classes de polímeros: os polímeros oxidativos e os polímeros térmicos, formados por degradação térmica, que indicam degradação dos óleos vegetais (WALTKING; SEERY; BLEFFERT, 1972).

Uma outra alteração sensível, é a rancidez hidrolítica muito comum durante o armazenamento de alimentos, onde a fração lipídica presente é lentamente hidrolisada pela água à temperatura elevada ou por enzimas lipolíticas. Tipicamente, ácidos graxos contendo de quatro a dez carbonos, conferem reversão do sabor em alimentos, como sabor de sabão, por exemplo, inerente à hidrólise dos azeites de coco e dendê em alimentos de confeitaria (ARAÚJO,1999). Além disso, hidroperóxidos são formados em óleos vegetais que possuem alto teor de ácidos graxos poliinsaturados, durante a estocagem, na presença de traços de oxigênio. Isso resultará também numa reversão do sabor do óleo pela formação de produtos voláteis, resultantes do processo de degradação de hidroperóxidos termolábeis em radicais alcoxil (Esquema 4).

Esquema 4 - Produtos da termo-oxidação do ácido linoléico (18:2^{9,12}).



Legenda: 1 = 2,4-decadienal; 2 = ácido octanóico; 3 = 2,4-nonadienal; 4 = 3-nonenal; 5 = heptanal; 6 = 2-heptanona; 7 = ácido heptanóico; 8 = 2-heptenal.

FONTE: KESZLER; KRISKA; NÉMETH, 2000.

Por exemplo, a formação de hidroperóxidos e dienos conjugados, está relacionada à baixa na concentração de α -tocoferóis (DEIANA; ROSA; CAO, et al., 2002). Logo, a formação de hidroperóxidos e dienos conjugados, alvos fáceis de ataques por radicais livres, formados sob altas temperaturas, deterioram o óleo, tornando-o impróprio para o consumo (BRENES; GARCIA; DOBARGANES, et al., 2002).

Dentre os fatores que influenciam as alterações que surgem nos óleos durante a fritura, alguns têm maior influência:

- a) o efeito da temperatura: em temperaturas superiores a 200°C há decomposição máxima dos óleos;

- b) aquecimento intermitente: onde a formação de peróxidos durante o aquecimento e sua decomposição durante o ciclo de resfriamento, produzem muitos radicais livres e por conseguinte, severa deterioração dos óleos;
- c) efeito da razão superfície / volume: quanto maior a superfície de contato do óleo com o ar, maior será a sua deterioração;
- d) efeito da adição de óleo fresco: ao se colocar óleo fresco sobre o óleo de fritura, acelera sua decomposição (HELLÍN; CLAUSSEL; 1984; VARELA; MAREIRAS-VARELA; RUIZ-ROSO, 1983).

2.1.3 Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que impedem ou minimizam a formação de compostos como peróxidos, aldeídos, cetonas, dímeros e polímeros, produtos formados por termo-oxidação de óleos e gorduras, impedindo a etapa inicial da auto-oxidação, a formação de radicais livres, removendo-os do meio. Com isso, preservam os alimentos, previnem a reversão do sabor e retardam a deterioração por rancificação e descoloração (FOOD TECHNOLOGY, 1994; SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992; WAYNER; BURTON; INGOLD, et al 1985). Isto se deve à propriedade dos antioxidantes - especialmente os derivados fenólicos - de estabilizar o radical livre, por deslocalização eletrônica no anel aromático (efeito de ressonância) e assim impedir a propagação de reações radicalares oxidativas no meio (ESPÍN; SOLER-RIVAS; WICHERS, 2000; LITWINIENKO; KASPRZYCKA; JAMENEK, 1999). Dentre os principais antioxidantes fenólicos, encontram-se os tocoferóis e os flavonóides (Figura 2). Ambos os antioxidantes encontram-se distribuídos livremente na natureza.

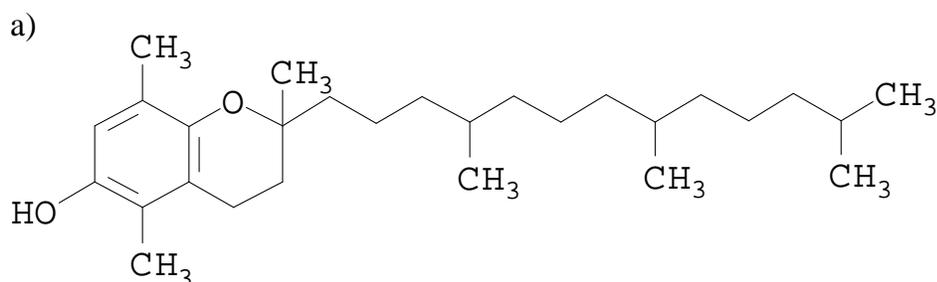
Os tocoferóis são antioxidantes monofenólicos que ajudam a estabilizar a maioria dos óleos vegetais e são classificados em oito diferentes compostos pertencendo a duas famílias distintas: os tocóis e os tocotrienóis, tendo como prefixos as letras gregas α , β , γ e δ dependendo do número e da posição dos grupos metil ligados ao anel aromático. São chamados de α , β , γ ou δ -tocoferóis, sendo que a atividade antioxidante decresce do δ para o α -tocoferol (MELO; GUERRA, 2002).

Os flavonóides são antioxidantes polifenólicos, ocorrendo em células vivas, amplamente na natureza, na forma de glicosídeos, sendo considerados potentes antioxidantes. Constituem-se em aceptores de radicais livres, clivam ligações

hidroperóxidos e quelam metais considerados pró-oxidantes como o Zn, Cu e o Fe (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992). Podem ser extraídos das mais variadas fontes como do *Citrus paradisi*, de onde se extrai a naringina, um flavonóide presente na casca deste citro (GIANNUZZO; NAZARENO; MISHIMA, et al., 2000). Num estudo feito por Pereira e Das (1990), avaliou-se a ação antioxidante de vários derivados flavonóides (Figura 2), em que a miricetina foi o flavonóide mais eficaz.

Em relação à ação de destruir radicais livres provenientes da peroxidação lipídica, os flavonóides são consagrados os mais eficazes (HANASAKI; OGAWA; FUKUI, 1993; HERTOOG; FESKENS; HOLLMAN, et al., 1993).

De outro lado, diversos antioxidantes sintéticos como o BHA, TBHQ, etc., são utilizados na conservação de óleos vegetais estocados (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992). Segundo Bors; Heller; Michel, et al., (1990), o BHT (hidroxitolueno butilado), antioxidante sintético, tem sua ação antioxidante devido a presença de grupos ativadores no anel aromático, *orto* e *para* substituídos, contribuindo para a melhor deslocalização de elétrons e estabilização de radicais livres, formados nos processos oxidativos.



b)

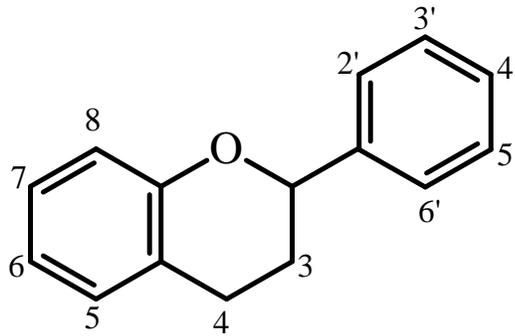


Figura 2 – a) estrutura do β -tocoferol; b) estrutura geral de um flavonóide;

Antioxidantes como os flavonóides e tocoferóis, apresentam estrutura complexa (LITWINIENKO; KASPRZYCKA; JAMENEK, 1999) e sua atividade antioxidante depende dos grupos hidroxil presentes em sua estrutura.

A presença de grupos alquila (ativadores) na posição *para* no anel aromático, favorecem a deslocalização eletrônica e a estabilização dos radicais fenoxil formados durante a reação (I):



onde:

LOOH e LOO^\bullet = hidroperóxidos de lipídeos e radicais peróxidos de lipídeos

PhOH e PhO^\bullet = antioxidante fenólico e radical fenoxil formado

Isto mostra que a estrutura do antioxidante é fundamental para a atividade antioxidante (atividade protetora), minimizando os efeitos tóxicos da decomposição termo-oxidativa de ácidos graxos insaturados (LITWINIENKO; KASPRZYCKA-GUTTMAN, 1998).

Diversos aspectos da oxidação lipídica têm sido investigados como meio de se estudar mecanismos cada vez mais avançados de análise e controle de qualidade dos alimentos (WAYNER; BURTON; INGOLD et al 1985). Assim, segundo Shahidi e Wanasundara (1992), os antioxidantes podem ser agrupados da seguinte maneira:

- a) eliminadores de radicais livres;
- b) quelantes de íons metálicos;
- c) clareadores de oxigênio: reagem com o oxigênio em sistemas fechados;

Mas de acordo com sua natureza, os antioxidantes podem ser classificados como:

- a) antioxidantes primários: reagem com radicais lipídicos altamente energéticos, convertendo-os em produtos termodinamicamente mais estáveis. Ex.: antioxidantes fenólicos;
- b) antioxidantes secundários: também conhecidos como antioxidantes preventivos, agem por retardar a velocidade de formação da cadeia de iniciação de radicais lipídicos, por destruir os hidroperóxidos formados. Ex.: ácido tiopropiônico (SÁNCHEZ-MORENO; LARRAURI; SAURA-CALIXTO, 1998).

Embora se tenha a preocupação de adicionar sempre ao alimento substâncias antioxidantes, durante toda a vida as pessoas são expostas a diversas fontes de estresses oxidativos potencialmente prejudiciais como: poluição ambiental, fumaça dos cigarros e produtos de radiação ionizante. Não obstante, muitos produtos oxidados são gerados endogenamente durante os processos fisiológicos normais (WHITEHEAD; THORPE; MAXWELL, 1992).

Num estudo feito por Wang; Cao e Prior (1996), concluiu-se que a baixa incidência de câncer e a diminuição da taxa de mortalidade pelas complicações

advindas daquele tipo de doença, estão associados ao aumento no consumo de antioxidantes, naturalmente presente nos alimentos como tocoferóis e flavonóides (flavonas, isoflavonas, flavononas, antocianinas, catequinas e isocatequinas), contribuindo para diminuir os riscos de ataques cardíacos e de acidente vascular cerebral (AVC), assim como cânceres de pulmão, de pele e do trato digestivo (ANGUELOVA; WARTHESEN, 2000).

Alguns antioxidantes são muito eficazes no combate aos processos oxidativos a altas temperaturas, como a *Capsaicina* (CAP) (Figura 3) que protege o ácido oléico durante o aquecimento. O rizoma de algumas espécies de gengibre como o *Zingiber officinale*, demonstraram ter potente ação antioxidante. Isto se deve ao alto teor de curcuminóides (Figura 4), cuja ação antioxidante é comparável a do α -tocoferol (DOLL, 1990; MALTZMAN; HURT; ELSON, 1989; FOOD TECHNOLOGY, 1994). Extratos de folhas de orégano (*Origanum vulgare L.*) têm atividade antioxidante, em especial quando na preservação de óleos vegetais refinados de milho, soja e oliva. A ação antioxidante das folhas de orégano, deve-se aos flavonóides presentes como: flavona, apigenina, eriodictiol, flavana, dihidroflavonol, etc (DEIANA; ROSA; CAO, et al., 2002).

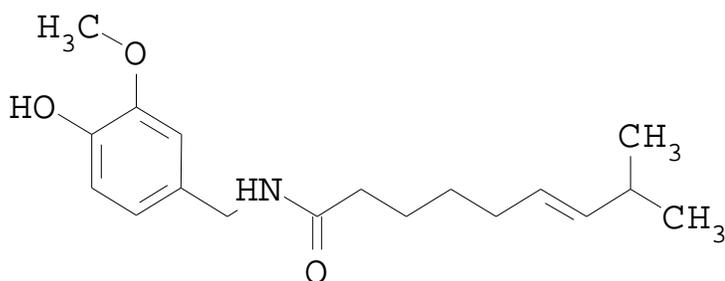


Figura 3 - Estrutura molecular da capsaicina (CAP).

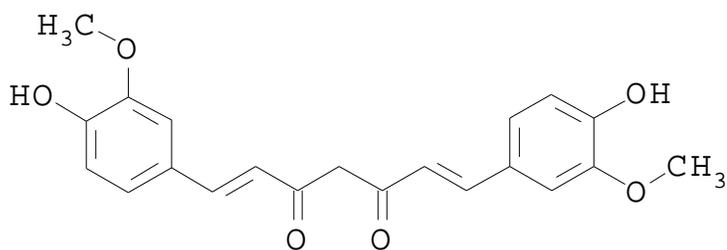


Figura 4 - Estrutura molecular do curcuminóide.

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria são: 3,5-di-*t*-butil-4-hidroxitolueno (BHT), ácido cítrico, 2 e 3-*t*-butil-4-metil-metoxifenol (BHA) (Figura 5), propil galato (PG), terc-butilhidroquinona (TBHQ) (Figura 6), dodecil galato (DG), (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992).

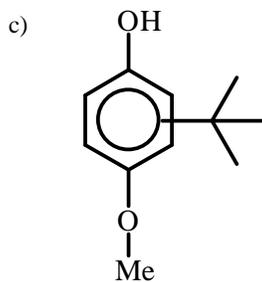
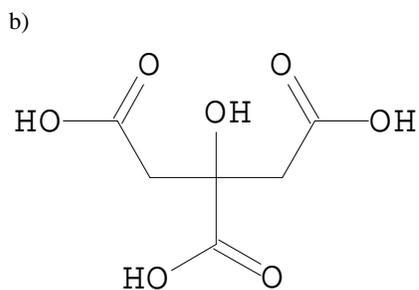
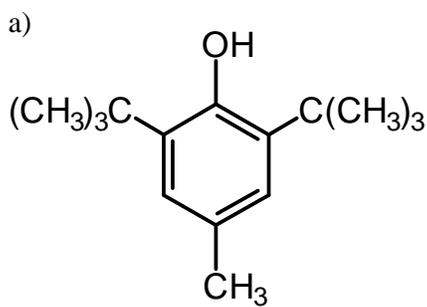


Figura 5 – a) estrutura molecular do BHT; b) estrutura molecular do ácido cítrico; c) estrutura molecular do BHA;

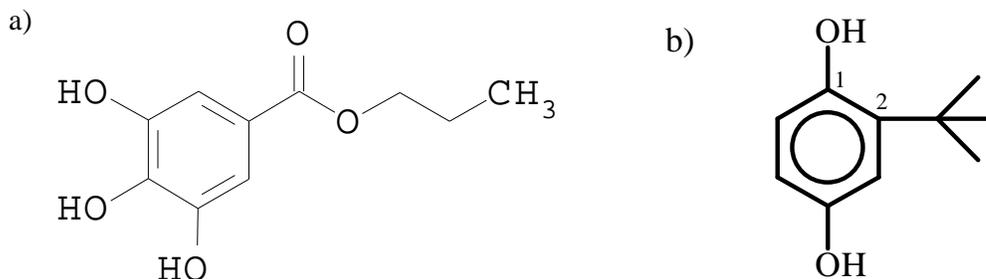


Figura 6 – a) estrutura molecular do propil galato (PG); b) estrutura molecular d tercbutil hidroquinona (TBHQ).

Recentemente, estudos mostram que o azeite de oliva possui efeito protetor contra o câncer, devido à existência de muitos compostos antioxidantes como fenóis (tirosois e hidroxitirosois) e flavonóides, potentes inibidores do oxigênio reativo, em sua composição. O oxigênio reativo está envolvido com alguns tipos de cânceres relacionado a gorduras, como o câncer de seio e o de *colorectum*. O mecanismo pelo qual aparece esta espécie de oxigênio, está no consumo de ácidos graxos poliinsaturados ω -6, os quais são particularmente sensíveis a peroxidação lipídica, levando a adutos¹ altamente pró-mutagênicos (OWEN; GIACOSA; HULL, et al., 2000).

Em países como a Grécia e a Itália, onde a dieta tradicional é baseada no alto consumo de azeite de oliva, encontram-se baixos níveis de colesterol plasmático e de doença da artéria coronária (DAC) (GRUNDY, 1986).

¹ Adutos: produto da reação de Diels-Alder (SOLOMONS, 1996).

2.1.4 Fisiopatologia dos óleos termo-oxidados

O consumo de óleos termo-oxidados, como verificado na fritura dos mais diversos tipos de alimentos, traz sérios riscos à saúde, pois além de aumentar muito a saturação dos óleos comestíveis, os produtos formados pela termo-oxidação, têm atividade biológica. É fato, por exemplo, que a hemaglutinação é afetada pelos produtos da oxidação e da degradação térmica do azeite de oliva aquecido, os quais agem como aglutininas, promovendo um aumento da coagulação intravascular (PATRIKIOS; PATSALIS, 2003). Igualmente, o alto consumo de gorduras saturadas na alimentação, vem contribuindo para o aumento da obesidade, verificado na população norte-americana (ASSIS, 2001).

Isto porém, não se verifica nos povos do Mediterrâneo, onde o grande consumo de gorduras insaturadas contribui para o baixo nível de doença arterial coronariana (DAC) (ARMSTRONG; MANN; ADELSTEIN, et al., 1975).

Sendo a DAC uma das doenças mais perigosas ao homem, tem sido a principal causa de morte entre os ocidentais (GEY, 1990). O efeito basal do consumo de ácidos graxos saturados, presentes em óleos vegetais termo-oxidados, é o de elevar as frações de LDL (Lipoproteína de Baixa Densidade), que em excesso no sangue circulante, depositam-se sobre as artérias (aterosclerose) e com o tempo acabam provocando doença coronariana (ASSIS, 2001; GRUNDY, 1986; KANNEL; CASTELLI; GORDON, 1979; MERCK, 1999; STEINBERG, 1990; RIEMERSMA; WOOD; MACINTYRE, 1988).

Alguns estudos mostram que dieta rica em ácido ω -6 (presente no azeite de oliva) entre os povos do Mediterrâneo, é efetivo na prevenção de DAC, por diminuir os níveis plasmáticos de colesterol (GORINSTEIN; LEOTOWICZ; LOJEK, et al.,

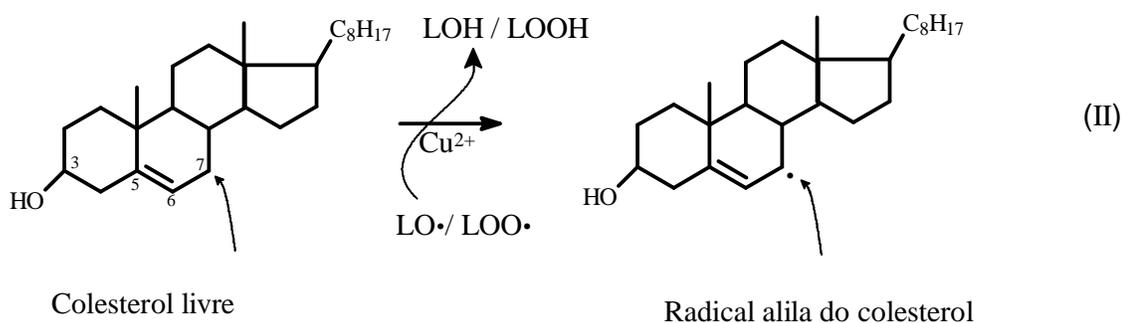
2002). Algumas experiências *in vivo* e *in vitro* em animais de laboratório, demonstraram inibição da oxidação da LDL-colesterol (**LDL: Low Density Lipoproteins**, Lipoproteína de Baixa Densidade) pelos constituintes do azeite de oliva (PARASASSI; BITTOLO – BON; BRUNELLI, et al., 2001). A oxidação da LDL-colesterol (Reação II), resulta em uma partícula com alta afinidade pelas artérias coronárias, com potencial para depositar-se no seu interior (CHANG; ABDALA; SEVANI, 1996). O azeite de oliva sendo rico em ácido oléico e linoléico, acredita-se que em parte, esta composição seja responsável pelo aumento do HDL-colesterol (**HDL: High Density Lipoprotein**, Lipoproteína de Alta Densidade), o qual representa um fator de proteção na prevenção de DACs. O ácido oléico também reduz a trombogênese e a agregação plaquetária, contribuindo para a estabilização da pressão arterial e glicemia; assim como, exerce influência positiva sobre o crescimento ósseo (RANALLI; FERRANTE; DE MATTIA, et al., 1999).

Em muitas espécies animais, as respostas às dietas com ácidos graxos diferem sensivelmente. Porém, uma dieta contendo 20% de óleo de açafrão, rico em ácido linoléico (ω -6), provoca redução nos níveis séricos de colesterol, em níveis comparáveis ao do azeite de oliva. O aumento no consumo do óleo de açafrão de 20 para 35%, causa uma baixa significativa do nível do colesterol sérico. Contudo ao se avaliar uma dieta com ácido palmítico (ácido graxo saturado), observa-se um aumento significativo no nível do colesterol. E o mesmo efeito é observado no consumo de óleos ou gorduras ricas em ácido elaídico (ácido graxo insaturado, *trans*) (KATAN; VAN GASTEL; DE ROVER, et al., 1988).

Os ácidos graxos de configuração *trans* contribuem para aumentar os níveis de colesterol, por diminuírem as quantidades de HDL, popularmente chamado de “bom colesterol” e por elevar os valores de LDL, o “mau colesterol” (MORETTO;

FETT, 1998). Uma dieta baseada no consumo de 250 mg de colesterol, que contenha 20% em ácidos graxos insaturados e apenas 10% em ácidos graxos saturados, observa-se uma redução crítica dos níveis de colesterol plasmático (ASCHERIO; EIMM; GIOVANUCCI, et al., 1992; HEGSTED, 1986; GINSBERG; BARR; GILBERT, et al., 1990).

Reação II: Reação de oxidação do colesterol por radicais livres, na presença de cobre (Cu). As setas indicam o local de ataque na molécula de colesterol pelo radical livre inicial.



FONTE: CHANG; ABDALA; SEVANIAN, 1996.

O colesterol encontra-se no alimento intimamente associado a outros lípidos (gorduras saturadas), com os quais pode ser oxidado. A presença de calor, oxigênio, radiação e metais de transição desencadeia o processo oxidativo, onde o 7-cetocolesterol e o 25-hidroxicolesterol atuam como óxidos biologicamente ativos, capazes de desencadear processos citotóxicos, aterogênicos, mutagênicos e cancerígenos (KUBOW, 1990; MOURA; TENUTA-FILHO, 2002; TAI; CHEN; CHEN, 1999).

O mecanismo pelo qual o consumo de ácidos graxos saturados eleva o nível do colesterol plasmático está relacionado à diminuição dos receptores hepáticos. Isso reduz a depuração do LDL-colesterol e das lipoproteínas de muito baixa densidade – VLDL (**VLDL – Very Low Density Lipoprotein**, Lipoproteína de Muito

Baixa Densidade) (ASSIS, 2001; MERCK, 1999). O consumo regular de ácidos graxos poliinsaturados especialmente os ω -6 e ω -3, provoca uma queda nos níveis de LDL-colesterol, principalmente quando a dieta de substituição às gorduras saturadas se baseia no ácido linoléico (ω -6). Contudo, sabe-se que o consumo de ácidos graxos saturados com 12 ou menos átomos de carbono na cadeia, assim como a dieta rica em ácido esteárico, têm pouco ou nenhum efeito sobre o colesterol total em homens.

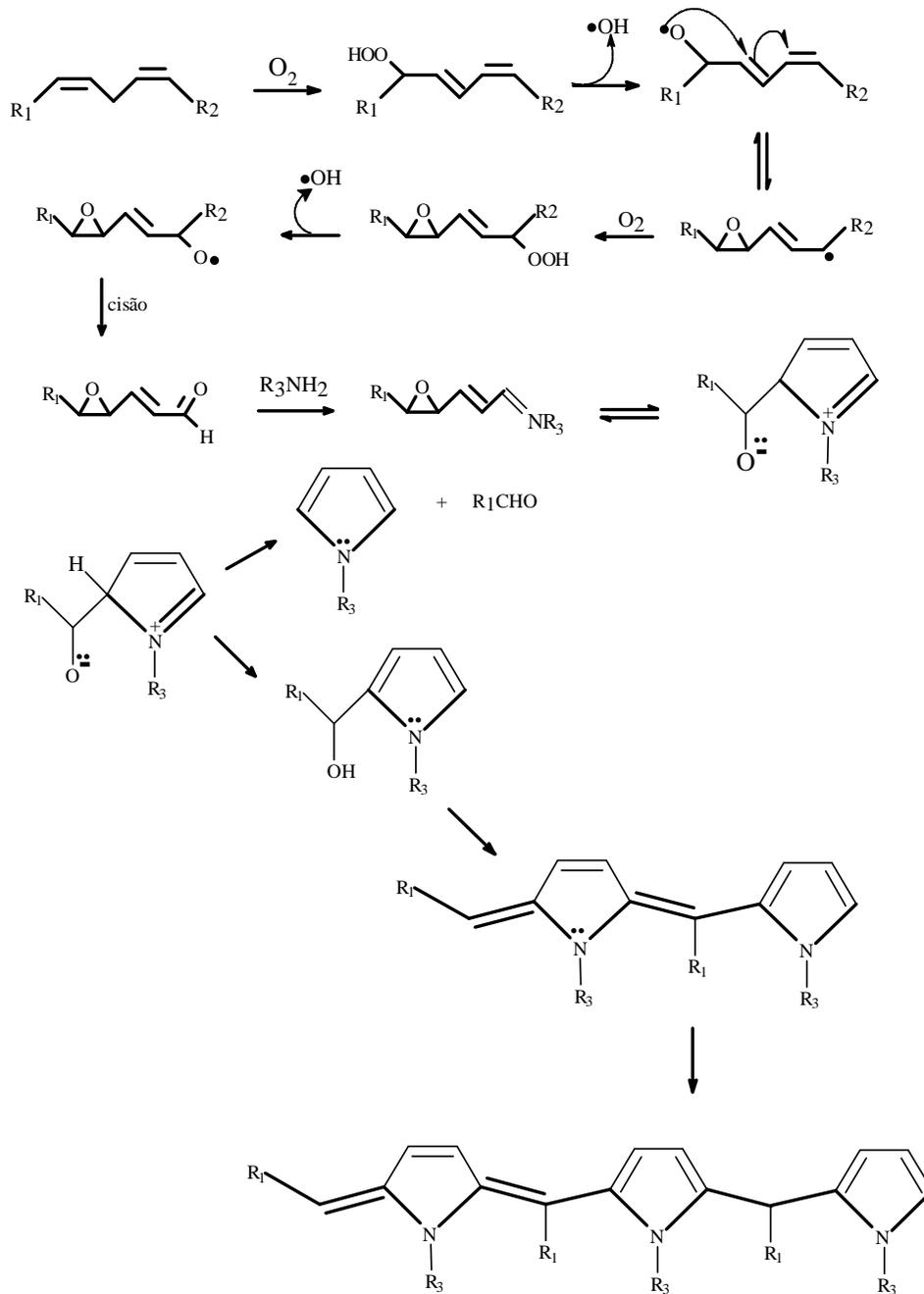
O mecanismo de ação parece estar relacionado a um aumento da excreção de colesterol, pelo aumento da formação de ácidos biliares, redistribuição do colesterol entre o soro e os tecidos e uma diminuição da capacidade de transporte do colesterol por meio da LDL (ASSIS, 2001; GRUNDY, 1986; KEYS; ANDERSON; GRANDE, 1965).

Além da evidência de que os óleos estressados termicamente podem ter uma função na aceleração no processo da aterosclerose, existe a forte suspeita de que estes óleos possuam atividade mutagênica. Os produtos da peroxidação lipídica, incluindo hidroperóxidos (Esquema 1) e epóxidos, reagem com o DNA na presença de metais e ácido ascórbico (KUBOW, 1990).

Espécies radicalares (presentes em óleos altamente termo-oxidados), também reagem com os lipídios das membranas biológicas levando a formação de radicais lipídicos, os quais reagem com o oxigênio e formam hidroperóxidos lipídicos. A clivagem destes hidroperóxidos gera diversos compostos carbonílicos solúveis em água, como os hidroxialcenais (aldeídos insaturados), que atacam e lesam as membranas biológicas. Estas reações são a origem das conseqüências de muitos problemas de saúde do mundo industrializado.

Os aldeídos derivados do 4,5-epoxi-2-alcenais, produtos secundários da peroxidação lipídica, são produzidos na decomposição dos intermediários epoxihidroperóxidos, provenientes da oxidação de ácidos graxos poliinsaturados (ω -6 e ω -3, Esquema 5). A reação entre os 4,5-epoxi-2-alcenais e o grupo amino do aminoácido lisina, por exemplo, formam derivados pirrólicos relativamente estáveis, sendo encontrados em mais de 20 produtos alimentícios frescos, incluindo carnes e vegetais (ZAMORA; HIDALGO, 2003).

Esquema 5 - Formação de epoxialcenais durante a peroxidação lipídica e reação com aminos para produzir derivados pirrólicos.



R₁=pentil; R₂= etil; R₃=lisina;

Derivado pirrólico polimerizado

FONTE: ZAMORA; HIDALGO, 2003.

É certo, porém, que o consumo de flavonóides (presentes em alguns óleos vegetais) e outros antioxidantes polifenólicos, inibem a oxidação da LDL-colesterol reduzindo a tendência à trombose (HERTOG; FESKENS; HOLLMAN, 1993), assim como o consumo de tocoferol (presente no azeite de oliva), reduz a peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados e conseqüentemente reduz os danos causados ao endotélio vascular e tecido cardíaco pelos radicais peroxil (GEY, 1990; LA ROSA; CLEEMAN, 1992).

Além dos efeitos patológicos causados naturalmente pelo consumo de óleos e gorduras saturadas, a adulteração de óleos vegetais pode ser muito nocivo à saúde, podendo conduzir o consumidor à síndrome do óleo tóxico (TOS) (**Toxic Oil Syndrome**). Na Espanha, a venda de óleo de colza adulterado, vendido como azeite de oliva, fez com que muitas pessoas apresentassem sintomas como: perda de peso, caquexia, mialgia, falência respiratória e tromboembolismo. O agente químico causador da TOS, foi identificado como uma anilida do ácido oléico, presente no óleo de colza adulterado (BELL; KUNTSE; CAPUTO, et al., 2001).

2.1.5 Controle de qualidade dos óleos vegetais

Atualmente os estudos da degradação oxidativa dos lipídeos em alimentos são de grande interesse. Diversos métodos analíticos foram desenvolvidos para avaliar a qualidade dos óleos e gorduras. Por exemplo, a determinação dos índices de iodo, peróxido e acidez. São técnicas volumétricas clássicas, processos laboriosos que demandam tempo e sujeitos a dificuldades na visualização do ponto final da titulação. Os métodos volumétricos foram os primeiros métodos a serem utilizados, no controle de qualidade de óleos vegetais. Dentre estes métodos, a determinação da acidez revela o estado de conservação do óleo, assim como a decomposição dos triacilgliceróis é acelerada pelo aquecimento e luz.

Mais recentemente, são as técnicas instrumentais de análises como a análise térmica, a espectroscopia de ultravioleta, visível e infravermelho; a espectrometria de massa e ressonância magnética nuclear (RMN). Estas técnicas apresentam muitas vantagens sobre as técnicas analíticas, apesar do custo dos equipamentos.

A análise térmica tem sido empregada para o estudo de óleos vegetais e frações de óleos. Como exemplo, citam-se as gorduras, triacilgliceróis, óleos totais e misturas de óleos e gorduras (BERGER; AKEHURST, 1996; DYSZEL, 1982; KOVALSKI, 1990).

O estudo do óleo de soja epoxidizado como fonte potencial de lubrificantes, a altas temperaturas, por RMN e Espectroscopia de Infravermelho (FTIR), mostrou-se conclusivo na análise sobre o comportamento térmico, oxidativo e friccional deste óleo e sua utilização como óleo lubrificante (ADHVARYU; PEREZ; SINGH, et al., 1998; ADHVARYU; ERHAN, 2001), bem como no estudo da estabilidade termo-

oxidativa de alguns óleos do grupo II e III, classificados pela API (American Petroleum Institute) (ADHVARYU; ERHAN; SAHO, et al., 2001).

O controle de qualidade dos óleos é feito por métodos analíticos, classificados em:

- a) métodos volumétricos: para a determinação de acidez; teor de peróxidos, índice de iodo e outros parâmetros;
- b) métodos instrumentais, utilizando-se equipamentos. São mais sensíveis e apresentam custos elevados; por exemplo, a análise térmica, espectroscopia de ultravioleta-visível, infravermelho, ressonância magnética nuclear, espectrometria de massa; cromatografia: CG, CGMS, CLAE, etc.

A rancidez é quase sempre acompanhada pela formação de ácido graxo livre, denominada de acidez livre do óleo vegetal e decorre da hidrólise parcial dos triacilgliceróis que perfazem a quase totalidade das moléculas que constituem os óleos vegetais.

Acidez alta, indica a ação de reações hidrolíticas e pode ser definida como a quantidade - em gramas - de ácido oléico livre para cada 100 g de óleo analisado. Na realidade, a expressão do resultado indica uma idéia geral de acidez e não uma determinação específica de ácido oléico. O que este método acusa é a formação em andamento de grupos carboxila ($-\text{COOH}$).

O índice ou teor de peróxidos é um indicador do grau de oxidação do óleo ou gordura. A sua presença é indício de deterioração, que poderá ser verificada com a mudança do sabor e do odor característicos dos óleos. É definido em termos de miliequivalentes de peróxidos por 1000 g de óleo, que oxidam o iodeto de potássio nas condições do teste.

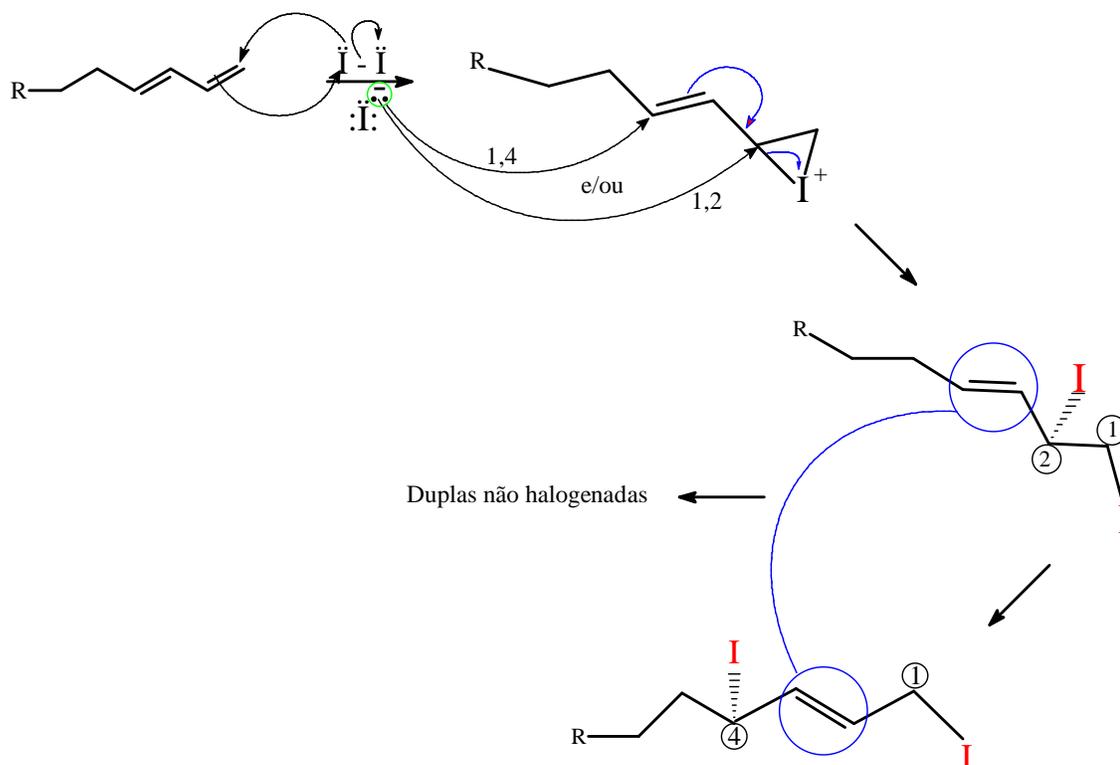
O método convencional usado para determinar o grau de insaturação de óleos e gorduras é o índice de iodo. Moléculas contendo ligações duplas carbono-carbono (insaturadas) reagem com iodo, de modo que, quanto maior o número de insaturações, maior é a quantidade de iodo consumida, maior é o índice de iodo e maior é a probabilidade da ocorrência de processos oxidativos na molécula do ácido graxo insaturado devido aos hidrogênios alílicos (hidrogênios adjacentes ao carbono da ligação dupla). A reação de adição do iodo às ligações duplas carbono-carbono é lenta (30-60 minutos), devendo ser conduzida sem aquecimento e na ausência de luz, para prevenir ou minimizar as reações indesejáveis de substituição alílica - que ocorrem na presença de luz e aquecimento - e assim, elevam o consumo de iodo no processo, conduzindo a resultados errôneos. O índice de iodo não é uma medida quantitativa, é um número empírico que é útil na definição do grau de insaturação, porém sujeito a erros.

Nos métodos de determinação do índice de iodo e que utilizam solução de ICl (Wijs) ou IBr (Hanus), a solução de iodo (liberado pela adição de KI) e amido, já titulada com solução de tiosulfato de sódio, deixada em repouso, freqüentemente reverte a coloração anterior. O mesmo comportamento é observado com os métodos que utilizam solução de I_2 . Ambos são métodos empíricos, pouco precisos e sujeito a erros. Estas dificuldades limitam a aplicação destas técnicas.

O índice de iodo é a medida do grau de insaturação de um óleo, definido pela quantidade de halogênio absorvido em 100 g de amostra. Está relacionado com a quantidade de ligações duplas presentes na amostra e a redução observada neste índice se deve à quebra de ligações duplas resultantes de reações de polimerização, ciclização e oxidação, o que aumenta o grau de saturação da amostra, tornando-a por fim, imprópria para o consumo humano. Sob determinadas condições, o iodo

pode ser introduzido quantitativamente nas ligações duplas dos ácidos graxos insaturados dos triacilgliceróis e proporciona uma medida do grau de insaturação da amostra. Quanto maior for o índice, maior será a insaturação da amostra. Mesmo este método tendo algumas desvantagens, deve ser considerado como um método empírico cujo resultado final dá uma idéia aproximada da realidade. Isto fica evidente quando se analisa a proposta fundamental do método. Ao se utilizar iodo (halogênio) para reagir especificamente com as ligações duplas, esbarra-se em algumas dificuldades: uma é que o iodo sempre vai sofrer alguma interferência da luz, reduzindo sua participação na reação de halogenação. Outra é que a adição devido à ligações duplas isoladas, ou conjugadas podem resultar em algumas ligações duplas intactas sem a adição do iodo devido à adição 1,2 e 1,4 (Esquema 6), resultando em valores menores do que o normal (JOSEPH-NATHAN, 1982). Valores mais consistentes podem ser obtidos por RMN de H^1 . Neste trabalho foram realizadas algumas determinações do índice de iodo pelo método tradicional (Wijs) em óleos *in natura* e aquecidos. Foi determinado o índice de iodo de dados retirados das curvas de integração dos espectros de RMN de H^1 dos óleos vegetais, cujos resultados são mais consistentes do que aqueles obtidos com a metodologia usual (método de Wijs).

Esquema 6 - Mecanismo de halogenação de dienos: 1,2 e 1,4.



FONTE: SOLOMONS, 1996.

Em geral, os métodos analíticos oficiais disponíveis para a análise de óleos são pouco sensíveis, morosos, de baixa confiabilidade e seletividade. É pois, necessário, novas metodologias, técnicas mais sensíveis, rápidas e automatizadas para a determinação adequada do índice de iodo. A RMN de H¹ resolve esta dificuldade.

Na Figura 7, é mostrado o espectro de RMN de H¹ genérico de um óleo vegetal para análise.

LEGENDA:

- a = prótons metílicos;
- b = prótons metílicos do ácido linolênico;
- c = prótons metilênicos dos ácidos graxos do triacilglicerol;
- d = prótons β -carboxílicos;
- e = prótons alílicos externos;
- f = prótons α -carboxílicos;
- g = prótons alílicos internos;
- h + i = prótons metilênicos do glicerol;
- j = próton H-2 metilênico do glicerol;
- k = prótons olefínicos;

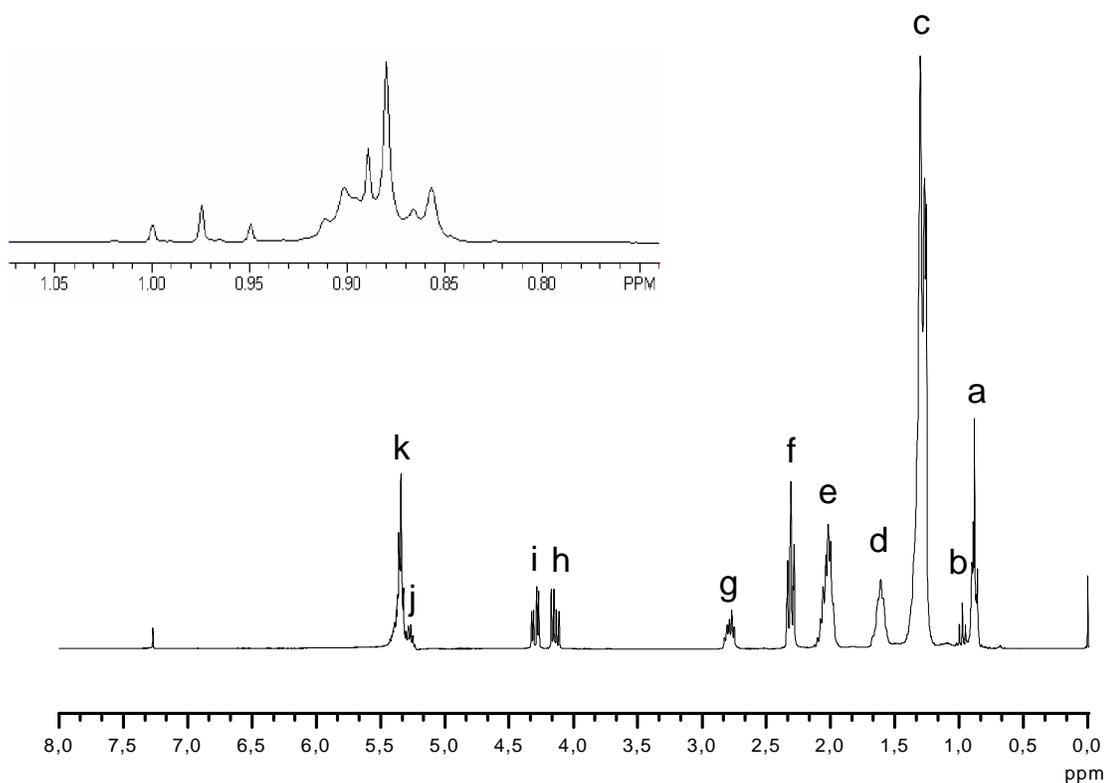


Figura 7 - Espectro RMN de H^1 genérico de um óleo vegetal. A inserção mostra os sinais dos prótons H^1 da metila do ácido linolênico em 0,98 ppm [sinal em b].

Do espectro de RMN de H^1 integrado, obteve-se a medida direta do grau de insaturação de modo preciso. Todos os hidrogênios olefínicos (aqueles conectados diretamente nos carbonos das ligações duplas carbono-carbono) mostram deslocamento químico (δ) entre 5,40-5,26 ppm (k). Todos os hidrogênios metílicos –

parte saturada da molécula – mostram deslocamento químico entre (δ) 0,80 e 1,00 ppm (a + b). Portanto o número total de insaturação, em moles, é a medida direta da área dos picos normalizados e integrados, dos hidrogênios que geraram aqueles sinais, naquelas regiões do espectro de RMN de H^1 (MANNINA, 2003).

A RMN de H^1 é uma técnica extremamente sensível à densidade eletrônica e a população de hidrogênios que gerou o sinal. Hidrogênios em ambientes eletrônicos diferentes mostram diferentes deslocamentos químicos, e a intensidade do sinal é estritamente proporcional a quantidade de hidrogênios que o gerou.

Felizmente, o espectro de RMN de H^1 dos triacilgliceróis é bem resolvido, observando-se sinais distintos, característicos, para os prótons olefínicos, do glicerol e alquílicos, que mostram absorção em regiões diferentes do espectro. Os prótons olefínicos são observados em (δ) 5,26 – 5,40 ppm (k); os prótons metilênicos do glicerol em (δ) 4,10 – 4,32 ppm (i + h) [H-1 e H-3]; H-2 o próton metilênico em (δ) 5,25 ppm (j). Os prótons metílicos são observados em (δ) 0,80 – 1,00 ppm (a; b). Somente os prótons metílicos do ácido linolênico são observados em (δ) 0,98 ppm (b); sua concentração pode ser diretamente medida a partir do valor da curva de integração. Prótons alílicos internos são observados em (δ) 2,80 – 2,70 ppm (g). Os prótons alílicos externos são observados em (δ) 2,10 – 1,90 ppm (e). Prótons α -carboxílicos são observados em (δ) 2,34 – 2,22 ppm (f). Os prótons β -carboxílicos são observados em (δ) 1,70 – 1,50 ppm (d). Um cluster de picos sobrepostos em (δ) 1,40 – 1,15 e centrado em 1,2 ppm (c), corresponde aos demais prótons metilênicos dos ácidos graxos presentes no triacilglicerol (VIGLI; PHILIPDIS; SPYROS, et al., 2003).

Fortuitamente, porém, a curva de integração dos prótons olefínicos inclui o próton metílico do glicerol em C-2 e que deve ser considerado nas equações obtidas

a partir do contido nas curvas de integração, e que permitam o cálculo correto do índice de iodo por RMN de H¹, segundo as equações:

Cálculo da área de um próton (Equação I):

$$\frac{i+h}{4} \quad (I)$$

Cálculo de prótons olefínicos (Equação II):

$$V = \frac{[k+j] - \frac{[i+h]}{4}}{\frac{i+h}{4}} \quad (II)$$

onde:

(k + j) = representa a população de prótons vinílicos, obtidos por leitura direta do espectro integrado;

(i + h) = os prótons dos dois grupos metílicos do glicerol. O hidrogênio metino (H-2) do glicerol aparece em 5,26 ppm sobreposto aos prótons vinílicos na curva de integração. Portanto a área relativa a um próton será (i + h)/4 (JOSEPH-NATHAN, 1982).

Cálculo do total de prótons (Equação III):

$$T = \frac{k + j + i + h + g + f + e + d + c + b + a}{\frac{i + h}{4}} \quad (\text{III})$$

Cálculo do peso molecular médio dos triacilgliceróis (PM) (Equação IV):

$$PM = 119,7 + 7,036T + 5,983V \quad (\text{IV})$$

Assim, o índice de iodo foi determinado a partir do espectro de H^1 integrado, conforme a equação (V), descrita por Joseph-Nathan (1982):

$$I = \frac{126,91 \times 100V}{PM} \quad (\text{V})$$

onde:

I = índice de iodo

V = número de prótons vinílicos (olefínicos).

PM = peso molecular médio do triacilglicerol que compõe o óleo em estudo

O PM médio determinado por RMN, substitui com vantagem a determinação do índice de saponificação por volumetria, uma vez que aquele só serve para dar uma idéia do tamanho da cadeia de ácido graxo que compõe o triacilglicerol. O valor numérico do índice de saponificação é inversamente proporcional ao tamanho da

cadeia do ácido graxo (se ele tem uma cadeia carbônica maior ou menor do que 12 carbonos).

Para agilizar os cálculos, desenvolvemos para o ambiente Windows, o programa PROTEUS (Figura 8) para calcular o índice de iodo por RMN de H^1 . O programa foi escrito em Visual Basic 5.0, onde os campos de entrada dos dados de $(i + h)$, $(k + j)$, e T correspondem as integrais tiradas dos espectros de RMN de H^1 . E os campos Prótons olefínicos, Total de prótons e Peso molecular médio, correspondem aos cálculos supracitados para se encontrar o índice de iodo (I.I.), que é calculado automaticamente pela entrada de dados.

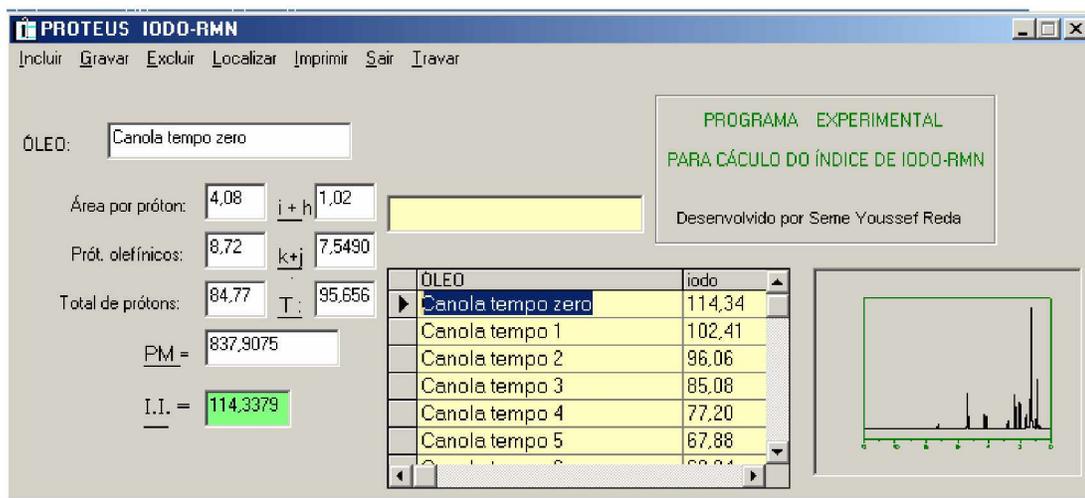


Figura 8 – Característica geral do programa PROTEUS

A ressonância magnética nuclear (RMN) tornou-se ao longo de seu desenvolvimento o principal instrumento de avaliação de óleos (AZEREDO; COLNAGO; SOUZA, et al., 2003). Núcleos atômicos contendo núcleons (prótons e nêutrons) desemparelhados (pelo menos um) são ativos em RMN. Por exemplo, ${}^1D^2$, ${}^1H^1$, ${}^6C^{13}$, ${}^7N^{15}$, ${}^8O^{17}$. Sob a ação de um campo magnético constante (B_0) e potente (MHz) posicionado no eixo z das coordenadas girantes (x, y, z), os núcleons se

comportam como micromagnetos (representáveis fisicamente por vetores) e se ordenam a favor e contra o campo magnético. A resultante é um alinhamento a favor do campo, responsável pelo experimento. O experimento consiste em perturbar o equilíbrio dos spins por ação de um pulso curto e intenso de radio frequência (Hz) fornecido por um gerador posicionado no plano x,y de outro campo magnético oscilante (B), ortogonal ao campo constante (B_0). A seqüência de pulsos a intervalos de tempos (τ , A_i) é programada por computador. Em conseqüência os vetores de magnetização dos spins nucleares sofrem um torque, entram em precessão num movimento giratório semelhante ao de um pião em ângulo de 90° , por exemplo, que tende a retornar ao equilíbrio (ângulo de 0° com o campo constante). No processo, o componente vetorial no plano x,y gera um sinal (FID) que é detectado pelo equipamento como uma onda senoidal – radiação no domínio do tempo - que é convertida no domínio da frequência por transformada de Fourier (FT). O gráfico (espectro) gerado mostra sinais (picos) cujas intensidades são proporcionais à população de spins, e cujas frequências (Hz, ppm) são distribuídos numa janela espectral de δ 0 – 10 ppm para RMN de H^1 e 0 -240 ppm para RMN de C^{13} . Diversas modalidades de espectros de RMN podem ser obtidos de acordo com programação prévia, utilizando-se determinada seqüência de pulsos e pequena quantidade de amostra (10-100 mg).

O pulso curto e intenso de radiação eletromagnética no comprimento de onda de radiofrequência do núcleo atômico da amostra provoca o efeito de rotação (giro de pião) levando um certo tempo para retornar ao repouso. Este tempo é denominado de tempo de relaxação. No processo, a energia de radiofrequência absorvida é dissipada como uma onda (FID) que é captada pelo espectrômetro e convertida por computador num gráfico (espectro) por transformada de Fourier (FT). O espectro de

RMN fornece informações importantes sobre a estrutura molecular, como o deslocamento químico (δ), constantes de acoplamento (J), curvas de integração (proporcionais à população de núcleos que gerou o sinal). Todos estes parâmetros estão relacionados aos diferentes tipos de átomos que constitui a amostra. A RMN é sensível a densidade eletrônica, a efeitos estéricos e conformacionais. Como os óleos vegetais são formados por moléculas pequenas (triacilgliceróis), os gráficos gerados dão boa resolução. Neste trabalho, utilizou-se RMN de próton (RMN H^1) e de carbono 13 (RMN C^{13}), para estudos das alterações termoxidativas dos óleos. Dos espectros integrados de RMN H^1 , calculou-se o índice de iodo de todas as amostras de óleos vegetais analisadas (sob diferentes tempos de aquecimento), procedimento inviável pelo método tradicional (Wijs). As amostras mais deterioradas, polimerizadas, não podem ser analisadas pelo método de Wijs, nem por cromatografia gasosa (inutilizaria a coluna). Somente a RMN contorna esta dificuldade (GUILLÉN; RUIZ, 2001).

A RMN é uma importante ferramenta no estudo dos alimentos como óleos e gorduras. RMN de baixa resolução foi usado por um longo tempo para se determinar o conteúdo de gordura sólida em uma amostra, as curvas do ponto de fusão de gorduras semi – sólidas, ou a porcentagem em massa de óleos nos alimentos. RMN H^1 e de C^{13} de alta resolução também é usado no estudo de lipídeos em alimentos. O uso da RMN H^1 no estudo dos óleos, gorduras e lipídeos nos alimentos aumentou particularmente por causa da grande quantidade de informações que os instrumentos de RMN de campo alto podem fornecer num curto período de tempo. Hoje em dia, a análise dos óleos vegetais é dominada pelas determinações clássicas, tais como acidez, teor de peróxido, assim como pelo uso de técnicas

cromatográficas em camada delgada, a gás e CLAE. Essas técnicas são usadas primariamente para medidas quantitativas de compostos.

Uma desvantagem destes procedimentos é que existem muitas diferenças entre os ensaios para serem aplicados na análise de rotina. Alguns destes métodos requerem o isolamento e a análise de componentes menores da matéria insaponificável, por meio de métodos laboriosos e demorados. Assim, muitos estudos foram realizados no sentido de se aplicar novas técnicas analíticas que, com muito pouco ou sem nenhuma manipulação da amostra, mostrassem resultados similares ou superiores àqueles obtidos pelos métodos clássicos.

Neste contexto, técnicas espectroscópicas têm emergido como ferramentas potenciais nos tempo atuais, como a espectrometria de massa e a espectrofotometria por infravermelho e de Raman (BAETEN; DARDENNE; APARICIO, 2001).

Uma das técnicas espectroscópicas com alto potencial neste campo, é a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de alta resolução. O espectro de RMN contém uma grande quantidade de informações que podem ser obtidos num curto período de tempo e pode se empregado como uma alternativa aos métodos clássicos de análise atuais. Os diferentes sinais presentes no espectro de RMN de H^1 , dão dois tipos de informações: o deslocamento químico, de valor qualitativo, relacionado aos diferentes ambientes dos átomos presentes na mostra analisada (KIM; CHEN; MCCARTHY, et al 1999); a intensidade relativa, que prove informações quantitativas dos diferentes sinais. Então ao se aplicar todas essas informações na análise de óleos, é possível caracterizar sua qualidade e autenticidade.

A RMN de H^1 está relacionada aos níveis de energia do núcleo do H^1 que resulta quando a amostra é colocada no interior de um campo magnético externo. Cada núcleo de H^1 em ambiente diferente, blindado diferentemente pelo ambiente eletrônico, é afetado e afeta os núcleos vizinhos. Estas interações magnéticas causam pequenas modificações locais ao campo externo aplicado. O núcleo dos átomos de hidrogênio em diferentes ambientes, mostra comportamentos químicos diferentes, pois apresentam energias diferentes. Essas separações no nível de energia podem ser medidas com muita precisão como freqüências usando a transformada de Fourier, a qual monitora a resposta do núcleo após ele ter sido perturbado do seu equilíbrio por um pulso curto e intenso de radiação eletromagnética de radio-freqüência. O espectro de RMN é uma série de sinais agudos cujas freqüências podem ser relacionada à natureza química dos átomos de hidrogênios (grupos metil, metilenos, etc.) e cujas intensidades são diretamente relacionadas ao número de hidrogênios que produzem o sinal.

As características do instrumento de RMN requerido no estudo dos óleos e gorduras dependem do tipo de estudo feito. Os instrumentos usam campo magnético de 60 a 600 MHz. Obviamente, quanto maior o campo magnético, melhor a resolução da transição das ressonâncias e melhor a sensibilidade e qualidade do espectro. A amostra é preparada por dissolução de uma quantidade de óleo ou gordura em solvente apropriado, em proporções específicas, usualmente 10 – 100 mg/mL de solvente em um tubo de 5 mm de diâmetro. Os solventes mais comuns usados são o clorofórmio deuterado, o tetracloreto de carbono, o dimetilsulfóxido deuterado ou metanol deuterado. O espectro é realizado normalmente à temperatura ambiente ou à temperatura controlada entre 20 °C e 30 °C. O tempo de análise varia entre 1,28 e 2,7 s. Em moléculas de triacilgliceróis os prótons metilênicos do grupo

gliceril têm tempo de relaxação (T_1) curto, e um tempo maior para os prótons de grupos metil terminal, próximo a 2,2 s. O número de scans comumente usados varia de 16 a 64 e o pulso usado fica entre $45 - 90^\circ$ (GUILLÉN; RUIZ, 2001).

No espectro, átomos de hidrogênios sob o mesmo ambiente químico, produzem sinais na mesma frequência. A posição do sinal de ressonância no espectro é chamada de deslocamento químico (δ). O deslocamento químico, a intensidade e a multiplicidade dos sinais contêm muitas informações úteis sobre cada tipo diferente de núcleo de ^1H na amostra. O deslocamento químico de um átomo ou grupos de átomos é medido em relação ao composto de referência, o tetrametilsilano (TMS). Esse composto é usualmente adicionado à amostra numa concentração próxima a 0,03%. Os deslocamentos químicos são obtidos em partes por milhão (ppm) por dividir a diferença da frequência entre os sinais da amostra e o sinal do TMS, em hertz (Hz), pela frequência do equipamento em megahertz (MHz). Por esta razão, o deslocamento químico em ppm, é independente da medida da força do campo, mas a separação em hertz de dois sinais com uma certa diferença de deslocamento químico, aumenta a linearidade com a força do campo. Os deslocamentos químicos de sinais de lipídeos são sempre positivos em relação ao TMS e são característicos do comportamento molecular em particular.

Os óleos comestíveis e gorduras são principalmente constituídos de triacilgliceróis, com diferentes padrões de substituição devido à extensão, grau e espécie de insaturação dos grupos acil, e por componentes menores como os mono e diglicerídeos, esteróis, vitaminas, ácidos graxos, e outros.

O grau de insaturação dos óleos é um importante indicador da provável desenvolvimento de rancidez nos alimentos e é usado para determinar as propriedades químicas e físicas dos óleos. A determinação tradicional envolve testes

químicos, relacionados com reações envolvendo as ligações duplas existentes na molécula lipídica. Um dos testes mais comuns, consiste na adição de iodo para reagir quantitativamente com as ligações duplas. Deste tipo de experimento é que o valor do Índice de Iodo é obtido. Este método, porém, consome tempo em comparação com outros métodos mais rápidos que podem ser de interesse para a indústria. Os experimentos com RMN H^1 permitem a determinação deste parâmetro e outros, como: peso molecular médio, o número médio de ligações duplas, índice de saponificação, concentração de ácidos graxos insaturados, rapidamente e de modo simples, usando diferentes abordagens. O índice de iodo usando-se RMN H^1 tem boa reprodutibilidade se comparado com o método tradicional de Wijs (AOCS métodos Cd 1 – 25) para um número de amostras significativo. No mesmo caminho, está a estimativa de se determinar qual a proporção dos diferentes tipos de grupos acil nos óleos comestíveis e gorduras, ponto de grande interesse nutricional e tecnológico. Também pelos métodos tradicionais, há uma demora considerável na determinação e envolve etapas trabalhosas como reações de transesterificação do óleo para produzir ésteres metílicos de ácidos graxos e a subsequente separação, identificação e quantificação deste compostos individualmente por cromatografia gasosa. Esta metodologia envolve problemas relacionados com a oxidação da amostra, com a formação de artefatos durante a transesterificação e com a separação e identificação dos ésteres metílicos na corrida cromatográfica. Da mesma forma, a estimativa da proporção de grupos acil poliinsaturados ω -3 em lipídeos, como o de pescado, por exemplo, é de grande importância, devido a sua influência na estabilidade oxidativa e sua influência positiva sobre a saúde humana por causa do aumento dos níveis séricos de HDL. Assim, este parâmetro é o

principal critério de julgamento, em alguns países, para a avaliação da qualidade do óleo de peixe (GUILLÉN; RUIZ, 2001).

A oxidação dos óleos comestíveis é do maior interesse não só do ponto de vista tecnológico e econômico, mas também da segurança, devido a propriedades indesejáveis de alguns compostos produzidos deste modo. Embora outros mecanismos de degradação sejam possíveis, o processo de degradação do óleo, inicia pela formação de um radical livre alila que é oxidado a hidroperóxidos, denominados de produtos de oxidação primários, os quais se degradam em aldeídos, cetonas, álcool lactonas, ácidos, etc., denominados de produtos de oxidação secundários (Esquema 1). Para análise destes compostos resultantes de degradação oxidativa, a RMN de H^1 é uma alternativa bastante útil às análises químicas tradicionais envolvidas.

O estudo por RMN dos produtos gerados na oxidação de substâncias como a trilinoleína (Figura 9), trilinolenina e trioleína, podem ser de interesse na síntese de lipídios estruturados, pois provê informações valiosas a respeito da distribuição e da posição dos grupos acil dos triésteres de glicerol nos óleos vegetais, utilizados como substratos pela indústria. Os lipídios estruturados podem ser definidos como triacilgliceróis reestruturados ou modificados na sua composição em ácidos graxos, têm propriedades físicas e funcionais modificadas, como por exemplo, alteração do ponto de fusão e redução do valor calórico, respectivamente. Na prática, são utilizados na clínica médica para melhorar o sistema imunológico, na prevenção de câncer, trombose e diminuir a hipercolesterolemia. Na indústria alimentícia, são usados com a finalidade de diminuir o conteúdo energético de alimentos como chocolates, laticínios, sorvetes, etc. (D'AGOSTINI, 2001; MANNINA; LUCHINAT; EMANUELE, et al., 1999).

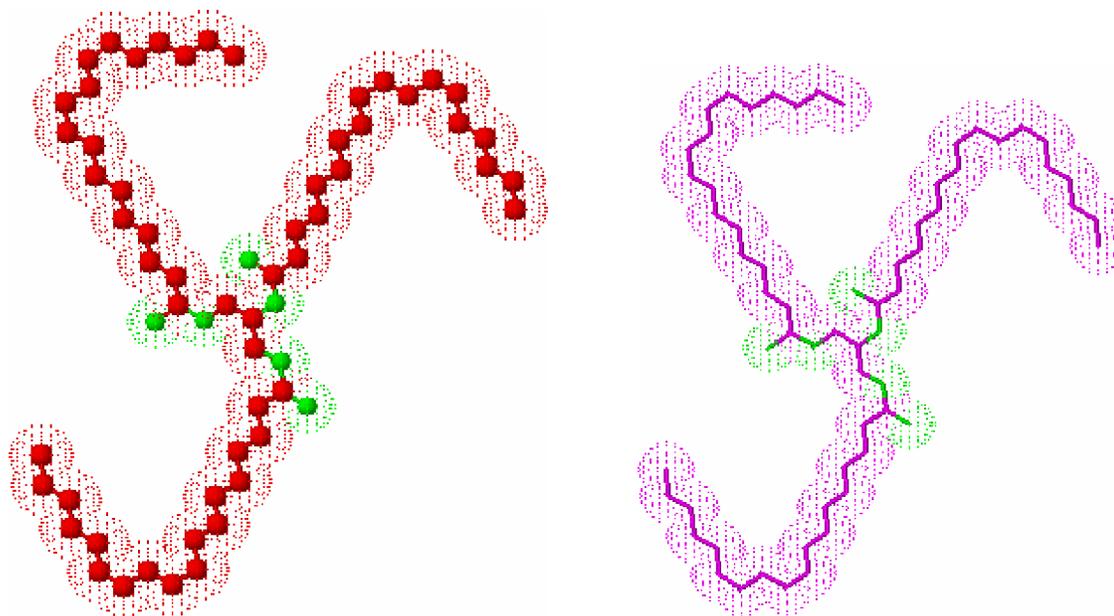


Figura 9 - Estruturas tridimensionais da trioleína

Na análise específica de um óleo vegetal por RMN C^{13} (Figura 10), quatro regiões bem distintas no espectro podem ser descritas: δ 173,3-172,8 ppm (A) região dos carbonos dos grupos carboxilas; δ 132,0-127,1 ppm (B), região dos carbonos olefínicos; δ 69,1-61,6 ppm, região dos carbonos do glicerol (C) [C_1 e C_2]; e δ 34 ppm (D), onde estão presentes os carbonos alifáticos saturados. Quando se analisa a região dos grupos carboxílicos, os substituintes nas posições 1 e 2 do glicerol podem ser distinguidos, porque mostram intensidades diferentes. Óleos deteriorados termicamente, mostram redução do número de carbonos olefínicos; δ 34 ppm correspondem aos grupos α -metilênicos em relação à carboxila; os grupos CH_2 saturados encontram-se em δ 30,0-28,5 ppm; os CH_2 alílicos externos à $C=C$, estão em δ 27,5 ppm; os CH_2 olefínicos internos, são observados em δ 26,0-25,0 ppm; os

carbonos β -carbonílicos são observados em δ 25,0 ppm e as metilas podem ser observadas em δ 14,0 ppm.

Legenda:

- A = grupos $-\text{COOH}$;
- B = carbonos olefínicos;
- C = carbonos do glicerol (C_1 e C_2);
- D = carbonos alifáticos saturados.

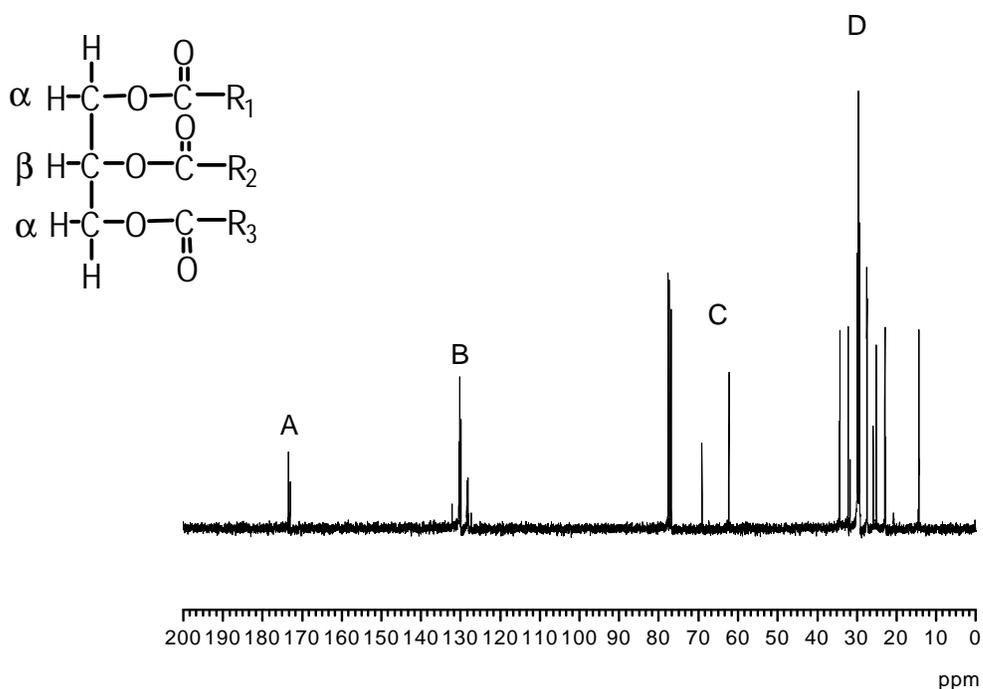


Figura 10 - Espectro genérico de RMN de carbono 13 de óleo vegetal.

Os métodos instrumentais apresentam grande vantagem sobre os tradicionais (volumétricos) pela sua capacidade em necessitar apenas de quantidades mínimas de amostra e terem uma extrema sensibilidade e reprodutibilidade nas análises, além de serem mais precisos e exatos.

A análise térmica utiliza como fundamento os princípios da termogravimetria, em que uma quantidade de amostra (5 – 10 mg) é colocada num cadinho de alumina e é aquecida progressivamente num intervalo de tempo pré-estabelecido, sob

condições de atmosfera controlada (ar ou nitrogênio). No final, é gerado um gráfico mostrando as respectivas perdas de massa sob diferentes temperaturas. Assim é possível determinar com precisão, por exemplo, a que temperatura uma amostra mudou de estado físico, deteriorou ou entrou em ignição.

Todos os métodos espectroscópicos, baseiam-se nos efeitos da radiação sobre a matéria. Na espectroscopia de ultravioleta (UV) se utiliza radiação de baixo comprimento de onda (λ 200 – 400 nm) e alta energia. A resposta é analisada por aparelhos chamados espectrofotômetros. A amostra – para ser observável – deve apresentar estrutura molecular adequada: presença de ligações insaturadas, ligações π (ligações duplas ou triplas). A radiação na frequência do UV, ao incidir sobre a amostra, excita os elétrons das ligações π , fazendo que estes elétrons saltem de um orbital de menor energia para outro de maior energia, levando-os com isso, a um estado ativado. Este fenômeno corresponde a absorção de certa quantidade de energia pela amostra. O retorno dos elétrons ao estado fundamental libera a energia absorvida sob a forma de radiação, detectada pelo espectrofotômetro que gera um gráfico (o espectro) da quantidade de radiação absorvida (absorbância) pelo comprimento de onda em nanômetros (nm). Assim, quando uma amostra possui ligações π , o aparelho gera um gráfico cujo pico máximo de absorbância pelo comprimento de onda, é característico daquela amostra em particular. Isto é possível porque os óleos vegetais possuem intrinsecamente uma constituição molecular homogênea, de triacilgliceróis (Figura 1) e ácidos graxos insaturados (Tabelas 1 e 2). Assim, quando o óleo sofre qualquer tipo de alteração, como oxidação, por exemplo, o espectro gerado mostra um deslocamento de banda (efeito batocrômico) e aumento da intensidade da absorção (A), acusando de imediato que o óleo não está no seu estado mais puro. Este efeito foi observado

neste trabalho. A espectroscopia UV-VIS utiliza comprimento de onda na região de λ 200 a 800 nm.

Outra análise importante é a espectroscopia de infravermelho (FTIR) que utiliza radiação de frequência de maior comprimento de onda (menor energia). Esta radiação de baixa energia não é capaz de fazer elétrons saltarem de um orbital para outro, porém provoca vibrações entre as ligações de átomos nas moléculas da amostra sob análise. Estas vibrações correspondem aos estiramentos (simétricos e assimétricos) e deformações angulares (no plano, fora do plano). Estas alterações nas ligações químicas - mais pronunciadas em moléculas assimétricas e com significativo momento de dipolo - são captadas pelo equipamento, que gera um gráfico (espectro) de transmitância ou absorbância (intensidade da absorção) pelo número de ondas (λ , cm^{-1}), em concordância com a presença de grupos funcionais na amostra. Os óleos vegetais também são sensíveis a este tipo de análise por possuírem grupos funcionais possíveis de serem analisados no infravermelho. Na análise por infravermelho dos diversos óleos neste trabalho, foi possível observar as alterações provocadas pelo aquecimento sucessivo das amostras, principalmente da banda de 3.500 a 3.000 cm^{-1} (região dos grupos hidroxilados), mostrando que é possível se fazer uma análise qualitativa dos óleos, principalmente quando estes apresentam grau de acidez aumentado, como resultado dos processos oxidativos.

Na cromatografia gasosa, o óleo a ser analisado (1-10ml), é primeiramente esterificado e injetado (1 μl) no cromatógrafo a uma temperatura entre 200-220 $^{\circ}\text{C}$, para ser vaporizado e poder ser dividido em seus vários constituintes. A amostra (fase gasosa móvel), passa por uma fase estacionária, levada por um gás de arraste inerte, geralmente o Hélio. Seus vários constituintes, geram gráficos que são

comparados com um padrão interno para que sua composição seja determinada (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998; VOGEL, 1992).

2.2 OBJETIVO GERAL

2.2.1 Investigar as alterações ocorridas em óleos vegetais sob estresse térmico, por métodos analíticos e espectroscópicos e contribuir para o controle de qualidade de óleos vegetais;

2.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.3.1 Determinar o perfil de ácidos graxos das amostras de óleo *in natura* por cromatografia gasosa;

2.3.2 Submeter amostras de diferentes óleos vegetais à estresse térmico durante 28 horas, 4 horas/dia e 80 horas, 8 horas/dia, num intervalo de temperatura de 180 – 200 °C;

2.3.3 Determinar o teor de acidez e peróxidos das amostras de óleo *in natura* e sob diferentes temperaturas de aquecimento;

2.3.4 Monitorar o perfil dos espectros de FTIR dos óleos sob estresse térmico em diferentes tempos de aquecimento;

2.3.5 Determinar o perfil dos espectros UV-Vis dos óleos sob estresse térmico, em diferentes tempos de aquecimento;

2.3.6 Avaliar a estabilidade térmica de alguns antioxidantes;

2.3.7 Determinar o índice de iodo das amostras de óleos *in natura* e sob diferentes tempos de aquecimento por RMN H^1 ;

2.3.8 Estabelecer o perfil de RMN de C^{13} dos óleos sob diferentes tempos de aquecimento.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL:

3.1.1 Reagentes e solventes: os reagentes e solventes eram de grau de pureza PA e foram utilizados sem qualquer purificação.

3.1.2 Óleos vegetais: foram utilizados óleos refinados de soja (*Glycine max*), milho (*Zea mays*), girassol (*Helianthus annuus*), canola (*Brassica campestris*), cedidos pela empresa CARGILL; azeite de oliva (*Olea europea*), adquirido no mercado local.

Para a análise do azeite de oliva foram utilizadas duas marcas:

a) Azeite de oliva extra virgem (ANVISA, 1999):

- marca: La Española;
- acidez máxima: 0,75°;
- 1ª prensagem a frio;
- embalagem de vidro transparente.

b) Azeite de oliva virgem fino (ANVISA, 1999):

- marca: Raiola;
- acidez máxima: 1,5 °;
- embalagem de metal.

3.1.3 Antioxidantes: foram utilizados os seguintes antioxidantes, fornecidos por empresas locais: ácido fítico, eritorbato de sódio, terc-butilhidroxilueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), propil galato (PG), ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido sórbico (SBA), e acetato isobutirato de sacarose (SAIB).

3.2 MÉTODOS:

3.2.1 Cromatografia gasosa

a) Preparação de ésteres metílicos: a preparação de ésteres metílicos foi realizada seguindo o Método de HARTMAN e LAGO (1973).

Foram pesadas 100 mg do óleo em frasco de 90 mL com tampa rosqueável, adicionou-se 5 mL de solução de KOH 0,5 M em metanol. A mistura foi aquecida em banho-maria em ebulição por 5 minutos. Foram adicionados 15 mL do reagente de esterificação à solução ainda quente. A mistura foi mantida em banho-maria em ebulição por 15 minutos. Após resfriamento, foram adicionados 25 mL de éter de petróleo, seguida de homogeneização. Após homogeneização foram adicionados 25 mL de solução saturada de cloreto de sódio, seguida de homogeneização. Após decantação de 30 minutos foram coletados 18 mL da fase orgânica em frascos de 20 mL com tampa rosqueável e mantidos em freezer até realização da análise cromatográfica.

b) Análise cromatográfica: A análise cromatográfica foi realizada seguindo o Método oficial AOCS (1990), utilizando um Cromatógrafo gasoso CG-Master com coluna capilar (CG-745; 30 m; 0,53 mm de espessura; filme de 1 μ m de polietilenoglicol, com detector de ionização de chama; as temperaturas utilizadas no injetor e no detector foram respectivamente 220 e 250 °C). A programação de temperatura da coluna foi iniciada em 100 °C, aquecida a 5 °C. min^{-1} até 220 °C e permaneceu em isoterma a 220 °C por 25 minutos. A solução de referência continha padrões de quinze ésteres metílicos.

- foi injetado 1 μL (microlitro) da solução de referência no cromatógrafo gasoso e os ésteres metílicos foram eluídos, determinando-se os tempos de retenção de cada padrão isoladamente;

- foi injetado 1 μL da solução da amostra esterificada no cromatógrafo gasoso em duplicata, e os ésteres metílicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção com os da solução de referência. A análise quantitativa foi realizada por normalização interna, assumindo que todos os componentes da amostra estão representados no cromatograma obtido, de tal forma que as áreas de todos os picos representam 100 % com eluição total;

3.2.2 Análise térmica

As curvas termoanalíticas foram obtidas em módulo simultâneo TG/DSC/DTA em equipamento TA – Instruments, modelo 2960, operando nas seguintes condições: taxa de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera dinâmica de ar, vazão de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ em cadinho de alumina ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$), contendo aproximadamente 10 a 20 mg de amostra submetida a temperatura de 25 a $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ para as curvas TG/DSC e de 25 a $1000\text{ }^{\circ}\text{C}$ para as curvas TG/DTA, para análise da estabilidade térmica dos antioxidantes e óleos vegetais.

3.2.3 Análise por espectroscopia de infravermelho

Amostras de aproximadamente 5 µl de cada óleo vegetal foram prensados em pastilhas de KBr (100 mg) e seus espectros de infravermelho foram determinados em espectrofotômetro Shimadzu, modelo 8400, operando no modo FT.

3.2.4 Análise por espectroscopia ultravioleta

Foram utilizadas soluções de óleos vegetais em isopropanol, 10^{-4} e 10^{-7} M em ácido oléico, na primeira e na segunda fase, respectivamente. Foram determinadas as curvas de absorção na região de λ 200-800 nm em espectrofotômetro Shimadzu, modelo MultiSpec 1501.

3.2.5 Análise por Difração de Raios X (XRD)

O polímero resultante da termo-oxidação dos óleos vegetais foi analisado em Difrátômetro de Raios-X Shimadzu, modelo XRD – 6000.

3.2.6 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 e carbono-13:

Amostras dos óleos: aproximadamente 10 a 20 mg de amostra, foram dissolvidas em 0,7 mL de CDCl_3 e seus espectros de RMN foram registrados em espectrômetro Varian, modelo Mercury-300 MHz, operando no modo FT à temperatura ambiente.

RMN de H^1 : para os núcleos de Hidrogênio-1 foram utilizados os seguintes parâmetros de aquisição: pulso: 45° , tempo de relaxação: 1,359 s; tempo de

aquisição: 3,64 s; largura de varredura: 4.120 Hz, largura de linha 0,3 Hz. Foram acumuladas 16 repetições para cada decaimento induzido livre (FID).

RMN de C¹³: Os núcleos de carbono-13 foram observados a 75,45 MHz com desacoplamento de Hidrogênio em 300 MHz, utilizando-se os seguintes parâmetros de aquisição: pulso: 30 °, tempo de relaxação: 1,0 s; tempo de aquisição: 0,868 s; largura de varredura: 18.868,0 Hz, largura de linha 1,0 Hz. Foram acumuladas 512 repetições para cada decaimento induzido livre (FID).

RMN 1-D – DEPT: os núcleos de carbono-13 observáveis a 75,45 MHz tiveram seus espectros registrados no modo DEPT (aumento da intensidade, sem distorções, por transferência de polarização – “distortionless enhancement by polarization transfer”) com desacoplamento de baixa potência para núcleos de hidrogênios (observáveis em 300 MHz), ligado durante a aquisição de dados e desligado durante a relaxação. Foram utilizados os seguintes parâmetros de aquisição: pulso: 90 °, tempo de relaxação: 1,0 s; tempo de aquisição: 0,868 s; largura de varredura: 18.868,0 Hz, largura de linha 1,0 Hz. Foram acumuladas 192 repetições para cada decaimento induzido livre (FID).

3.2.7 Caracterização físico-química dos óleos vegetais

3.2.7.1 Determinação do índice de iodo: foi aplicada a metodologia oficial preconizada pela A.O.C.S. (AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY) métodos Cd 1 – 25. O índice de iodo (gramas de iodo/100 g de óleo) foi calculado de acordo com a Equação (VI):

$$I = \frac{(B - A) \times f \times 1,27}{m} \quad (VI)$$

Onde: B = n^o. de mL de solução de tiosulfato de sódio 0,1 N gasto na titulação do branco;

A = n^o. de mL de solução de tiosulfato de sódio 0,1 N gasto na titulação da amostra;

f = fator da solução de tiosulfato de sódio 0,1 N;

m = massa da amostra em gramas;

1,27 = centiequivalente do Iodo.

(OLIVEIRA; NAGEM; SILVA, et al., 1999; MORETTO; FETT; GONZAGA, et al., 2002).

3.2.7.2 Determinação da Acidez (% em ácido oléico): foram utilizados 2 g de cada óleo dissolvidos em 25 mL de isopropanol, adicionando-se 1 mL de timolftaleína [0,1%] e titulando-se com sol. 0,1 N de hidróxido de sódio, até o aparecimento de coloração azul (OLIVEIRA; NAGEM; SILVA, et al., 1999; MORETTO; FETT; GONZAGA, et al., 2002). A acidez é calculada de acordo com a Equação (VII):

$$A = \frac{V \times f \times 100 \times 0,0282}{m} \quad (\text{VII})$$

Onde: V = número de ml de solução de NaOH 0,1 N gasto na titulação;

f = fator de correção da solução de NaOH 0,1 N;

m = massa em gramas da amostra;

0,0282 = decimiliequivalente-grama do ácido oléico.

3.2.7.3 Determinação do Índice de Peróxido (mEq / kg): foram utilizados 5 g de cada óleo dissolvidos em 30 mL da solução de ácido acético-clorofórmio (3:2 v/v), seguida da adição de 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio [60 %]. A

mistura foi deixada em repouso por exatamente um minuto e a seguir, foram adicionados 30 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de amido [1%]. O iodo liberado foi titulado com solução de tiosulfato de sódio 0,1 N, até o desaparecimento da coloração azulada. Uma prova em branco foi realizada nas mesmas condições descritas, sem a presença da amostra (OLIVEIRA; NAGEM; SILVA, et al., 1999; MORETTO; FETT; GONZAGA, et al., 2002). O índice de peróxidos foi calculado de acordo com a Equação (VIII):

$$P = \frac{(B - A) \times N \times f \times 1000}{m} \quad \text{(VIII)}$$

Onde: A = n.º. de mL de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação da amostra;

B = n.º. de mL de solução de tiosulfato de sódio gasto na titulação do branco;

N = normalidade da solução de tiosulfato;

f = fator de correção da solução de tiosulfato de sódio 0,1 N;

m = massa da amostra em gramas;

3.2.8 Estresse térmico dos óleos vegetais: foram termo-estressados 200 ml de óleo de cada amostra, em frasco de vidro refratário (PIREX[®]), aquecidos em anel de cerâmica refratária, com resistência exposta, em duas fases:

- primeira fase ou fase 1: 4h/dia, durante 7 dias;
- segunda fase ou fase 2: 8h/dia, durante 10 dias.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA:

A composição em ácidos graxos de cada óleo estudado foi determinada por cromatografia gasosa e são apresentadas nas Tabelas 4-8.

Tabela 4 - Perfil de ácidos graxos identificados como ésteres metílicos dos triacilgliceróis do óleo de Canola (*Brassica campestris*).

Ácido graxo	Nomenclatura	1 ^a .determinação	2 ^a . determinação	Legislação% (g/100g)
C 14:0	mirístico	0,05	0,05	< 0,2
C 16:0	palmítico	4,37	4,41	2,5 - 6,5
C 16:1	palmitoléico	0,16	0,14	< 0,6
C 18:0	esteárico	1,45	1,48	0,8 - 3,0
C 18:1	oléico	57,42	57,73	53,0 - 70,0
C 18:2	linoléico	24,58	24,73	15,0 - 30,0
C 18:3	linolênico	8,23	7,71	5,0 - 13,0
C 20:0	araquídico	0,90	0,89	0,1 - 1,2
C 20:1	eicosenóico	-	-	0,1 - 4,3
C 22:0	behênico	0,14	0,17	< 0,6
C 22:1	erúcico	-	-	< 5,0
C 24:0	lignocérico	-	-	< 0,2
C 24:1	tetracosenóico	-	-	< 0,2

Tabela 5 - Perfil de ácidos graxos identificados como ésteres metílicos dos triacilgliceróis do óleo de Girassol (*Helianthus annuus*).

Ácido graxo	Nomenclatura	1 ^a . determinação	2 ^a . determinação	Legislação% (g/100g)
C < 14	-	-	-	< 0,4
C 14:0	mirístico	-	-	< 0,5
C 16:0	palmítico	6,80	6,67	3,0 - 10,0
C 16:1	palmitoléico	-	-	< 1,0
C 18:0	esteárico	2,96	3,21	1,0 - 10,0
C 18:1	oléico	24,43	24,61	14,0 - 35,0
C 18:2	linoléico	63,71	63,36	55,0 - 75,0
C 18:3	linolênico	0,49	0,48	< 0,3
C 20:0	araquídico	-	-	< 1,5
C 20:1	eicosenóico	-	-	< 0,5
C 22:0	behênico	-	-	< 1,0
C 22:1	erúcico	-	-	< 0,5
C 24:0	lignocérico	-	-	< 0,5
C 24:1	tetracosenóico	-	-	< 0,5
Outro	Entre 16:1 e 18:0	1,61	1,67	-

Tabela 6 - Perfil de ácidos graxos identificados como ésteres metílicos dos triacilgliceróis do óleo de Milho (*Zea mays*).

Ácido graxo	Nomenclatura	1 ^a . determinação	2 ^a . determinação	Legislação % (g/100g)
C < 14	-	-	-	< 0,3
C 14:0	Mirístico	0,04	0,03	< 0,1
C 16:0	Palmítico	13,17	12,91	9,0 - 14,0
C 16:1	Palmitoléico	0,25	0,25	< 0,5
C 18:0	Esteárico	1,60	1,61	0,5 - 4,0
C 18:1	Oléico	34,87	35,22	24,0 - 42,0
C 18:2	Linoléico	47,22	47,22	34,0 - 62,0
C 18:3	Linolênico	1,01	1,03	< 2,0
C 20:0	Araquídico	0,34	0,35	< 1,0
C 20:1	Eicosenóico	-	-	< 0,5
C 22:0	Behênico	-	-	< 0,5
C 24:0	Lignocérico	-	-	< 0,5

Tabela 7 - Perfil de ácidos graxos identificados como ésteres metílicos dos triacilgliceróis do óleo de Soja (*Glycine Max*).

Ácido graxo	Nomenclatura	1 ^a . determinação	2 ^a . determinação	Legislação% (g/100g)
C < 14	-	0,28	0,29	< 0,1
C 14:0	mirístico	0,11	0,08	< 0,5
C 16:0	palmitico	10,88	11,10	7,0 - 14,0
C 16:1	palmitoléico	0,20	0,21	< 0,5
C 18:0	esteárico	2,65	2,64	1,4 - 5,5
C 18:1	Oléico	20,95	21,17	19,0 - 30,0
C 18:2	linoléico	56,46	56,28	44,0 – 62,0
C 18:3	linolênico	6,58	6,19	4,0 – 11,0
C 20:0	Araquídico	0,26	0,25	< 1,0
C 20:1	Eicosenóico	-	-	< 1,0
C 22:0	Behênico	0,22	0,20	< 0,5

Tabela 8 - Perfil de ácidos graxos identificados como ésteres metílicos dos triacilgliceróis do azeite de oliva (*Olea europea*).

Ácido graxo	Nomenclatura	1 ^a . determinação	2 ^a . determinação	Legislação% (g/100g)
C 14:0	Mirístico			≤ 0,05
C 16:0	Palmitico	11,12	10,88	7,5 - 20,0
C 16:1	Palmitoléico	1,13	1,15	0,3 - 3,5
C 17:0	Margárico	-	-	< 0,3
C 17:1	Heptadecenóico	-	-	< 0,3
C 18:0	Esteárico	2,21	2,18	0,5 - 5,0
C 18:1	oléico	76,50	76,41	55,0 - 83,0
C 18:2	linoléico	6,52	6,99	3,5 - 21,0
C 18:3	linolênico	0,51	0,51	≤ 0,9
C 20:0	araquídico	0,24	0,23	≤ 0,6
C 20:1	eicosenóico	-	-	≤ 0,4
C 22:0	behênico	-	-	≤ 0,3
C 24:0	Lignocérico	-	-	≤ 0,2
Outros	Entre 16:1 e 18:0	1,49	1,44	-
Outro	<14:0	0,31	0,29	-

A composição em ácidos graxos dos óleos vegetais está de acordo com o que preconiza a literatura (FIRESTONE, 1999; ANVISA, 1999). Tomando-se como base a composição dos ácidos graxos insaturados: oléico, linoléico e linolênico, observa-

se que todos os óleos estudados possuem alto grau de insaturação (AOCS, 1990; HARTMAN; LAGO, 1973).

4.2 ANÁLISE TÉRMICA:

A DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) é uma das principais técnicas utilizadas atualmente no estudo das propriedades térmicas dos alimentos (FARKAS; MOHÁCSI-FARKAS, 1995; RAEMY; LAMBERT, 1990; WESOLOWSKI, ERECINSKA, 1998), como na determinação do estado oxidativo dos óleos vegetais (PATTERSON; RIGA, 1993), mostrando se o efeito exotérmico observado é causado pela oxidação do antioxidante ou pela oxidação do ácido graxo (JAMANEK, 1999; LITWINIENKO; KASPRZYCKA-GUTTMAN). Igualmente as curvas de DTA (Análise Térmica Diferencial), fornecem informações muito úteis, no caso de gorduras sólidas, sobre o seu ponto de fusão e comportamento polimórfico (HANNEWIJK; HAIGHTON, 1958).

As curvas térmicas das amostras dos antioxidantes utilizados, mostram que os antioxidantes ácido cítrico, BHA, BHT, Eritorbato de Sódio e Ácido Sórbico se decompõem a temperaturas abaixo de 180 °C, tornando-os inadequados para possível uso em frituras de alimentos com óleos vegetais. Os antioxidantes: ácido fítico, propil galato, ácido ascórbico e acetato isobutirato de sacarose, começam a se decompor em temperaturas maiores que 180/200°C, sendo mais resistentes para a conservação de óleos nos processos de termo-oxidação, do que o BHA, BHT, Eritorbato de Sódio e o ácido Sórbico.

A Figura 11, mostra as curvas TG/DTA e TG/DSC do antioxidante ácido fítico. Observa-se que o ácido fítico, na curva TG, possui uma perda de massa importante em 180°C, comprovado pela curva DTA. Isso indica que o ácido fítico não deve ser utilizado como antioxidante para óleos vegetais nos processos de frituras. A mesma análise se verifica pela curva TG/DSC.

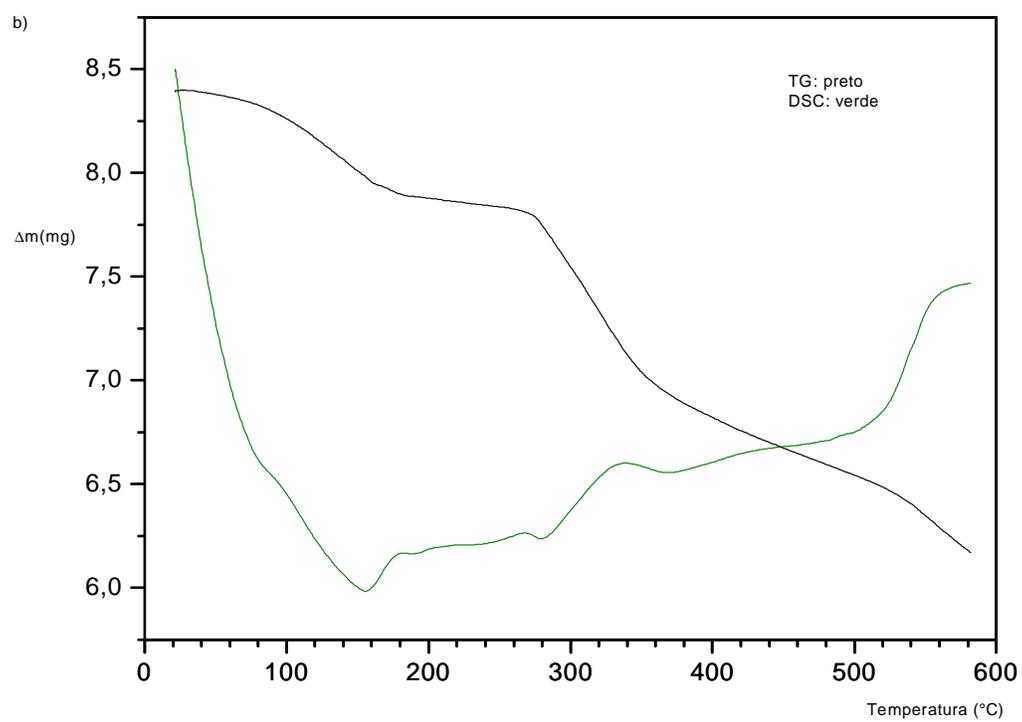
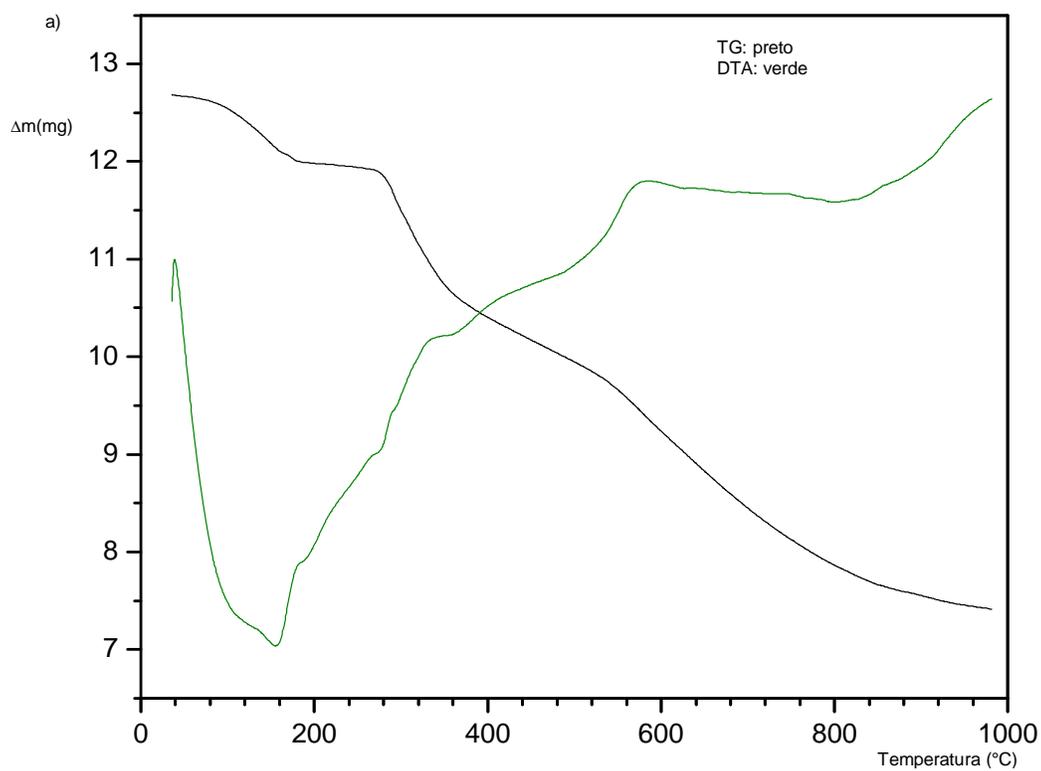


Figura 11 - Curvas a) TG/DTA do ácido fólico; b) TG/DSC do ácido fólico.

A Figura 12 mostra a curva TG/DSC do ácido cítrico. A análise da figura mostra que o ácido cítrico se decompõe em torno de 160°C, o que está bem caracterizado pela curva DSC, o que o torna inadequado como antioxidante profilático nos processos termo-oxidativos dos óleos vegetais em frituras.

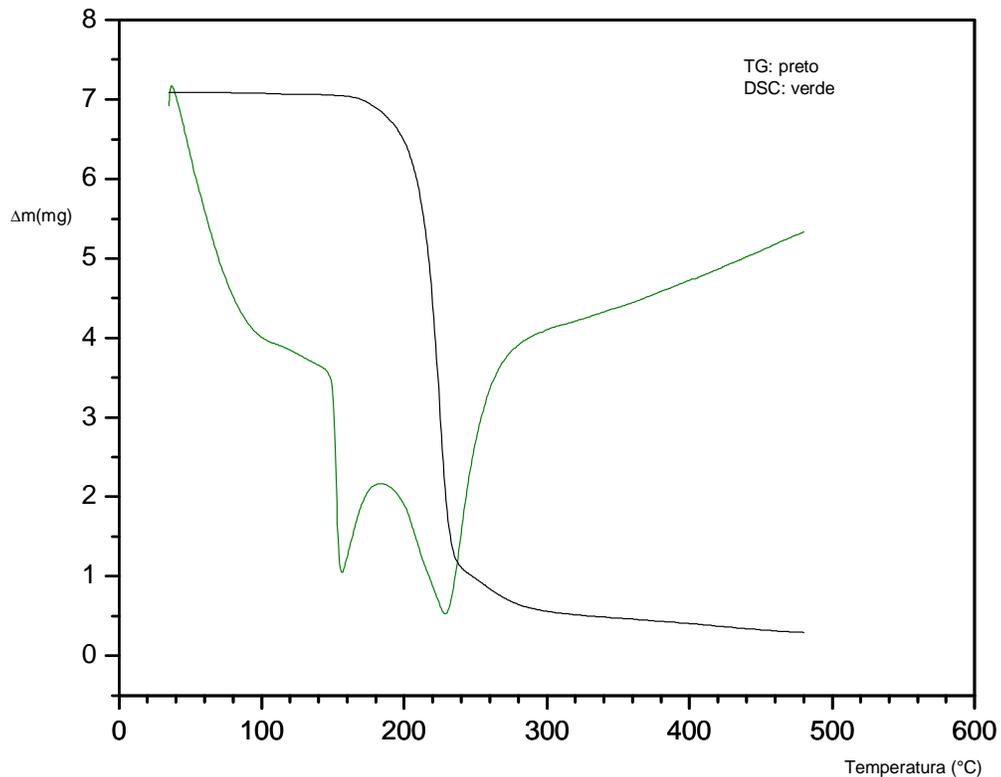


Figura 12 - Curva TG/DSC do ácido cítrico.

A Figura 13 mostra a curva TG/DSC do BHA (Butiril Hidroxi Anisol). Observa-se que a decomposição do antioxidante inicia-se em torno de 120°C, mostrada pela curva TG que mostra também um pico endotérmico bem evidente em torno de 70°C, indicando o ponto de fusão do composto. Logo, o BHA não oferece proteção para os óleos vegetais nas temperaturas de frituras (180-200 °C) sendo este antioxidante volátil na faixa de temperatura de 100 a 240°C (KOWALSKI, 1990).

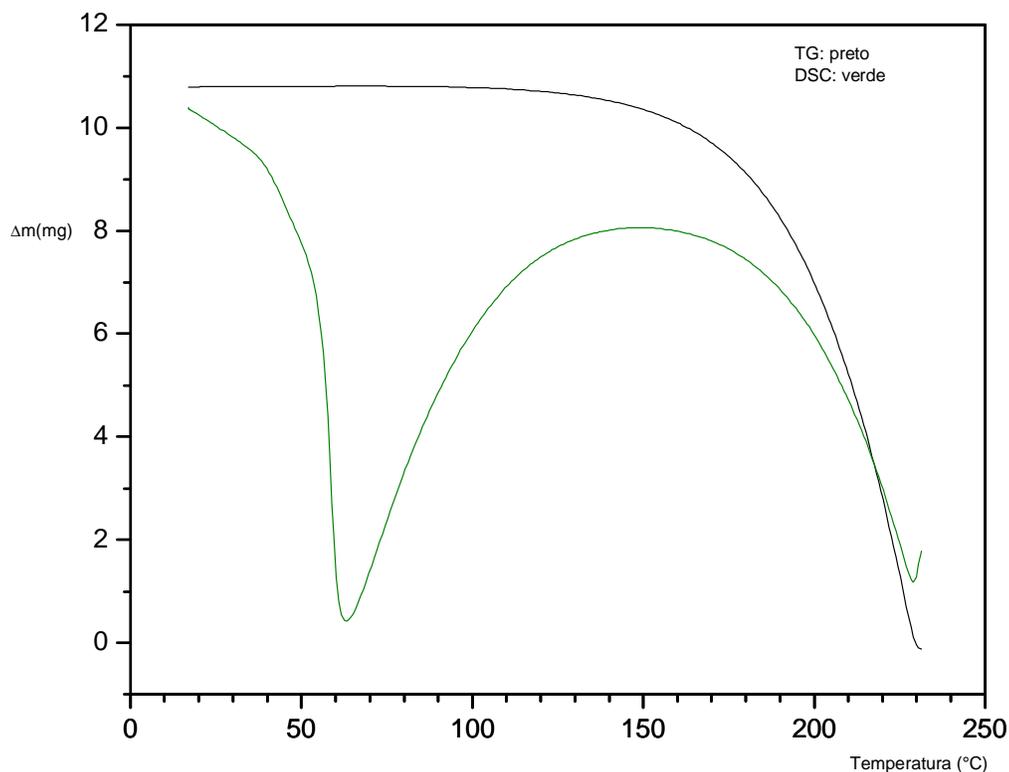


Figura 13 - Curva TG/DSC do BHA.

A Figura 14 mostra o comportamento térmico do antioxidante BHT. Observa-se que a sua decomposição começa em torno de 120°C, de maneira análoga ao BHA. O pico endotérmico em torno de 70°C corresponde ao seu ponto de fusão. Assim como o BHA, o BHT não oferece proteção antioxidante aos óleos vegetais nas temperaturas de frituras. O comportamento térmico observado para os antioxidantes BHA e BHT concorda com relatos prévios do seu comportamento em óleo de colza, onde ambos são voláteis e relativamente susceptíveis à oxidação sob condições de altas temperaturas, escapando do óleo aquecido ou sendo consumidos em reação com o oxigênio (KOWALSKI, 1991).

Na escolha do antioxidante adequado, deve-se considerar também o conteúdo de ácidos graxos insaturados presentes nos óleos vegetais, os quais determinam uma redução da estabilidade e um início de degradação térmica entre

150 e 220 °C (HILL; PERKINS, 1995; KAISERSBERGER; NETZSCH-GERÄTEBAU, 1989), portanto, quanto maior a concentração de ácidos graxos insaturados do óleo, mais termo-estável deve ser o antioxidante.

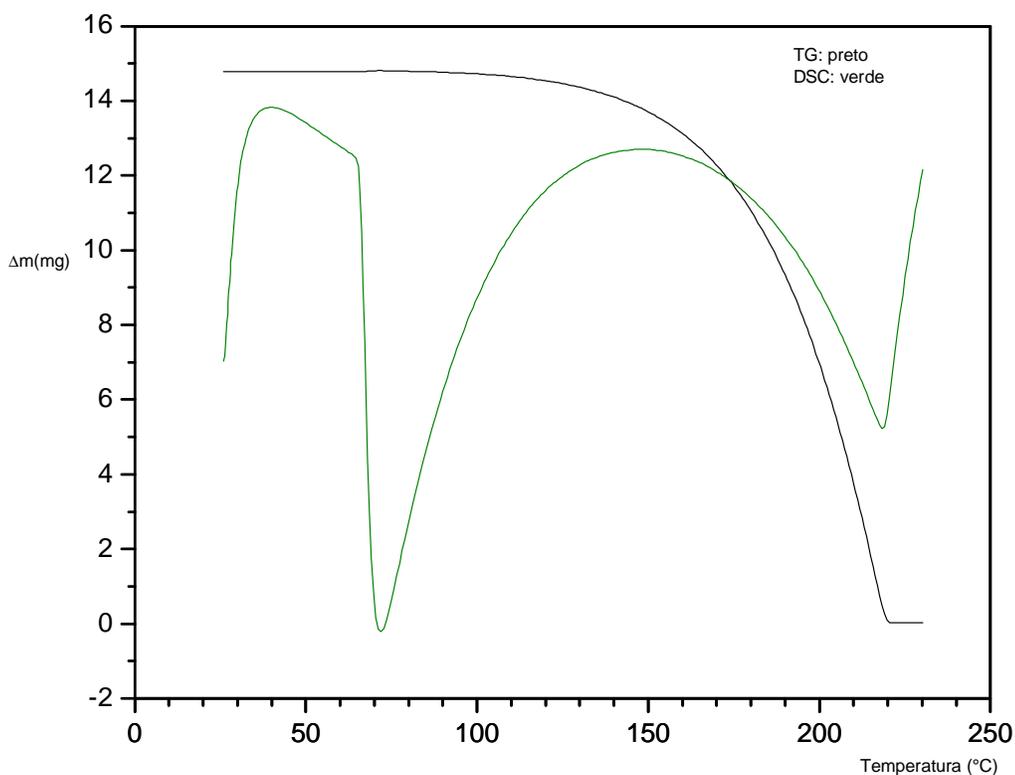


Figura 14 - Curva TG/DSC do BHT.

A Figura 15 mostra a Curva TG/DSC do eritorbato de sódio. Observam-se alterações térmicas do antioxidante a 180 °C e 300 °C. Este composto mostra maior resistência a altas temperaturas, semelhante ao que foi registrado para ácido fítico. Apesar disso, tais antioxidantes não mantêm sua estrutura intacta na faixa de 180 a 200°C (faixa de temperatura dos óleos nos processos de fritura), por muito tempo, sofrendo alterações logo em seguida.

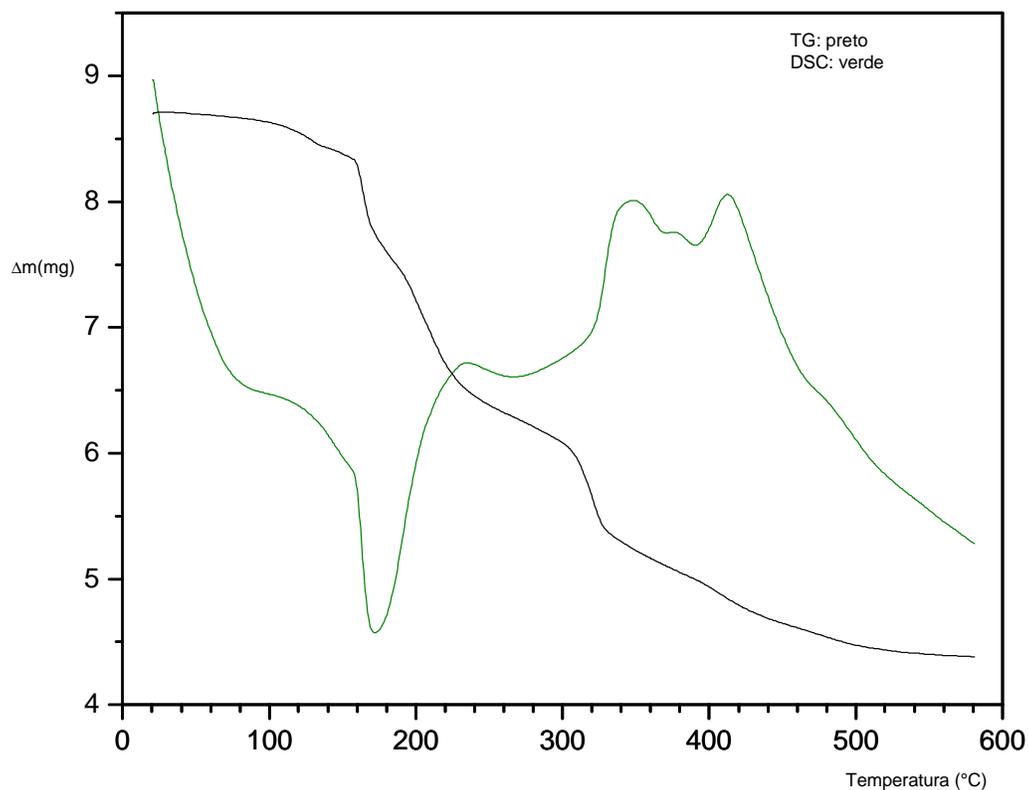


Figura 15 - Curva TG/DSC do eritorbato de sódio.

A Figura 16 mostra a curva DSC do propil galato (PG). Observa-se que a temperatura de decomposição deste antioxidante está próximo de 200 °C. Um pico endotérmico em 160°C, correspondendo ao seu ponto de fusão e um pico exotérmico em torno de 300°C, correspondendo a sua oxidação, o que está de acordo com o encontrado por Kowalski (1990). Portanto, o propil galato nestas circunstâncias é indiciado como profilático nos processos termo-oxidativos observados em todos os tipos de frituras utilizados, como registrado para o óleo de colza em que a adição do PG melhorou a estabilidade térmica do óleo no intervalo de temperatura de 189,5 a 203,2 °C (KOWALSKI, 1991).

A Figura 17 mostra a curva TG/DSC do ácido sórbico. Observa-se que a temperatura de decomposição deste antioxidante está em torno de 150°C,

temperatura na qual ocorre a sobreposição das curvas TG e DSC, indicando que o composto inicia sua fusão e decomposição simultaneamente.

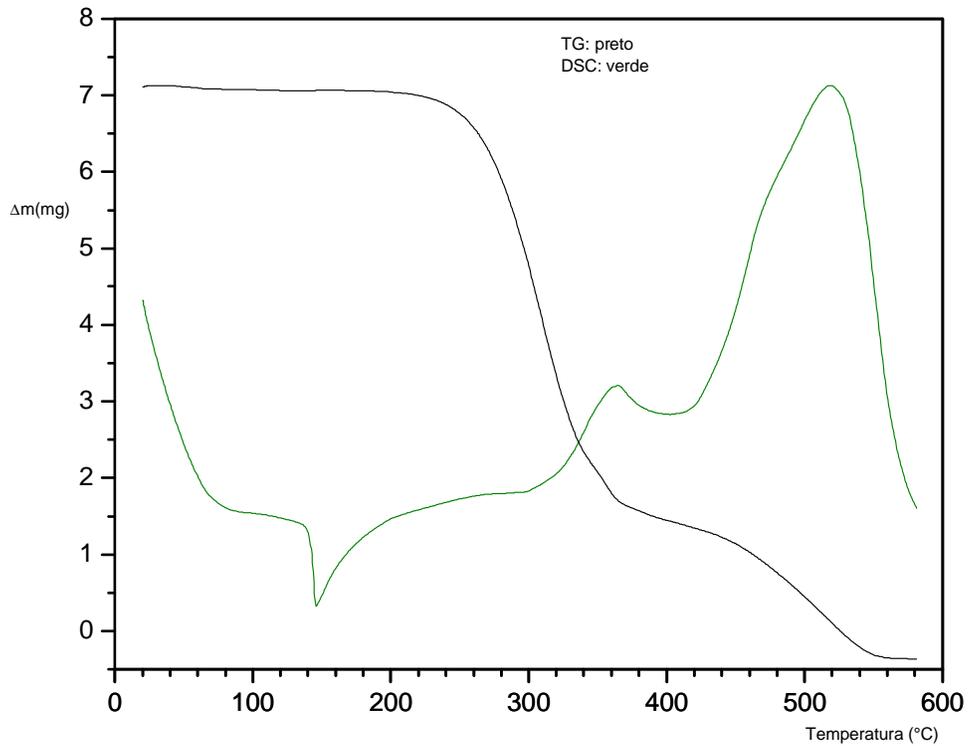


Figura 16 - Curva TG/DSC do propil galato (PG).

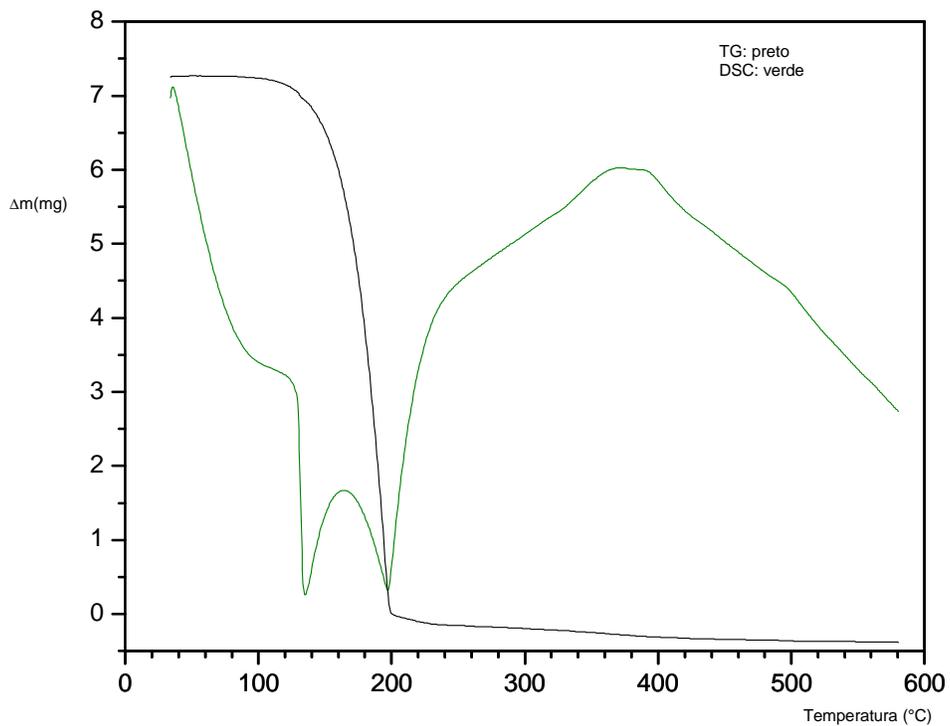


Figura 17 - Curva TG/DSC do ácido sórbico.

A Figura 18 mostra a curva TG/DSC do ácido ascórbico, na qual se observa que a temperatura de decomposição deste antioxidante, inicia-se por volta de 190°C, o que o torna inadequado para uso em óleos vegetais nos processos de frituras.

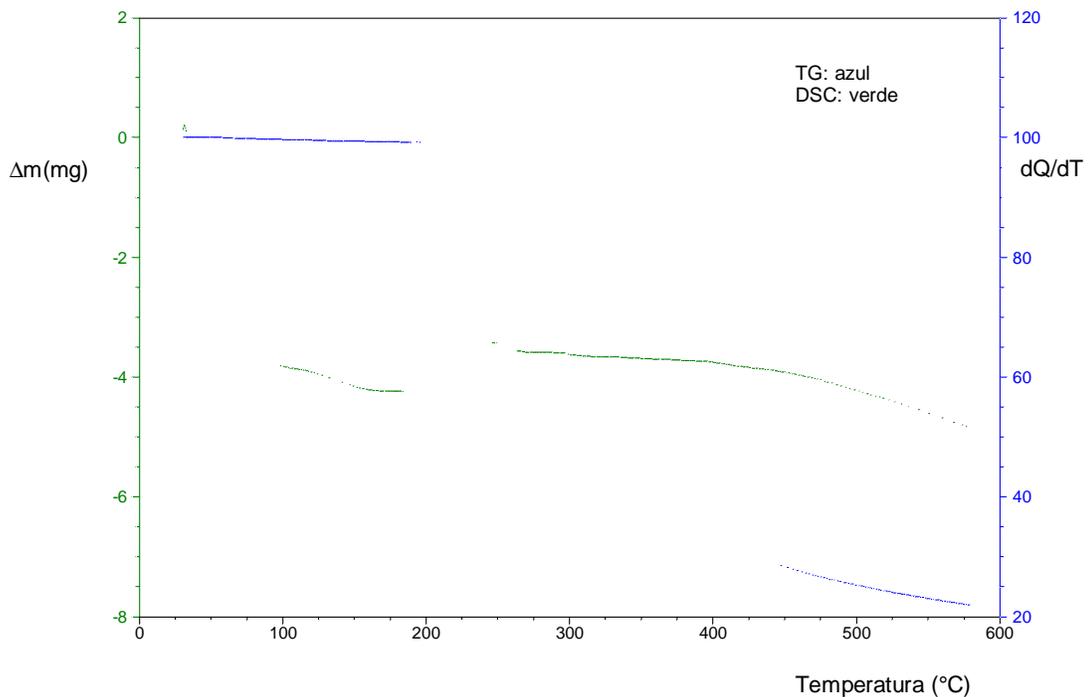


Figura 18 - Curva TG/DSC do ácido ascórbico

A curva TG/DSC da SAIB (acetato isobutirato de sacarose) na Figura 19, mostra dois pontos de inflexão na curva DSC: um ponto em torno de 90°C e outro em torno de 150°C. Como a curva TG não mostra perda de massa nestas temperaturas e estes pontos devem indicar mudança de estado físico, como evaporação da água.

Estas observações estão em concordância com a literatura. Para o bagaço de oliva, por exemplo, ocorre perda de 76% de sua massa a 80°C e a água de cristalização evapora próximo de 150°C (FREIRE; FIGUEIREDO; FERRÃO, 1996).

Pela análise da curva TG é possível observar a decomposição deste antioxidante, que se inicia próximo de 250°C, o que o torna o melhor antioxidante, dentre os analisados. É o antioxidante de escolha para os óleos vegetais nos processos de fritura, pois pode prevenir ou minimizar com maior eficácia, a deterioração termo-oxidativa que usualmente ocorre nos óleos vegetais em frituras.

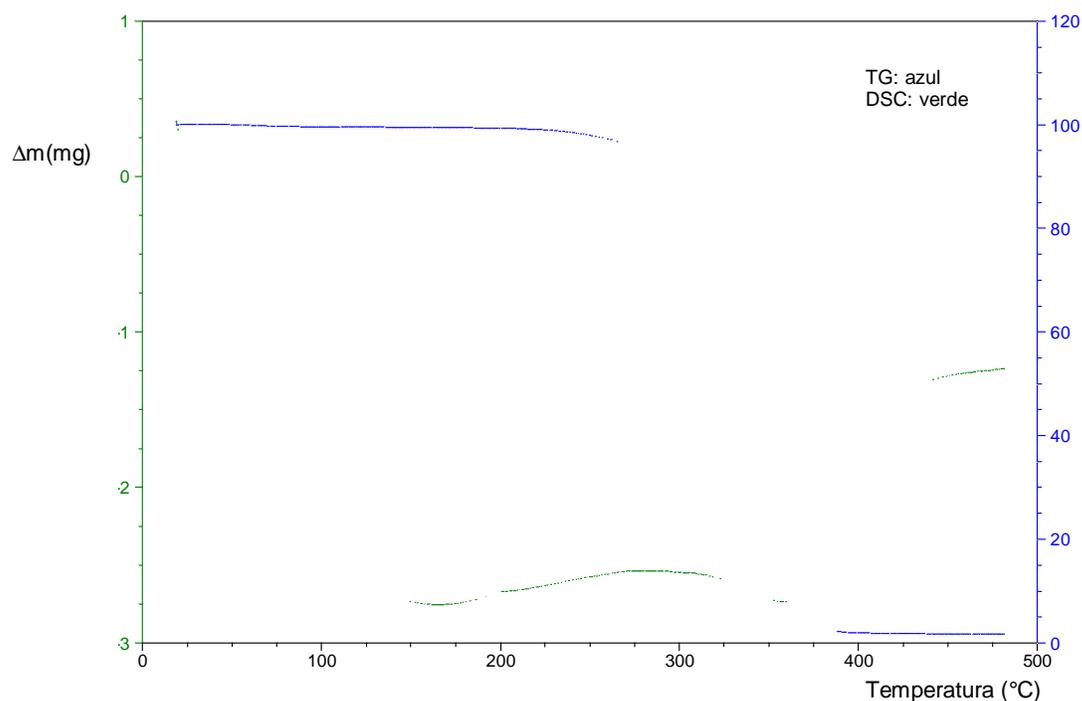


Figura 19 - Curva TG/DSC do SAIB (acetato isobutirato de sacarose)

Ésteres de ácido oléico, por exemplo, têm estabilidade térmica até cerca de 175°C (em atmosfera de ar), quando então começam a se degradar (DUFAURE; THAMRIN; MOULOINGUI, 1999).

Estes estudos mostram que os compostos SAIB e PG são os antioxidantes que podem propiciar a melhor proteção aos óleos vegetais e gorduras nos processos de frituras.

4.3 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA DE INFRAVERMELHO

Nas Figuras 20–28, mostradas a seguir, são apresentados os espectros de infravermelho dos óleos estudados submetidos a estresse térmico: na primeira fase de aquecimento, 4 horas/dia a 180 °C durante 7 dias consecutivos para os óleos de canola, milho, oliva e soja (Figuras 20-23), respectivamente; na segunda fase de aquecimento, 8 horas/dia a 180 °C durante por 10 dias, para os óleos de canola, milho, oliva, girassol e soja (Figuras 24-28), respectivamente.

Os espectros foram sobrepostos para facilitar a visualização das bandas de absorções de grupos funcionais. As ligações C-H do esqueleto hidrocarbônico são observadas em 2924, 2855 e 1458 cm^{-1} ; uma banda larga entre 3600 - 3200 cm^{-1} que corresponde a absorção dos grupos hidroxilas presentes nas carboxilas dos ácidos graxos livres (1640 cm^{-1}) em ligação de hidrogênio. A banda de absorção da ligação H-C das ligações duplas presentes nos ácidos graxos insaturados, são observadas em 3009, 1600, e 800-990 cm^{-1} . A absorção forte do grupo carboxila de ésteres são observadas em 1746 cm^{-1} . A absorção das ligações éteres, C-O-C, é observada entre 1163 e 1099 cm^{-1} . As posições relativas das bandas, são consistentes com o preconizado pela literatura (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998).

Todos os óleos estudados nas duas fases mostram uma forte absorção entre 3500 e 3000 cm^{-1} , que aumenta progressivamente à medida que aumenta o tempo de aquecimento dos óleos, em concordância com a termo-oxidação dos óleos, confirmando a sua progressiva deterioração, pois é nesta região que aparecem os sinais dos grupos carboxila e hidroperóxidos. É um indicativo seguro do aumento da acidez dos óleos, fato comprovado pela determinação da acidez.

Estas observações concordam com as de Adhvaryu, Perez e Tyagi (1998) no estudo da degradação oxidativa de óleos lubrificantes e por Chen, Liu e Hartman (1999).

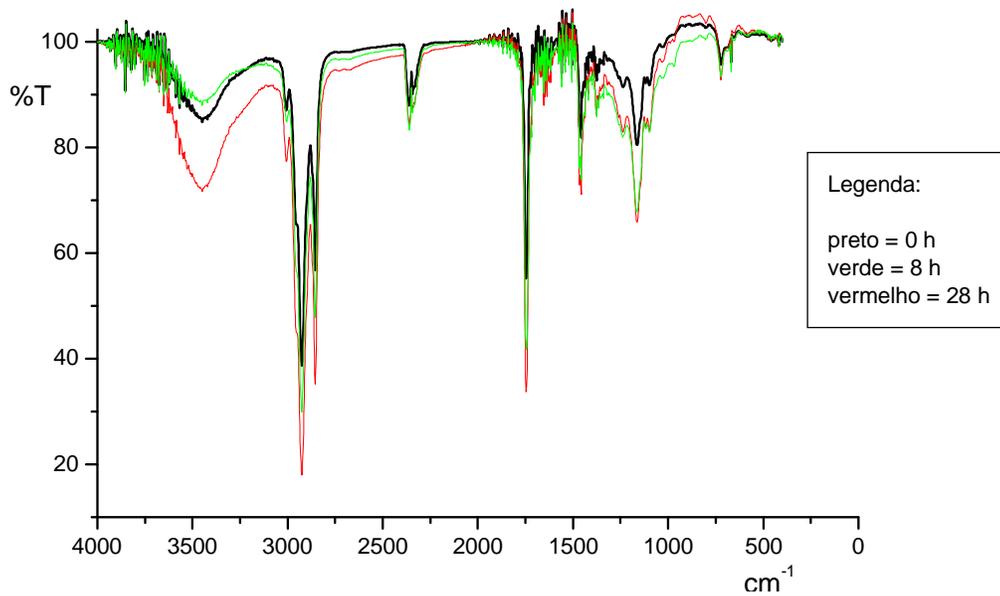


Figura 20 - Espectro de infravermelho do óleo de canola em diferentes tempos de aquecimento.

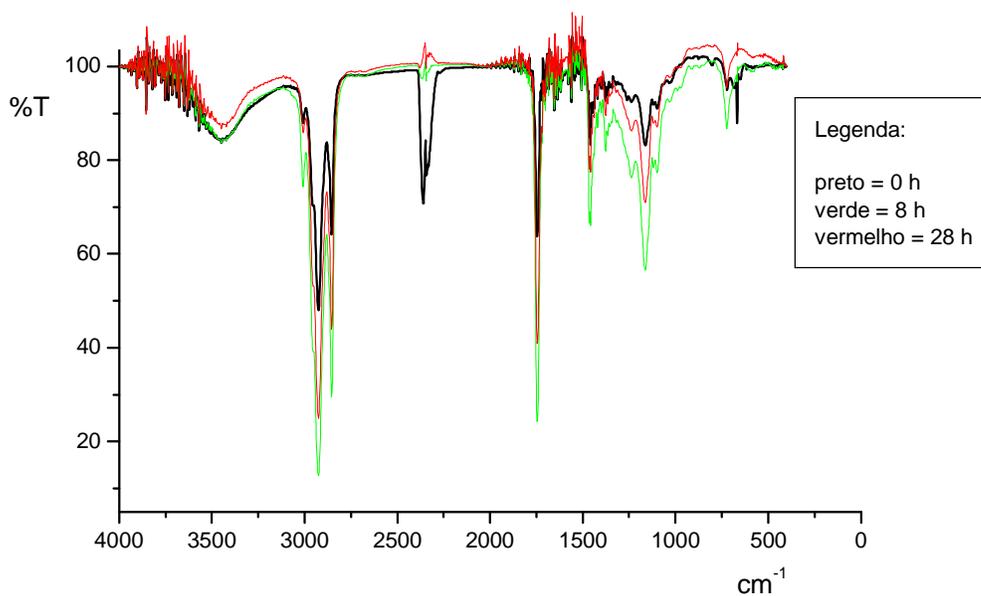


Figura 21 - Espectro de infravermelho do óleo de milho em diferentes tempos de aquecimento.

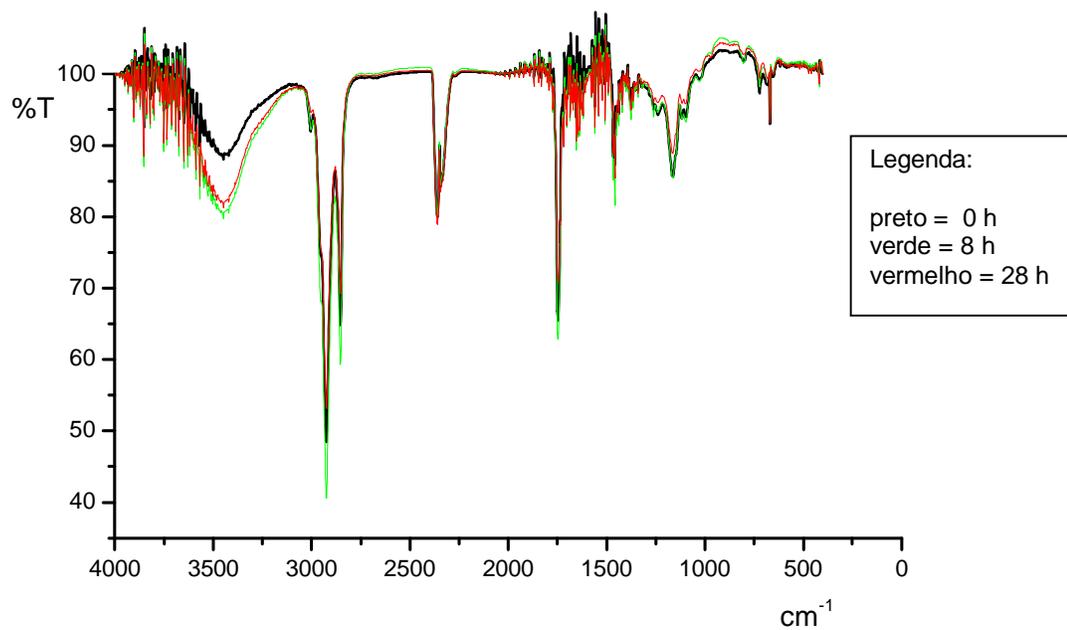


Figura 22 - Espectro de infravermelho do azeite de oliva em diferentes tempos de aquecimento.

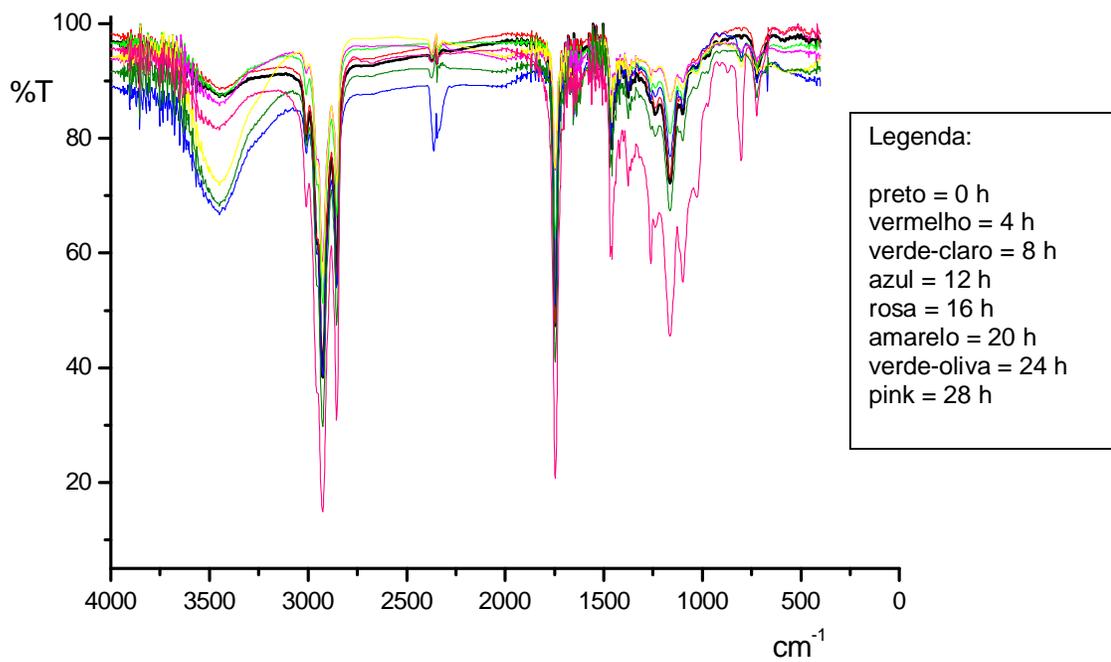


Figura 23 - Espectro de infravermelho do óleo de soja em diferentes tempos de aquecimento.

Nas Figuras 24–28, mostradas a seguir, são apresentados os espectros da segunda fase de aquecimento: 8 horas/dia por 10 dias (80 horas). É possível observar nesta fase, uma grande alteração na banda de 1300-1100 cm^{-1} , região de deformação dos grupos C-O-C e C-OH, assim como na faixa de $\sim 1450 \text{ cm}^{-1}$, região de deformação dos grupos C-H. É possível que esta alteração esteja relacionada com o aumento progressivo do grau polimerização dos óleos, devido ao aumento do número de ligações cruzadas (LI; LAROCK, 2003) e diminuição sistemática das ligações duplas ($\sim 3010 \text{ cm}^{-1}$).

Legenda: em horas de aquecimento

preto = 0 h

vermelho = 8 h

verde-claro = 16 h

azul = 24 h

rosa = 32 h

amarelo = 40 h

verde-oliva = 48 h

alaranjado = 56 h

azul-violeta = 64 h

pink = 72 h

azul-anil = 80 h

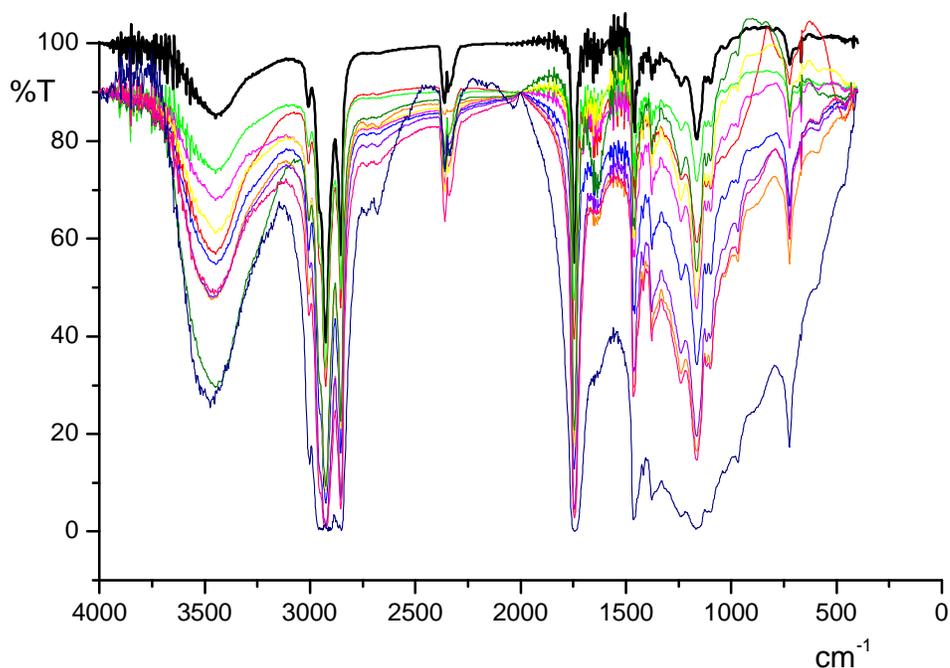


Figura 24 - Espectro de infravermelho do óleo de canola em diferentes tempos de aquecimento.

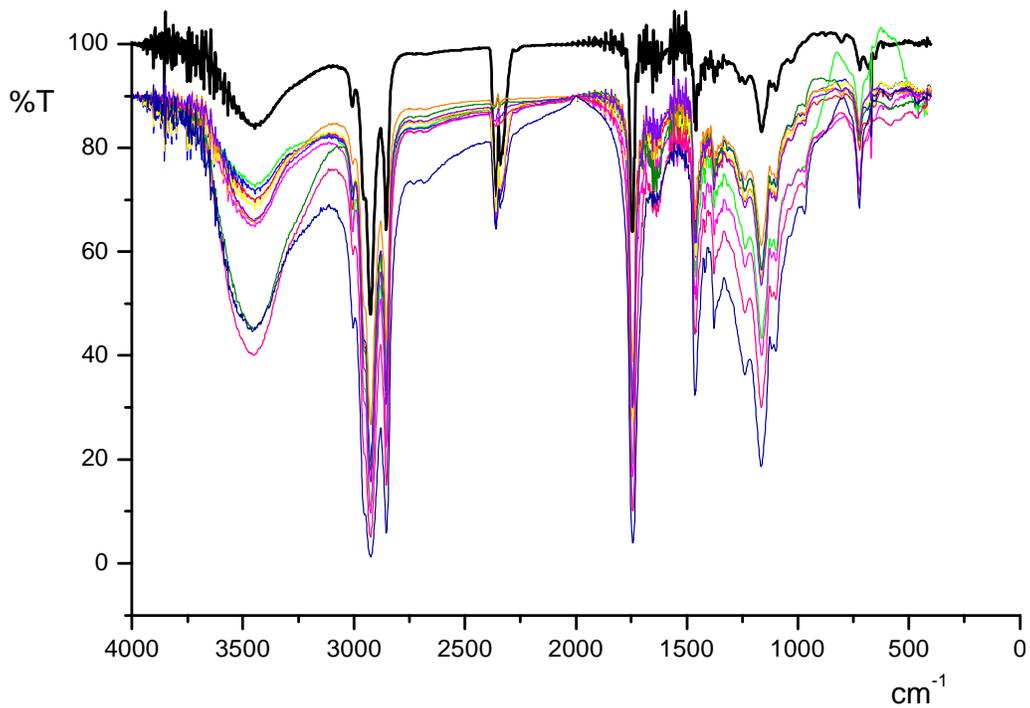


Figura 25 - Espectro de infravermelho do óleo de milho em diferentes tempos de aquecimento.

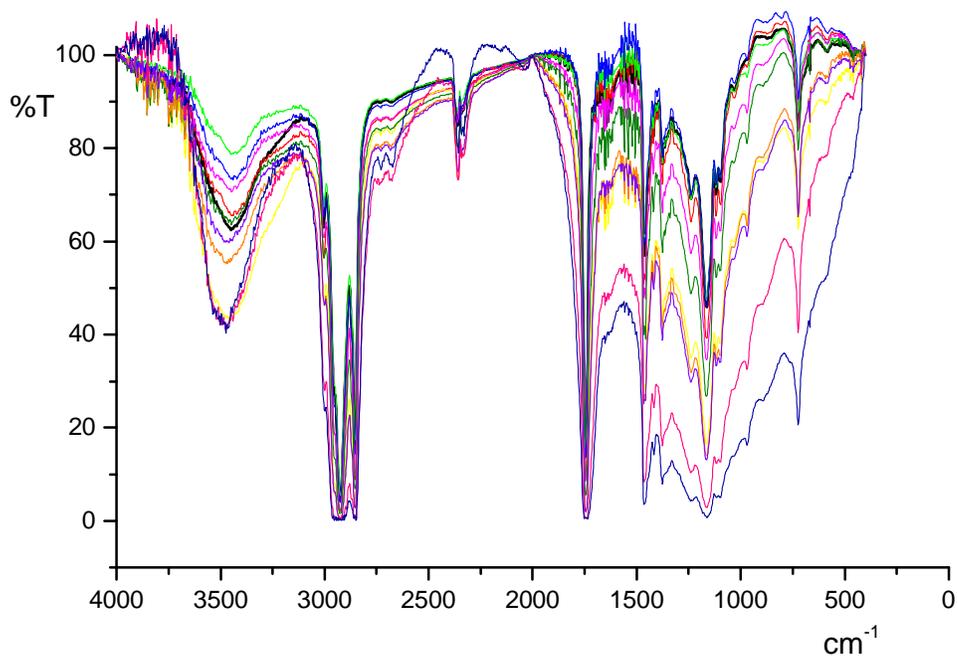


Figura 26 - Espectro de infravermelho do azeite de oliva em diferentes tempos de aquecimento.

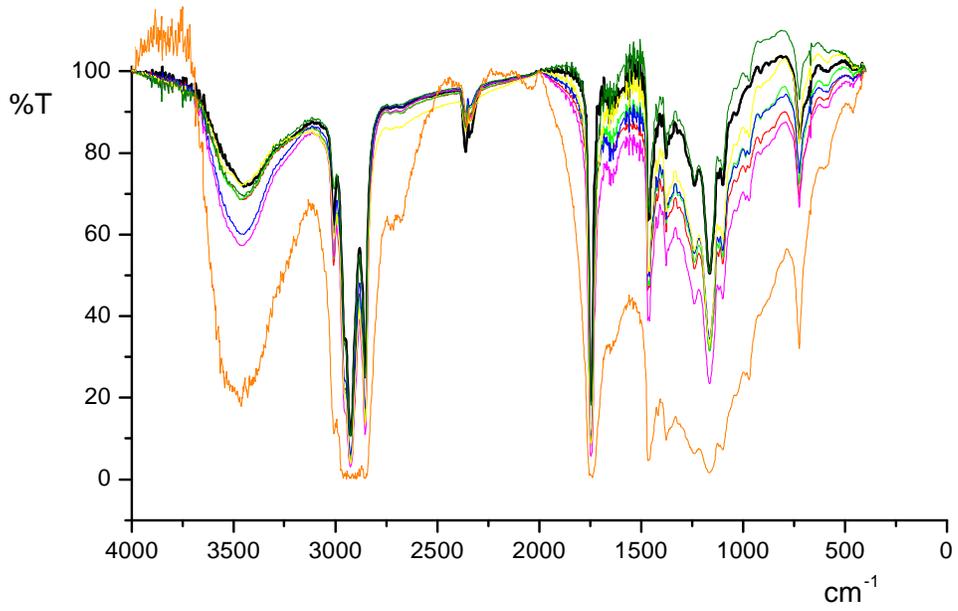


Figura 27 - Espectro de infravermelho do óleo de girassol em diferentes tempos de aquecimento.

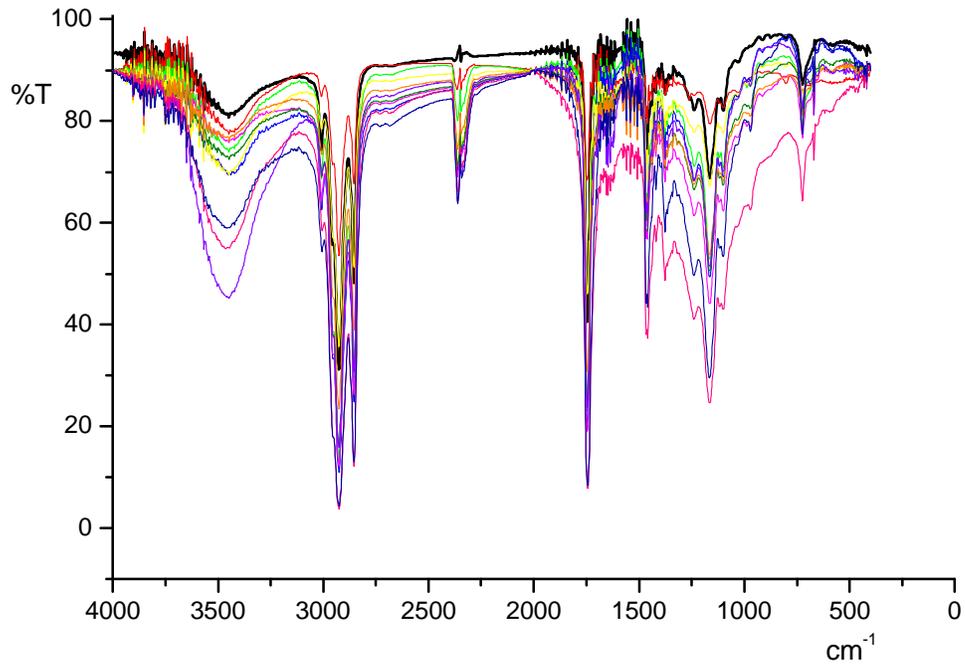


Figura 28 - Espectro de infravermelho do óleo de soja em diferentes tempos de aquecimento.

4.4 ANÁLISE POR DIFRAÇÃO DE RAIOS X

Uma característica importante observada na segunda fase foi a polimerização apresentada por todos os óleos estudados, no último período de aquecimento; exceto o óleo de girassol que polimerizou após 56 horas de aquecimento. A Figura 30, mostra o espectro de difração de raios-x do polímero obtido da termoxidação, o qual apresenta-se 85,4% amorfo e 14,6 % cristalino. O mecanismo de ação parece envolver a reação de Diels – Alder (Esquema 3) com a formação de pontes intermoleculares a altas temperaturas, com subsequente formação de ligações cruzadas. A polimerização térmica (Figura 29), envolve primariamente a dimerização dos ácidos graxos presentes no óleo vegetal, produzindo dímeros monocíclicos de grupo de ácidos graxos a uma temperatura de 200 °C ou superior (LI; LAROCK, 2003).



Figura 29 - Fotografia do óleo de girassol polimerizado

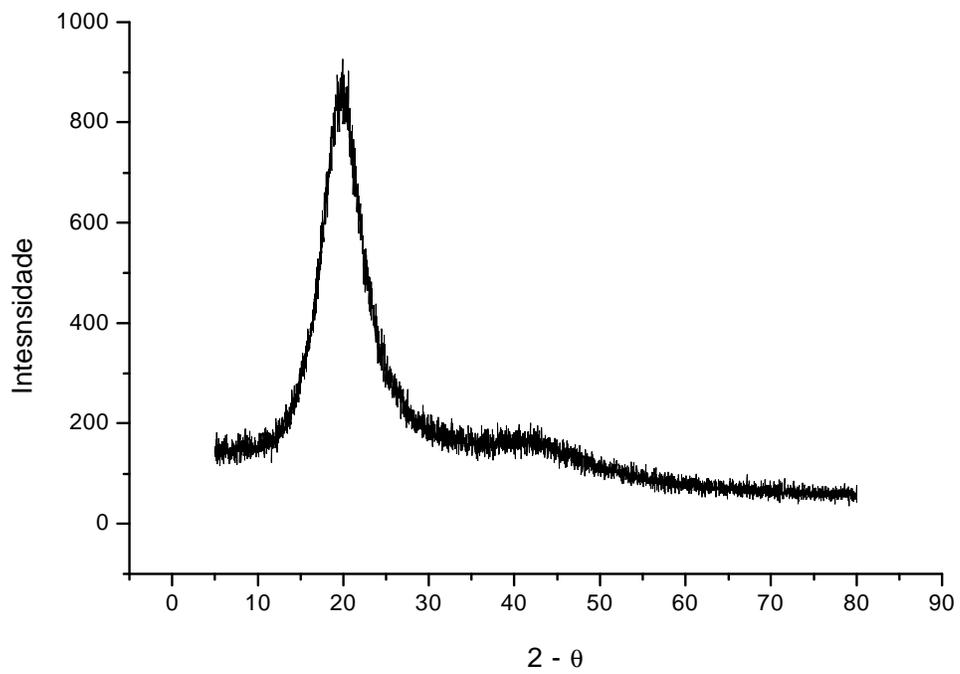


Figura 30 - Espectro por difração de raios-x do polímero do óleo de girassol

4.5 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA POR ULTRAVIOLETA - VISÍVEL

A espectroscopia de ultravioleta é útil para se observar a presença de insaturações em compostos orgânicos. Ligações duplas carbono-carbono, isoladas, absorvem próximo de 200 nm, com freqüente deslocamento batocrômico ou hipsocrômico, dependendo dos grupamentos cromóforos ligados ao sistema de elétrons π (GLAZER, 1990). Por exemplo, a presença de grupos funcionais que favoreçam a conjugação - deslocalização de elétrons π - contribui para estabilizar o sistema (menor energia e maior comprimento de onda, pois $E = hc/\lambda$) deslocando a posição da banda de absorção para maiores comprimento de onda no espectro. Assim, ligações duplas carbono-carbono em dienos, polienos e aromáticos (sistemas conjugados), absorvem em comprimentos de ondas maiores que os alcenos (ligações duplas carbono-carbono, isoladas).

Os espectros de ultravioleta dos óleos estudados são apresentados nas Figuras 31–39. Nas Figuras 31–34, são apresentados os espectros sobrepostos dos óleos de canola, milho, oliva e soja, sob aquecimento a 180 °C (4 horas/dia durante 7 dias), a primeira fase dos experimentos.

Legenda: tempo em horas de aquecimento

preto = 0
vermelho = 4h
verde-claro = 8h
azul = 12h
azul-claro = 16h
pink = 20h
amarelo = 24h
verde-oliva = 28h

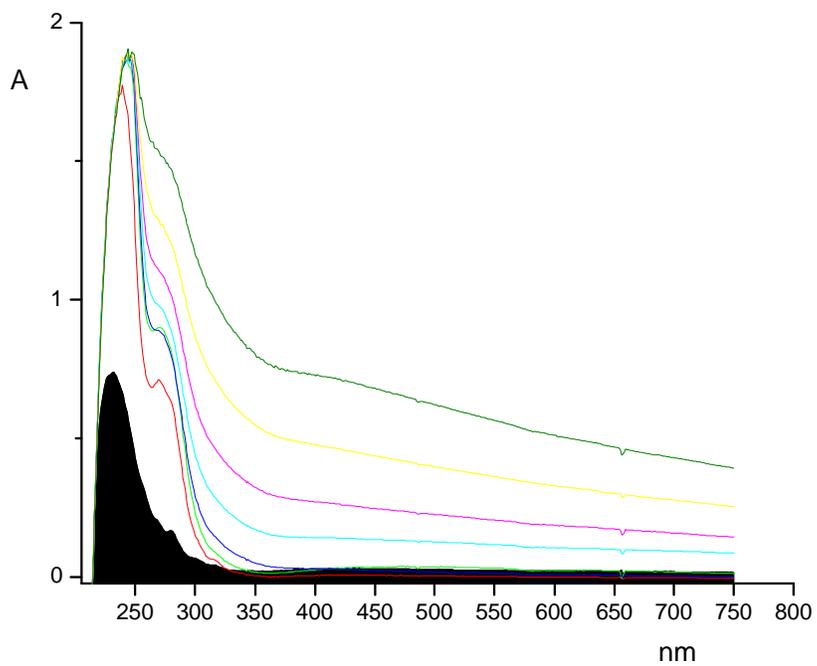


Figura 31 - Espectro UV do óleo de canola

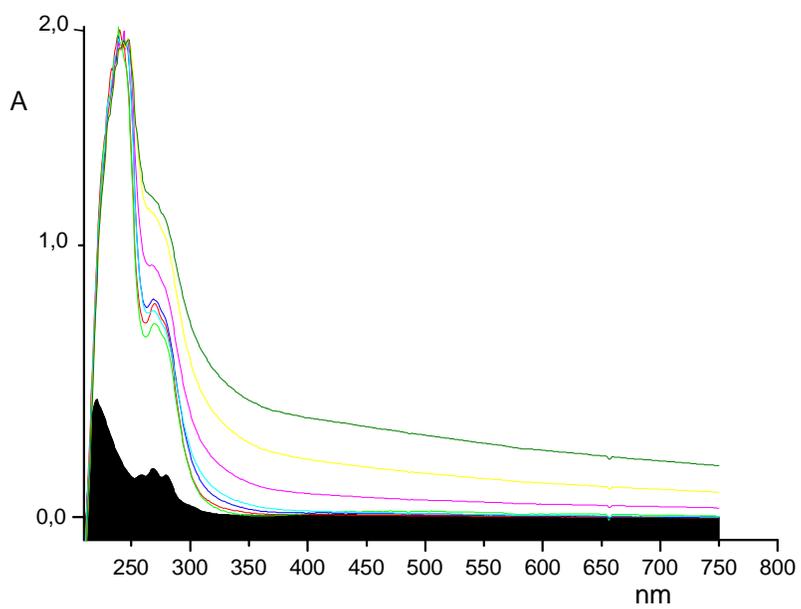


Figura 32 - Espectro UV do óleo de milho

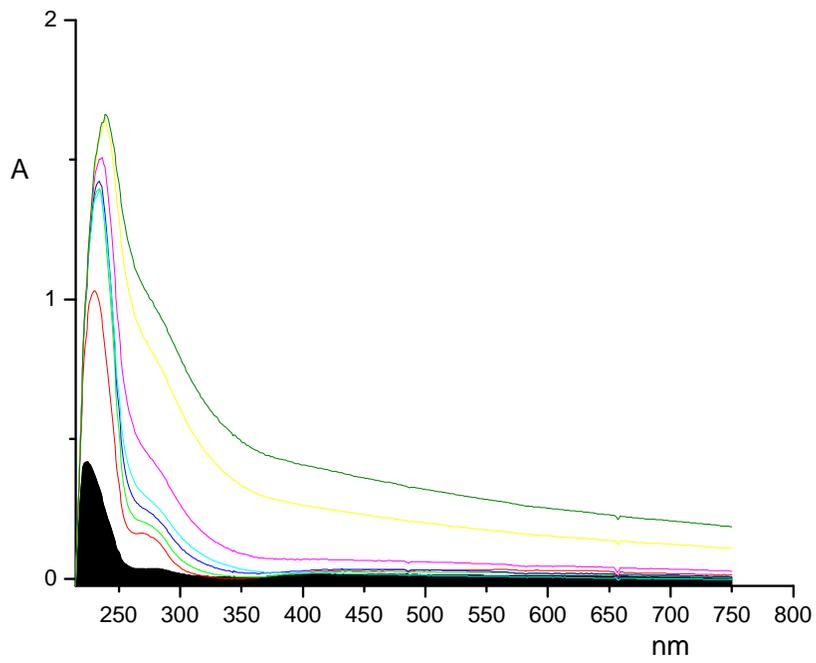


Figura 33 - Espectro UV do azeite de oliva

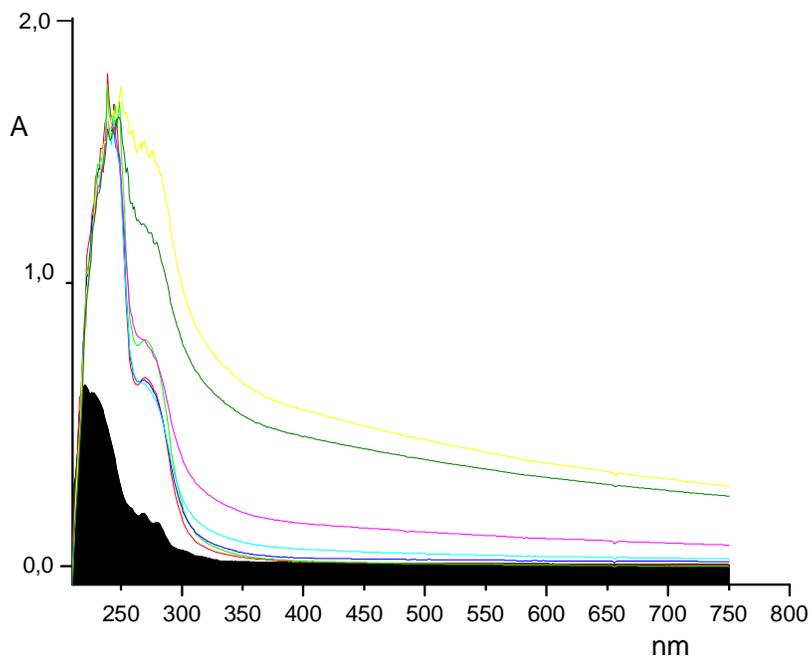


Figura 34 - Espectro UV do óleo de soja

Nas Figuras 35–39, são apresentados os espectros sobrepostos dos óleos de canola, milho, girassol, oliva e soja, sob aquecimento a 180 °C (8 horas/dia durante 10 dias), a segunda fase dos experimentos. O aumento da intensidade da absorção e do deslocamento batocrômico, deve-se à maior deterioração térmica do óleo.

Legenda: tempo de aquecimento em horas

vermelho = 8h
verde-claro = 16h
azul-escuro = 24h
azul-claro = 32h
rosa = 40h
amarelo = 48h
verde-oliva = 54h
laranja = 62h
violeta = 70h

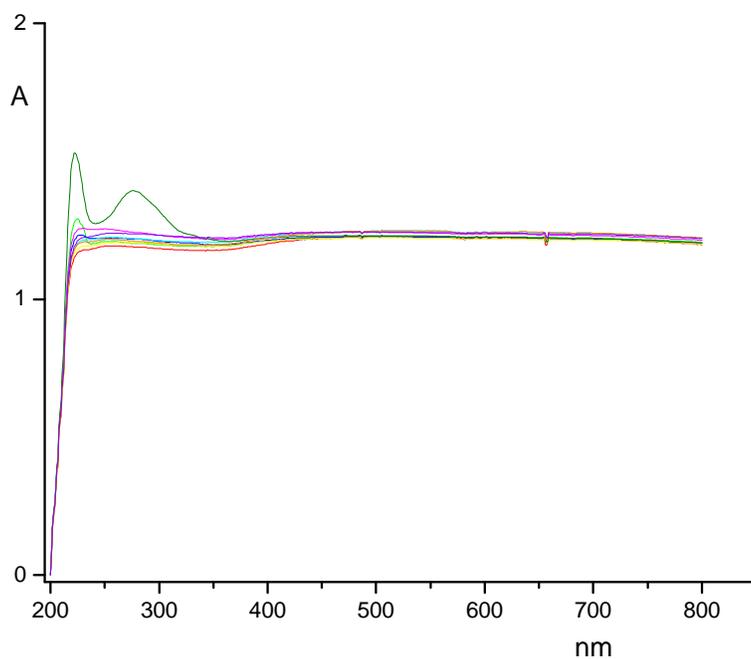


Figura 35 - Espectro UV do óleo de canola

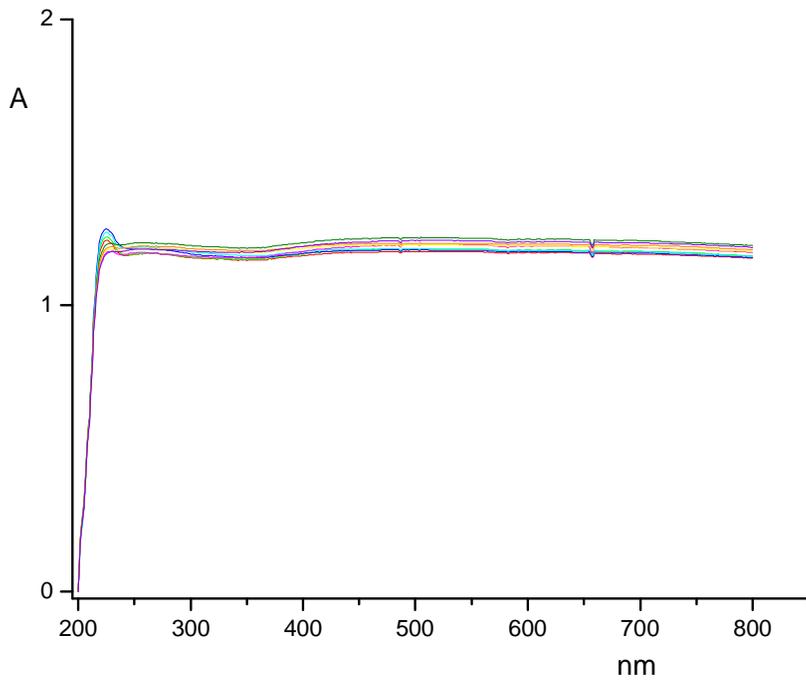


Figura 36 - Espectro UV do óleo de milho

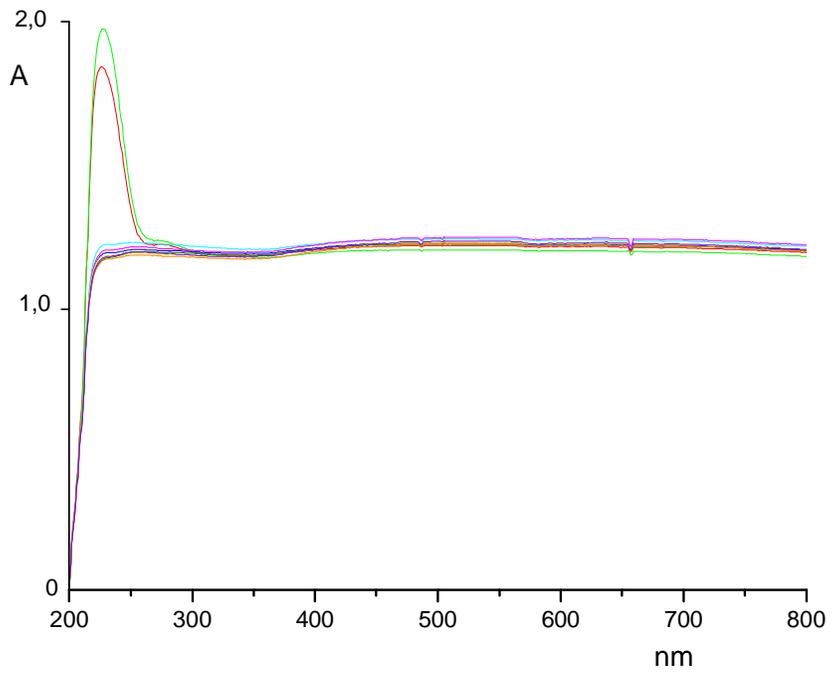


Figura 37 - Espectro UV do azeite de oliva.

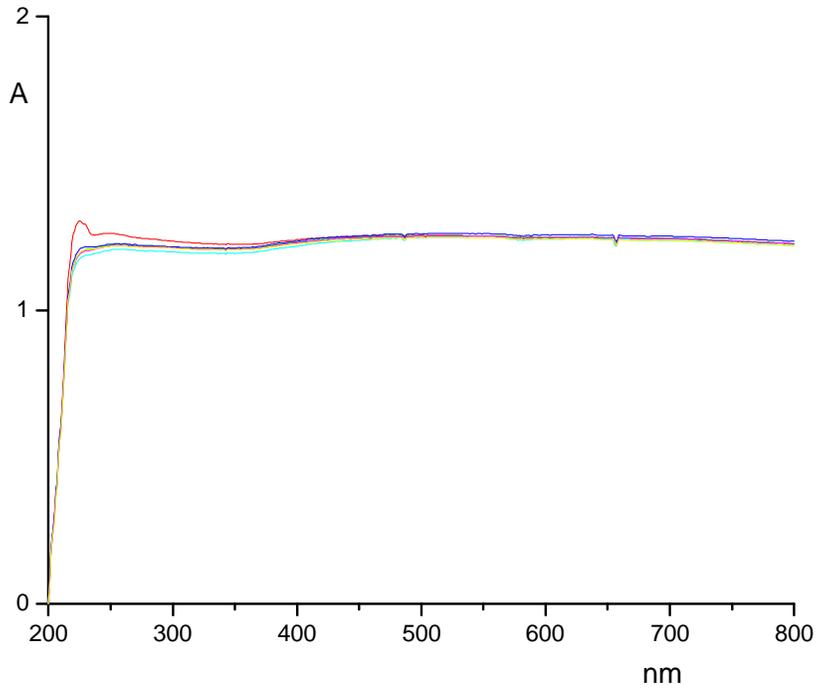


Figura 38 - Espectro UV do óleo de girassol.

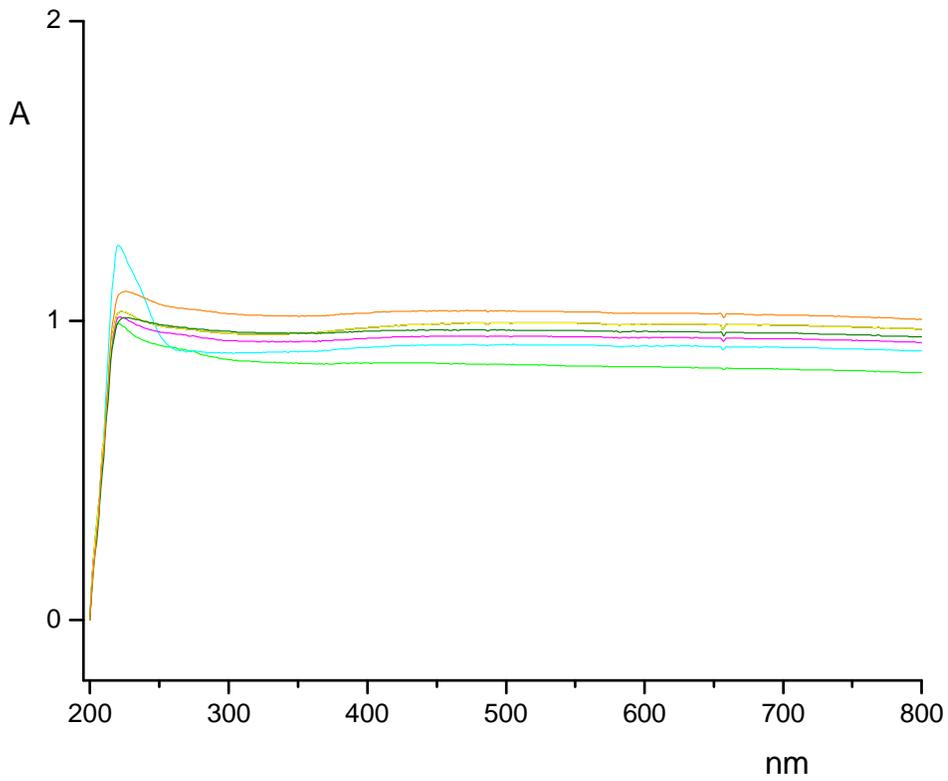


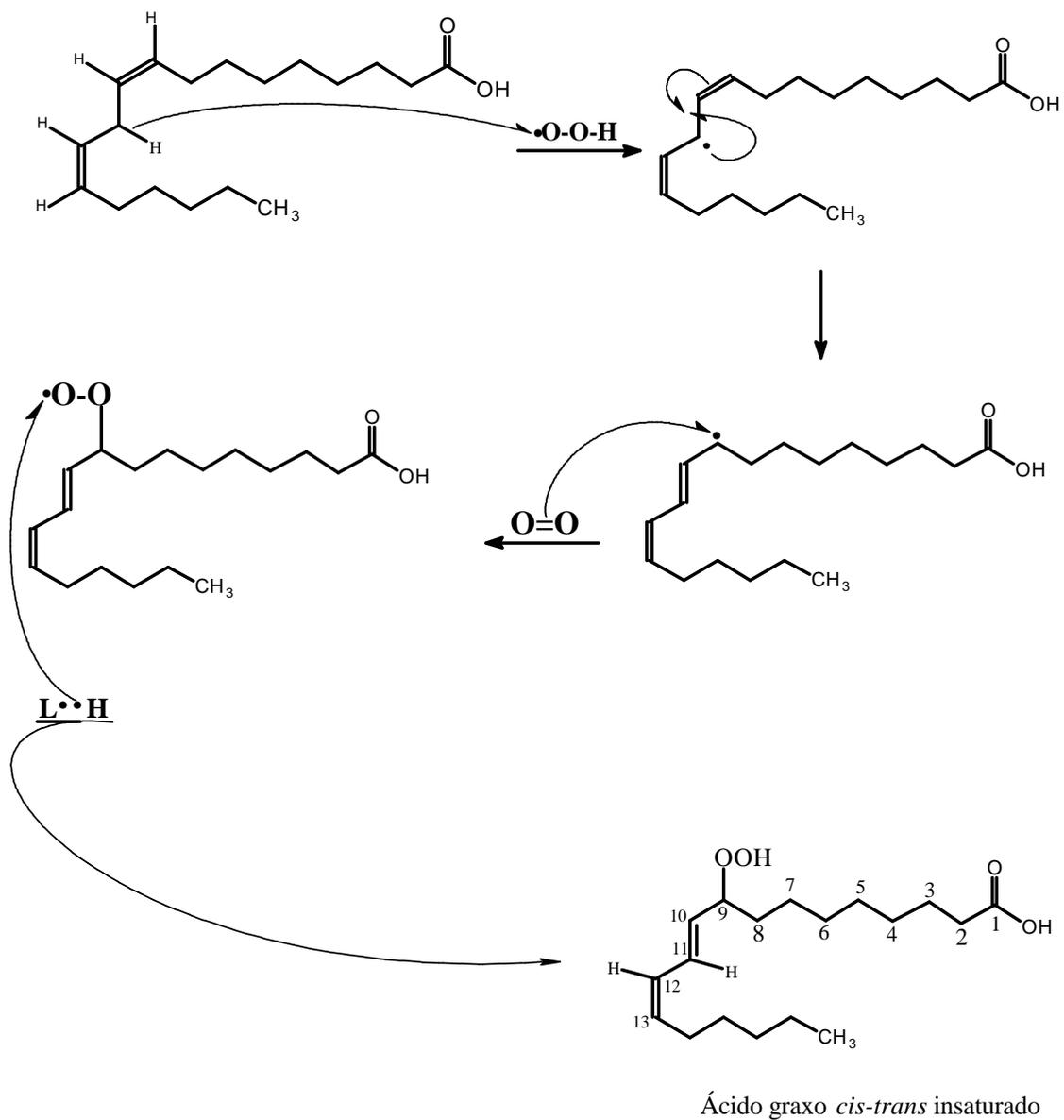
Figura 39 - Espectro UV do óleo de soja.

Todos os espectros – para todos os óleos estudados e não aquecidos - mostram forte absorção em 230 nm, devido às ligações duplas carbono-carbono presentes nos ácidos oléico, linoléico e linolênico e que contribuem para o alto grau de insaturação dos óleos. Estas observações estão de acordo com relatos da literatura para espectros de ultravioleta de compostos insaturados (OWEN; HAUBNER; MIER, et al., 2003).

Todos os espectros mostram um pronunciado efeito batocrômico inerente a progressiva termo-oxidação dos óleos vegetais estudados, processo que leva a formação de peróxidos e formação de isômeros *trans*, conjugados, o que necessariamente aumenta a intensidade e posição da banda de absorção para comprimentos de onda maiores (o efeito batocrômico). Estas observações são compatíveis com as alterações estruturais que ocorrem nos ácidos graxos insaturados livres ou esterificados em triacilgliceróis durante o processo termo-oxidativo, devido às reações de isomerização, com a conseqüente formação de sistemas conjugados: reações de epoxidação e peroxidação (Esquemas 5 e 7).

Por meio dos espectros de UV-vis, é possível monitorar a qualidade dos óleos em estudo. Os óleos não aquecidos, apresentam $A \leq 0,7$ em $\lambda = 230$ nm, numa diluição de 1:1000. Com isso, é possível fazer uma análise qualitativa de qualquer óleo vegetal. Óleos vegetais com absorbância até 0,7 e $\lambda = 230$ (numa diluição 1:1000), são próprios para o consumo.

Esquema 7 - Termo-oxidação e isomerização do ácido linoléico



FONTE: KESZLER; KRISKA; NÉMETH, 2000

4.6 ANÁLISE FÍSICO-QUÍMICA DOS ÓLEOS VEGETAIS

4.6.1 Índices de Acidez e Peróxido

As Tabelas 9–12, mostram os resultados obtidos para os índices peróxido e acidez, dos óleos de canola (*Brassica campestris*), milho (*Zea mays*), oliva (*Olea europea*) e soja (*Glycine max*) submetidos a diferentes tempos de aquecimento a 180 °C, na primeira fase dos experimentos, aquecimento moderado com 4 h/dia durante 7 dias. As Tabelas 13–17, mostram os resultados das determinações dos índices de: peróxido e acidez, sob aquecimento mais enérgico (8 h/dia, durante 10 dias), dos óleos de canola (*Brassica campestris*), milho (*Zea mays*), oliva (*Olea europea*), girassol (*Helianthus annuus*) e soja (*Glycine max*).

O teor de peróxidos para os óleos não aquecidos refinados, manteve-se em torno de 1,90 mEq/kg, como preconiza a legislação (ANVISA,1999), com exceção do azeite de oliva que apresentou teor de peróxidos muito maior: 9,51 mEq/kg na primeira fase e 5,80 mEq/kg para a segunda fase. Como o teor de peróxidos indica o grau de auto-oxidação do óleo (FENNEMA, 2000), fica claro que os óleos refinados possuem boa proteção quanto à oxidação, devido à presença de antioxidantes. Com exceção do óleo de girassol, em comparação com o azeite de oliva, que se mostrou mais vulnerável às ações oxidativas, devido ao processo de obtenção do azeite de oliva, que implica somente numa prensagem como método extrativo (RANALLI; FERRANTE; MATTIA, et al., 1999). Isto o torna mais susceptível aos processos oxidativos, como a foto-oxidação, além de não ser permitido pela legislação, o acréscimo de qualquer produto sintético ao óleo, como a adição de antioxidantes, tornando-o menos resistente ao ataque foto-oxidativo. A diferença nos índices de

peróxido dos óleos de oliva nas duas fases, deve-se provavelmente à embalagem do produto. O azeite de oliva utilizado na segunda fase, tinha embalagem de metal, com restrição total à passagem de luz; na primeira fase, foi utilizado azeite de oliva em embalagem de vidro transparente, o que facilitou os efeitos foto-oxidativos da luz. O que torna significativo o fato de algumas marcas acondicionarem o azeite de oliva em vidro transparente, interferindo negativamente na prevenção da foto-oxidação e aumentando o teor de peróxidos.

Outro efeito importante observado, foi a redução dos teores de peróxidos a partir do terceiro aquecimento, nas duas fases para todos os óleos estudados. Isso está de acordo com a natureza dos peróxidos formados, os quais são muito instáveis, reativos e se degradam facilmente, formando produtos mais estáveis como dímeros, trímeros e polímeros. O aquecimento mais enérgico na segunda fase, proporcionou as condições necessárias para que os peróxidos formados promovessem polimerização em todos os óleos, dando-lhes uma consistência visco-elástica (Figura 29).

A acidez crescente foi uma característica marcante para todos os óleos estudados, independente da intensidade do aquecimento. Assim, é muito recomendável que não se reutilize óleos vegetais, principalmente pelos efeitos gastrintestinais que causam os óleos com alto índice de acidez.

a) Primeira fase:

Tabela 9 - Análise físico-química do óleo de Canola (*Brassica campestris*).

Tempos de aquecimentos	Teor de peróxidos (mEq/kg)	Acidez livre (g%)
0 h	1,90	0,13
4 h	7,59	0,27
8 h	7,77	0,41
12 h	3,88	0,68
16 h	4,80	0,68
20 h	3,80	0,82
24 h	3,80	0,96
28 h	3,80	1,20

Tabela 10 - Análise físico-química do óleo de Milho (*Zea mays*).

Tempos de aquecimentos	Teor de peróxidos (mEq/kg)	Acidez livre (g%)
0 h	1,90	0,13
4 h	9,51	0,40
8 h	3,79	0,41
12 h	3,80	0,55
16 h	1,90	0,83
20 h	1,90	0,65
24 h	1,89	0,65
28 h	3,81	0,83

Tabela 11 - Análise físico-química do azeite de oliva (*Olea europea*).

Tempos de aquecimentos	Teor de peróxidos (mEq/kg)	Acidez livre (g%)
0 h	9,51	0,65
4 h	9,51	0,55
8 h	9,74	0,82
12 h	5,85	0,96
16 h	3,80	0,96
20 h	3,87	1,00
24 h	1,90	1,30
28 h	1,90	1,50

Tabela 12 - Análise físico-química do óleo de soja (*Glycine max*).

Tempos de aquecimentos	Teor de peróxidos (mEq/kg)	Acidez livre (g%)
0 h	1,95	0,10
4 h	9,81	0,27
8 h	7,80	0,40
12 h	1,97	0,67
16 h	1,96	0,55
20 h	<1,00	0,54
24 h	<1,00	0,67
28 h	<1,00	0,81

b) Segunda fase:

Tabela 13 - Análise físico-química do óleo de Canola (*Brassica campestris*).

Tempos de aquecimentos	Índice de peróxidos (mEq/kg)	Acidez livre (g %)
0 h	1,90	0,13
8 h	5,70	0,27
16 h	7,70	0,48
24 h	3,80	0,67
32 h	3,10	0,82
40 h	3,80	0,96
48 h	1,90	1,24
56 h	1,94	1,51
64 h	1,90	1,64
72 h	1,90	1,63
80 h	Polimerização	Polimerização

Tabela 14 - Análise físico-química do óleo de Milho (*Zea mays*).

Tempos de aquecimentos	Índice de peróxidos (mEq/kg)	Acidez livre (g %)
0 h	1,90	0,13
8 h	7,70	0,27
16 h	6,80	0,48
24 h	3,90	0,62
32 h	3,80	0,82
40 h	3,80	0,95
48 h	1,90	1,24
56 h	1,93	1,50
64 h	1,90	1,49
72 h	1,90	2,05
80 h	Polimerização	Polimerização

Tabela 15 - Análise físico-química do azeite de Oliva (*Olea europea*).

Tempos de aquecimentos	Índice de peróxidos (mEq/kg)	Acidez livre (g %)
0 h	5,80	0,54
8 h	9,70	0,62
16 h	7,70	0,80
24 h	3,90	1,10
32 h	3,80	1,70
40 h	3,80	1,24
48 h	3,90	1,52
56 h	1,94	1,91
64 h	1,90	2,75
72 h	1,90	2,87
80 h	Polimerização	Polimerização

Tabela 16 - Análise físico-química do óleo de Girassol (*Helianthus annuus*).

Tempos de aquecimentos	Índice de peróxidos (mEq/kg)	Acidez livre (g %)
0 h	3,80	0,41
8 h	5,80	0,41
16 h	6,80	0,34
24 h	3,80	0,41
32 h	3,80	0,55
40 h	3,80	0,82
48 h	1,90	0,96
56 h	Polimerização	Polimerização
64 h	Polimerização	Polimerização
72 h	Polimerização	Polimerização
80 h	Polimerização	Polimerização

Tabela 17 - Análise físico-química do óleo de Soja (*Glycine max*).

Tempos de aquecimentos	Índice de peróxidos (mEq/kg)	Acidez livre (g %)
0 h	1,95	0,10
8 h	9,60	0,27
16 h	7,80	0,34
24 h	3,91	0,41
32 h	3,80	0,54
40 h	3,90	0,68
48 h	1,90	0,97
56 h	1,93	1,24
64 h	1,90	1,33
72 h	Polimerização	Polimerização
80 h	Polimerização	Polimerização

4.6.2 Índice de iodo: o índice de iodo (wijs) dos óleos de milho, soja, girassol e oliva - não aquecidos - e óleo de canola (série completa) são apresentados na Tabela 19 para comparação com os valores determinados por RMN H¹.

Tabela 18 - Índice de iodo determinado por RMN de H¹ e pelo método de Wijs em amostras de óleos vegetais *in natura* e sob aquecimento.

Óleo vegetal	Índice de iodo determinado por RMN de H ¹ (g %)	Índice de iodo determinado pelo método de Wijs (g %)
Milho <i>in natura</i>	119,47	108,7
Oliva <i>in natura</i>	77,98	82,27
Girassol <i>in natura</i>	139,75	114,44
Soja <i>in natura</i>	136,48	124,08
Canola <i>in natura</i>	114,30	110,8
Canola 8 horas	102,41	103,96
Canola 16 horas	96,06	92,13
Canola 24 horas	85,08	91,05
Canola 32 horas	77,20	84,05
Canola 40 horas	67,88	82,62
Canola 48 horas	60,24	79,21

Os valores do índice de iodo de todos os óleos *in natura* determinado por RMN H¹, são pouco menores que os encontrados pelo método de Wijs, o que pode ser racionalizado pela configuração das duplas ligações conjugadas (*cis*, *trans*) existentes nos ácidos graxos insaturados estressados termicamente e com o iodo passível de adição 1,2 e 1,4, não saturando totalmente (Esquema 6). Assim, o método iodométrico de Wijs não é tão preciso na determinação do índice de iodo, por causa das adições 1,4 nos sistemas conjugados que revela ligações duplas intactas, não sofrendo com isso adição de halogênio.

Os dados da Tabela 18 foram usados para análise de regressão linear entre os dois métodos e o resultado é apresentado nas Figuras 40 e 41.

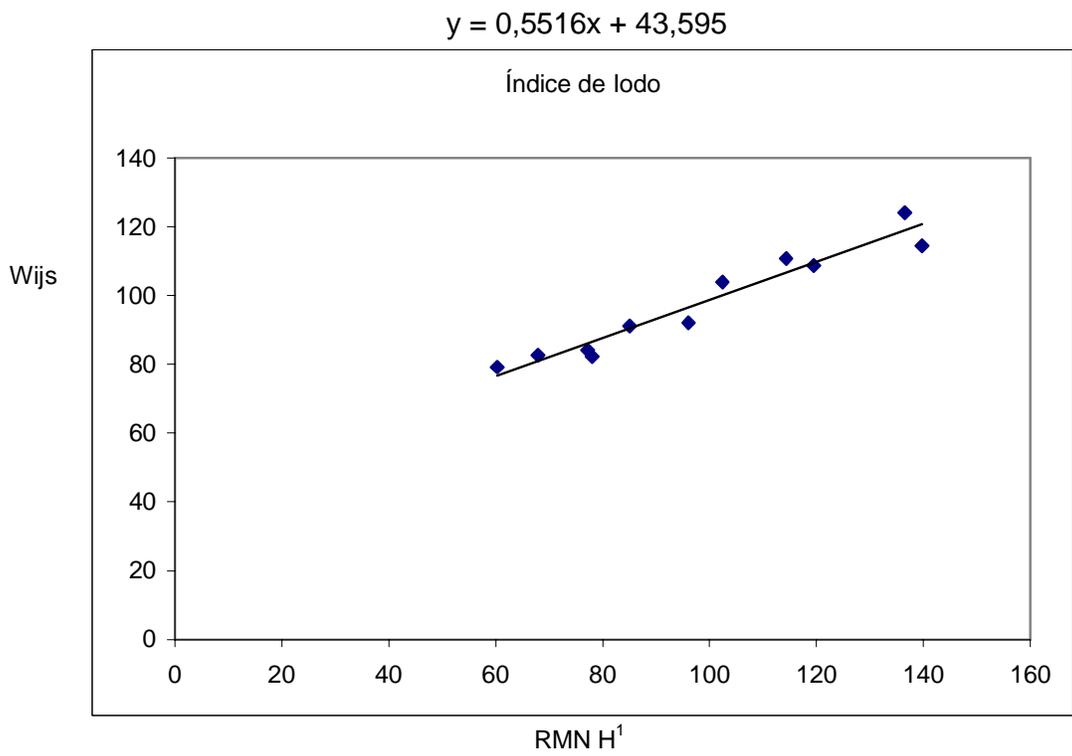


Figura 40 – Regressão linear entre os métodos: RMN H¹ e Wijs para o índice de iodo [$r^2 = 0,9365$; $r = 0,9677$; $n = 11$].

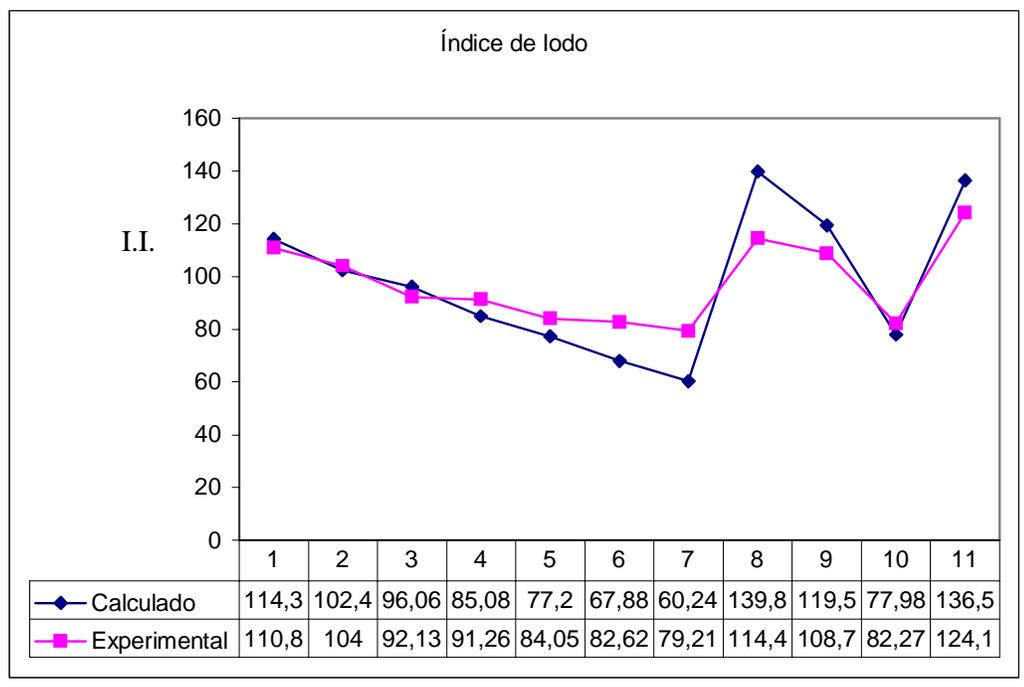


Figura 41 – Gráfico de comparação do índice de iodo entre os métodos: Wijs (experimental) e RMN H¹(calculado).

É possível observar pelos gráficos e pelo modelo de regressão linear, que o coeficiente de determinação (r^2) entre os dois métodos é satisfatória, visto que o modelo explica 93,65% da variação dos dados, confirmando que a determinação do índice de iodo por RMN de H^1 pode ser utilizada.

Na Tabela 19, foram estendidos os cálculos e se determinou o índice de iodo por RMN de H^1 de todos os óleos sob quaisquer tempos de aquecimento, condição que restringe o uso do método de Wijs para tempos de aquecimento prolongados onde os óleos polimerizam. Só a RMN permite o cálculo em qualquer circunstância, mostrando que a técnica de análise por RMN de H^1 é superior, preciso e sensível (JOSEPH-NATHAN, 1982).

Tabela 19 - Índice de iodo determinado por RMN de H^1 em amostras de óleos vegetais aquecidos em diversos tempos de aquecimento.

Tempo de aquecimento (em h)	ÓLEO VEGETAL				
	Canola	Milho	Oliva	Girassol	Soja
0	114,34	119,47	77,98	139,75	136,48
8	102,41	-	-	-	-
16	96,06	-	-	-	-
24	85,08	-	-	-	-
32	77,20	-	-	-	-
40	67,88	-	-	-	-
48	60,24	-	-	-	-
56	56,53	-	-	60,27	-
64	53,94	-	-	-	-
72	50,76	-	-	-	-
80	50,30	49,63	29,20	-	53,67

A Tabela 20, apresenta o perfil de hidrogênios, obtidos das curvas de integração dos espectros de RMN de H^1 do óleo de canola *in natura* e sob diversos

tempos de aquecimento (180-200°C, 0-80h); na Tabela 21, observa-se o perfil de hidrogênios dos demais óleos estudados em diversos tempos de aquecimento (180-200°C, 0-80h); na Tabela 22 é mostrado o perfil de hidrogênio dos óleos vegetais estudados nos diversos tempos de aquecimento, na primeira fase de aquecimento (180-200°C, 0-80h). É possível observar na Tabela 20, a variação da intensidade dos sinais dos hidrogênios do triacilglicerol com o aquecimento progressivo. O mesmo comportamento foi observado com os demais os óleos vegetais estudados. Fica evidente o contínuo decréscimo do teor de ácido linolênico (ω -3) cuja concentração vai a zero após 72 horas de aquecimento. Outro efeito importante da termo-oxidação pode ser observada nas regiões dos prótons alílicos internos (g) e externos (e). Estes prótons que correspondem aos ácidos linoléico e linolênico, que sob prolongado aquecimento mostram redução das intensidades: 64,2% e 7,02%, respectivamente. Observa-se que o grau de insaturação do óleo é afetado de maneira progressiva e contínua, pelo aquecimento, pois diminui a intensidade dos hidrogênios olefínicos. Logo, pela análise do espectro integrado de RMN de H^1 de qualquer óleo vegetal, é possível fazer uma estimativa rápida, da qualidade do óleo; igualmente as intensidades dos sinais dos hidrogênios olefínicos (d; f) aumentam com a deterioração do óleo. O peso molecular médio (PM) de todos os óleos vegetais estudados, sofre uma redução ao chegar ao último tempo de aquecimento, mesmo tendo algumas variações. Este efeito fica mais evidente para os óleos estudados na segunda fase de aquecimento do que na primeira fase e pode ser o resultado da contínua formação e quebra de cadeias poliméricas, que vão se formando com o tempo de termo-oxidação, com perda sucessiva de massa, resultando numa redução final do PM médio dos triacilgliceróis dos óleos vegetais.

Na análise dos dados de RMN de H¹ da Tabela 22 para os óleos de canola, oliva, soja e milho para a primeira fase de aquecimento, é possível prever o estado de oxidação de cada óleo estudado, por meio da estabilidade oxidativa dos óleos. Segundo Guillén e Ruiz (2001), esse importante indicador da resistência à oxidação, pode ser obtido por meio da relação entre os prótons olefínicos e os prótons alifáticos, do espectro de RMN de H¹ dos óleos vegetais, conforme a equação (IX):

$$R_{o,a} = \frac{V}{a+b} \quad (\text{IX})$$

onde:

$R_{o,a}$ = relação entre prótons olefínicos / alifáticos;

V = prótons olefínicos (Equação II);

a + b = prótons alifáticos.

Para os óleos estudados na primeira fase de aquecimento, tem-se a seguinte relação $R_{o,a}$:

- óleo de canola = 0,4686;
- óleo de milho = 0,4863;
- óleo de soja = 0,5202;
- azeite de oliva = 0,3053.

Portanto, pelo estudo da estabilidade térmica dos óleos aquecidos 28 horas (180-200°C), pode-se dizer que o óleo mais estável foi o óleo de soja, seguido pelos óleos de milho, canola e azeite de oliva.

Na segunda fase de aquecimento, é possível também se classificar os óleos vegetais segundo a resistência a termo-oxidação. Sendo a resistência à polimerização total, um critério importante, a ordem dos óleos mais resistentes seria: canola, milho, azeite de oliva, óleos de soja e girassol. Porém como os óleos de canola, milho e oliva, polimerizaram todos com 80 horas, é possível prever qual dentre eles é mais estável por meio da relação $R_{o,a}$:

- óleo de canola = 0,3264;
- óleo de milho = 0,3197;
- óleo de oliva = 0,1898.

Assim, o óleo mais estável é o óleo de canola, seguido pelos óleos de milho e pelo azeite de oliva. Portanto, para a segunda fase de aquecimento, os óleos mais estáveis a termo-oxidação são: canola, milho, oliva, soja e girassol.

Tabela 20 - Perfil de hidrogênios dos triacilgliceróis, obtido da curva de integração do espectro de RMN de H¹ do óleo de canola.

	0	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80
k + j	8,72	7,85	7,60	6,82	6,32	5,65	5,18	4,88	4,73	4,51	4,62
i + h	4,08	3,98	4,34	4,29	3,56	4,31	4,45	4,32	4,40	4,41	4,76
δ 3,72					Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	0,09	Tr
g	2,42	2,01	1,67	1,28	1,19	0,72	0,61	0,36	0,40	0,47	0,17
f	6,11	6,16	6,51	6,63	6,72	6,68	7,03	6,85	7,03	7,48	7,22
e	11,16	10,70	10,11	9,81	9,09	8,58	8,43	7,87	7,50	7,70	7,16
d	6,85	7,13	6,81	7,71	9,49	8,48	9,21	8,55	8,81	9,47	10,20
c	51,81	53,41	55,08	54,84	54,93	56,53	56,35	57,83	57,77	56,7	57,04
[Ln] = b	0,84	0,80	0,43	0,48	0,39	0,03	0,02	0,27	0,00	0,00	0,00
a	8,01	7,96	7,45	8,14	8,31	9,02	8,72	9,07	9,36	9,09	8,83
a + b	8,85	8,76	7,88	8,62	8,70	9,05	8,74	9,34	9,36	9,09	8,83
Σ =	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,00	100,0	100,0	100,0	100,0
Área/H	1,020	0,995	1,085	1,072	0,890	1,078	1,112	1,080	1,100	1,10	1,190
Vinil	7,549	6,855	6,005	5,359	6,100	4,244	3,656	3,518	3,300	3,09	2,882
Σ = H	98,02	100,4	92,16	93,24	112,3	92,81	89,90	92,59	90,90	90,60	84,03
PM, médio	854,6	867,9	804,11	807,80	946,8	798,15	774,15	792,23	779,02	775,	728.2

Tabela 21 - RMN de H¹ dos óleos vegetais na segunda fase de aquecimento [180-200°C, 0-80 h].

	GIRASSOL		MILHO		OLIVA		SOJA	
	0	56	0	80	0	80	0	72
k + j	10,51	5,23	9,16	4,65	6,23	3,05	10,29	4,80
i + h	4,24	4,67	4,30	4,99	3,99	4,42	4,30	4,79
g	4,09	1,32	3,09	0,47	0,40	0,34	4,34	1,01
f	6,35	7,26	6,41	7,38	5,95	7,00	6,34	7,24
e	11,02	6,41	10,42	5,60	10,26	5,06	10,32	6,02
d	6,03	9,20	6,03	10,90	6,28	11,30	7,16	10,83
c	49,74	56,53	52,65	57,48	58,92	59,56	49,38	56,02
b	0,01	0	0,07	0	0,09	0	0,41	0
a	8,01	9,38	7,87	8,53	7,88	9,27	7,45	9,29
a + b	8,02	9,38	7,94	8,53	7,97	9,27	7,87	9,29
Σ =	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Área/H	1,060	1,167	1,075	1,247	0,997	1,105	1,075	1,197
Vinil	8,915	3,480	8,085	2,727	5,232	1,760	9,215	3,008
Σ _T = H	94,33	85,662	93,014	80,160	100,261	90,507	93,023	83,507
PM	836,7	743,234	822,519	700,024	856,440	767,038	829,345	725,260

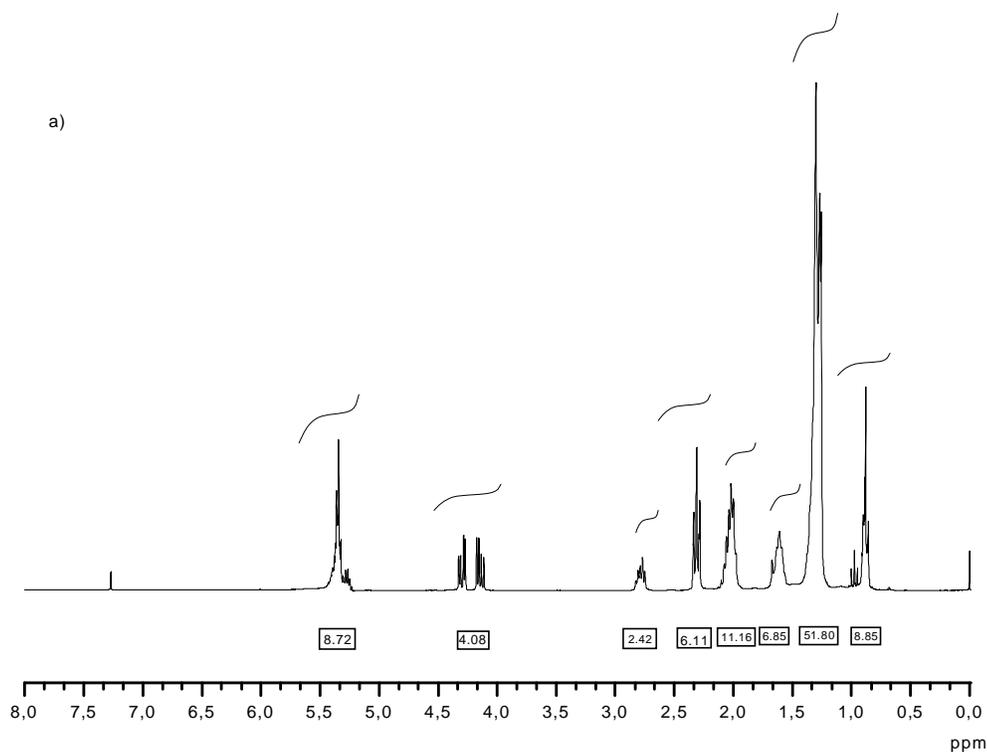
Tabela 22 - RMN de H¹ de óleos vegetais na primeira fase de aquecimento [180-200 °C, 0-28 h].

	OLIVA		SOJA		CANOLA		MILHO	
	0	28	0	28	0	28	0	28
k + j	6,19	4,05	9,55	6,99	9,01	5,29	8,82	5,58
i + h	4,03	4,49	3,92	4,92	4,26	4,23	4,19	4,20
δ 3,72		*				*0,09		
G	0,36	0,13	3,99	2,14	2,51	0,67	2,91	1,38
F	5,93	6,36	6,04	7,16	6,13	6,87	6,16	6,73
E	10,19	6,28	10,18	7,49	11,02	8,57	10,03	7,72
D	5,91	9,58	7,31	6,30	6,23	9,38	6,17	9,33
C	59,25	60,57	50,20	56,00	52,78	55,70	53,46	56,19
B	0	0	0,73	0,20	0,85	0,45	0	0
A	8,14	8,54	8,08	8,80	7,21	8,75	8,26	8,87
a + b	8,14	8,54	8,81	9,00	8,06	9,20	8,26	8,87
Σ =	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Área/H	1,007	1,122	0,980	1,230	1,065	1,057	1,047	1,050
Vinil	5,14	2,61	8,75	4,68	7,46	4,00	7,42	4,31
Σ = H	99,26	89,08	102,04	81,31	93,91	94,55	95,46	95,23
PM	848,84	762,06	889,97	749,81	825,06	808,92	835,79	815,54

* = δ 3,72ppm [1,2-diacilglicerol] = evidência da hidrólise sob H⁺ e calor.

Na Figura 42, são apresentados os espectros de RMN H¹ integrado do óleo de canola sem aquecimento e com 80 horas de aquecimento. Os espectros de RMN H¹ integrado, mostram redução da intensidade do pico em 0,98 ppm (metilas do ácido linolênico), à medida que o óleo vai sendo termo-oxidado, o conteúdo de ácido linolênico vai decrescendo. Este é um dado qualitativo importante, pois fornece uma possibilidade de verificação rápida do estado oxidativo do óleo vegetal. Muito importante para a análise qualitativa, são os sinais situados em δ 2,8 e 2,0 ppm (g; e) relativos aos H alílicos internos e externos à ligação C=C, respectivamente. Os óleos vegetais contendo altos teores de ácidos graxos poliinsaturados, o espectro de RMN H¹ fornece informações importantes para a determinação do conteúdo destes ácidos graxos. Nos hidrogênios alílicos internos as ligações duplas, por efeito de anisotropia magnética, mostram deslocamento químico para campo mais baixo no espectro, próximo de δ 2,8 ppm. Do mesmo modo, os hidrogênios alílicos externos, menos desblindados pelos efeitos anisotrópicos das ligações C=C, mostram

deslocamento químico para campo mais alto, próximo a δ 2,0 ppm. Este dado é muito significativo, porque revela rapidamente, se houve ou não uma diminuição do conteúdo de poliinsaturações no óleo, pela análise da variação da intensidade destes picos no espectro. O que pode ser traduzido pela avaliação do conteúdo de ácido linoléico (ω -6) e linolênico (ω -3). Estas observações podem ser notadas em espectros integrados de RMN de H^1 (Figura 43). A ausência ou redução do sinal em δ 0,98 ppm (ácido linolênico) e uma redução da intensidade dos sinais em δ em 2,8 e 2,0 ppm (g; e), revela um conteúdo ausente ou pobre de ácido ω -3 no óleo vegetal. Isto também poderá ser confirmado pela análise do sinal situado próximo de δ 5,3 ppm (k), hidrogênios dos carbonos das ligações duplas, cuja intensidade diminui pelo efeito da termo-oxidação. Estas alterações estão presentes em todos os espectros de RMN de H^1 dos óleos estressados termicamente.



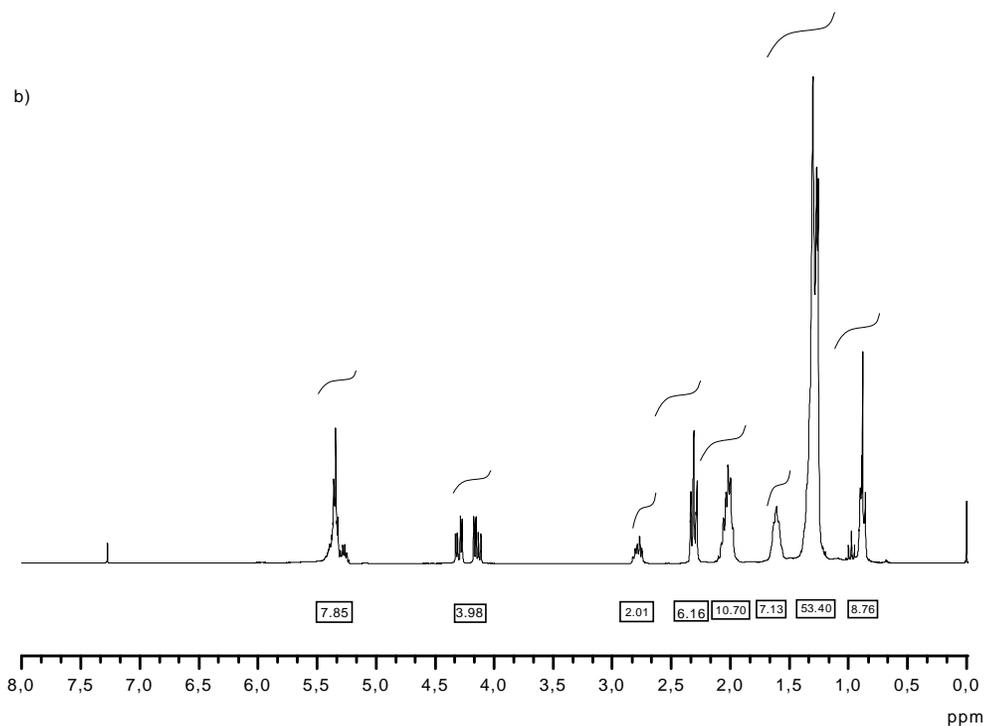


Figura 42: Espectro integrado RMN H^1 do óleo de canola: a) sem aquecimento; b) com 8 horas de aquecimento;

A Figura 43, mostra os espectros de RMN C^{13} com desacoplamento de hidrogênios, do azeite de oliva *in natura* e com 80 horas de aquecimento e no modo DEPT. Todos os espectros de RMN C^{13} dos óleos vegetais estudados mostram perfil de deslocamento químico (δ), semelhantes: os óleos deteriorados termicamente, mostram redução do número de carbonos olefínicos, como sugerem os resultados mostrados na Tabela 23, na análise dos deslocamentos químicos dos óleos de oliva, soja, milho e girassol *in natura* e termo-oxidados totalmente (estado de polímero) e a Tabela 24 para as alterações no deslocamento químico (δ) do óleo de canola, sem aquecimento e com 80 horas de aquecimento. As Tabelas fazem referência à segunda fase de aquecimento: 8 h/dia por 10 dias. É possível ver uma sensível diminuição de sinais de carbonos olefínicos (δ 132-127 ppm) com o aumento

progressivo da termo-oxidação; o mesmo efeito pode ser observado em δ 22-23 ppm. A diminuição dos sinais em $\delta \sim 27$ ppm, a região dos carbonos alílicos externos às ligações duplas da cadeia carbônica, indica uma redução no teor dos ácidos: linolênico e linoléico (ω -3 e ω -6, respectivamente), característico de óleos vegetais deteriorados. O aumento da saturação dos óleos pode ser visto em $\delta \sim 34$ ppm, região dos carbonos alifáticos saturados.

Os sinais em δ 132, 127 e 20 ppm, quando presentes nos óleos vegetais, demonstram a presença exclusivamente de ω -3 (ácido linolênico), pois somente este ácido graxo pode gerar sinais nestes deslocamentos químicos. Portanto, na análise das Tabelas 23 e 24, é possível observar a presença dos deslocamentos δ 127 e 132 ppm nos óleos de soja e canola no tempo zero; a Tabela 24 mostra δ 20 ppm para o óleo de canola, nos tempos: zero e 8 horas. Estes óleos vegetais continham concentração suficiente ω -3 para gerar os sinais.

Tabela 23 – Deslocamentos químicos de RMN C¹³ de óleos vegetais sob diferentes tempos de aquecimento.

OLIVA		SOJA		MILHO		GIRASSOL	
0	80	0	72	0	80	0	56
173,510	173,496	173,435	173,496	173,481	173,510	173,405	173,481
173,481		173,023	173,069	173,451	173,496	172,993	173,054
173,069	173,084	132,046	130,451	173,038	173,084	130,390	130,436
130,237	130,237	130,421	130,237	130,421	130,253	130,176	130,222
129,932	129,932	130,207	129,932	130,207	129,932	130,146	129,917
129,902		130,176	128,299	130,176		129,886	128,284
69,104	69,104	129,886	128,116	129,917		129,860	128,100
	65,273	128,500		129,886		128,253	
62,312	62,327	128,436		128,284		128,085	
34,409	34,410	128,268		128,100		69,074	69,089
34,256	34,256	128,100		125,890		62,261	62,296
32,134	32,836	127,970		69,089	69,104	34,363	34,393
	32,134	69,089	69,104	62,296	62,327	34,195	34,225
29,997	29,997		65,660	34,393	34,400	32,104	32,134
29,936	29,921		65,283	34,225	34,256	31,722	32,104
29,890	29,910	62,296	62,327	32,119	32,134		31,722
29,844	29,753	34,393	34,409	31,737	31,753	29,951	29,967
29,753	29,710	34,300	34,350	29,982	29,982	29,890	29,906
29,707	29,585	34,225	34,256	29,921	29,921	29,799	29,860
29,554	29,539	32,119	32,149	29,875	29,900	29,722	29,829
29,500	29,510	31,737	31,753	29,829	29,850	29,677	29,722
29,402	29,402	29,982	29,982	29,738	29,753	29,539	29,690
29,341	29,341	29,906	29,921	29,692	29,700	29,509	29,554
29,310		29,875	29,900	29,539	29,600	29,463	29,524
29,280		29,829	29,884	29,500	29,539	29,371	29,478
27,448	27,448	29,738	29,753	29,387	29,500	29,310	29,387
27,402	27,402	29,692	29,707	29,326	29,402	29,264	29,326
25,100		29,554	29,539	29,295	29,341	29,234	29,310
25,067	25,067	29,478	29,493	29,264	29,320		29,280
22,899	22,915	29,387	29,402		29,280		27,420
14,336	14,336	29,326	29,341		27,448	27,387	27,402
		29,295	29,330	27,402	27,400	25,815	25,830
		29,248	29,300	25,830		25,052	25,067
		27,402	27,417	25,082	25,082	25,021	25,036
		25,834	25,845	25,052		22,869	22,884
		25,082	25,082	22,899	22,915	22,762	22,777
		25,036	25,000	22,777	22,792	14,290	14,321
		22,899	22,915	14,321	14,336	14,260	14,275
		22,777	22,792	14,275			
		14,321	14,356				
		14,275	14,265				

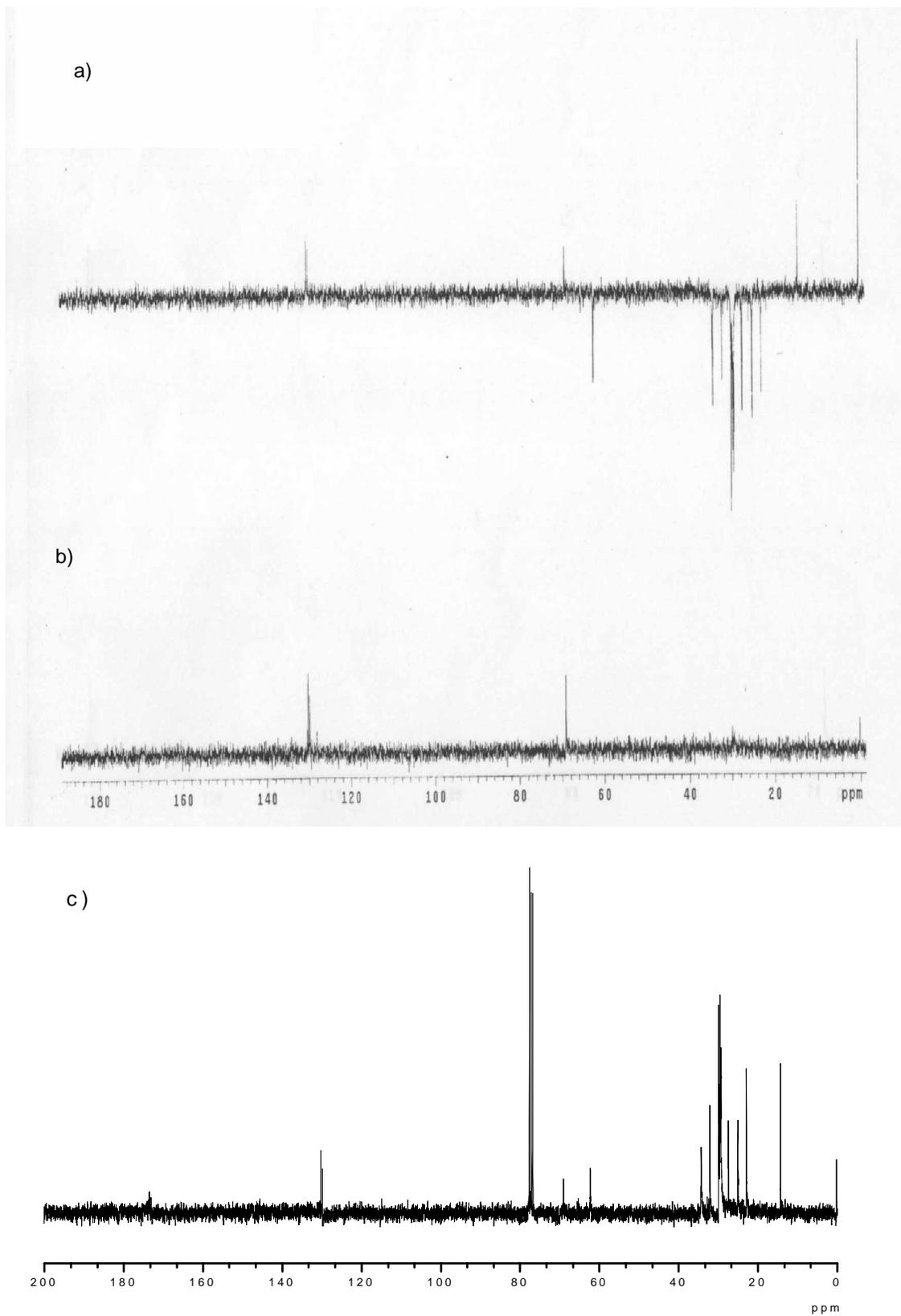


Figura 43 – Espectro de RMN de C^{13} do azeite de oliva desacoplado: a) *in natura* no modo DEPT; b) *in natura*; c) com 80 horas de aquecimento;

5 CONCLUSÕES

- a) Óleos vegetais sob estresse térmico, deterioram rapidamente conforme demonstraram as técnicas analíticas e espectroscópicas;
- b) Os resultados - dos cálculos do índice de iodo por RMN de H^1 - mostram boa correlação com o método clássico. A elevada sensibilidade e seletividade, credenciam a técnica como poderosa ferramenta a serviço da análise de qualidade de óleos vegetais;
- c) A RMN H^1 permite determinar o índice de iodo em qualquer etapa de aquecimento;
- d) A RMN C^{13} e de H^1 são técnicas muito úteis para análise qualitativa e quantitativa de óleos vegetais;
- e) A RMN de H^1 permite a determinação do peso molecular médio do triacilglicerol, de modo mais preciso que sobre o índice de saponificação;
- f) A RMN de H^1 permite avaliar o grau de oxidação do óleo vegetal pela análise da relação: H vinílicos / H alifáticos;
- g) A análise térmica é uma ferramenta muito importante para se determinar a estabilidade térmica de antioxidantes, indicando que os compostos: propil galato e a acetato isobutirato de sacarose (SAIB), são os antioxidantes que melhor resistem ao estresse térmico, podendo ser adicionados aos óleos vegetais, que serão empregados em frituras;
- h) A espectroscopia de infravermelho é importante ferramenta no controle de qualidade dos óleos vegetais sob estresse térmico, os quais mostram aumento progressivo da intensidade da banda de (OH) em $3500-3000\text{ cm}^{-1}$ devido o aumento da acidez de óleos deteriorados termicamente;

- i) A espectroscopia por difração de raios – x é de grande utilidade na resolução estrutural de substâncias sólidas e ou amorfas; tendo indicado que o polímero do óleo de girassol, apresenta-se 85,4% amorfo e 14,6% cristalino;
- j) A espectroscopia por UV-vis é uma ferramenta muito útil no controle de qualidade de óleos e mostram deslocamento batocrômico no óleo deteriorado, com aumento da intensidade de absorção na região de λ 230 nm para os óleos vegetais ricos em ácidos graxos insaturados e termo-estressados;
- k) Os métodos espectroscópicos, mais sensíveis, rápidos e precisos, mostram superioridade sobre as técnicas analíticas e devem ser inseridos na rotina analítica dos óleos vegetais;
- l) As análises realizadas indicam que sob estresse térmico os óleos vegetais que sofreram menor deterioração na primeira fase de aquecimento são: soja, milho, canola e oliva; e sob aquecimento de 8 horas/dia, por 10 dias, os óleos mais estáveis foram: canola, milho, oliva, soja e girassol.

REFERÊNCIA

ADHVARYU, A.; ERHAN, S.Z. Epoxidized soybean oil as a potential source of high-temperature lubricants, **Industrial Crops and Products**, Pennsylvania, v.15, p.247-254, dez. 2001.

ADHVARYU, A.; ERHAN, S.Z; LIU, Z.S., et al. Oxidation kinetic studies of oils derivade from unmodified and genetically modified vegetables using pressurizaed differential scanning calorimetry and nuclear magnetic resonance spectroscopy, **Thermochimica Acta**, Pennsylvania, v.364, p.87-97, abril/jun. 2000.

ADHVARYU, A.; ERHAN, S.Z; PAREZ, J.M. Wax appearence temperatures of vegetable oils determined by scanning calorimetry: effect of triacylglycerol structure and its modification, **Thermochimica Acta**, Pennsylvania, v.395, p.191-200, mar. 2001.

ADHVARYU, A.; ERHAN, S.Z; SAHOO, S.K., et al. Thermo-oxidative stability studies on some new generation API group II and III base oils, *Fuel*, Pennsylvania State University, v.81, p.785 - 791, fev./dez.2001.

ADHVARYU, A.; PEREZ, J.M.; SINGH, I.D., et al. Spectroscopic Studies of Oxidative Degradation of Base Oils, **Energy & Fuels**, Pennsylvania, v.12, p.1369 -1374, jun./ago. 1998.

AJEWOLE, K.; ADEYEYE, A. Characterization of Nigerian citrus seed oils, **Food Chemistry**, v.47, p.77 -78, set. 1993.

ANGUELOVA, A.; WARTHESEN, J. Degradation of Lycopene, α - Carotene, and β - Carotene During Lipid Peroxidation, **Journal of Food Science**, v.65, n.1, 2000.

ANTONIOSI FILHO, N.R., MENDES, O.L., LANÇAS, F.M. Computer prediction of triacylglycerol composition of vegetable oils by HRGC. **Chromatographia**, v.40, p.557-562, 1995.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Resolução n. 482, de 23 de Setembro de 1999. Disponível em: < <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=135> > Acesso em: Setembro de 2004.

A.O.C.S. – AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY – **Official methods and recommended practices**, 4. ed., Champaign, 1990.

ASSIS, M.A.A. **Consulta de Nutrição: controle e prevenção do colesterol elevado**. 2. ed. Florianópolis: UFSC, 2001. 168p.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos: teoria e prática**. 2.ed. Viçosa: UFV, 1999. 416p.

ARMSTRONG, B.K.; MANN, J.I.; ADELSTEIN, A.M., et al. Commodity Consumption and Ischemic Heart Disease Mortality with Special Reference to Dietary Practices, **J. Chron Dis**, v.28, p. 455 – 469, dez. 1975.

ASCHERIO, A.; RIMM, E.B.; GIOVANNUCCI, E.L., et al. A Prospective Study of Nutritional Factors and Hypertension Among US Men, **Circulation**, v.86, n.5., jul. 1992.

AZEREDO, R.B.V.; COLNAGO, L.A.; SOUZA, A.A., et al. Continuous wave free precession Practical analytical tool for low – resolution nuclear magnetic resonance measurements, **Analytica Chimica Acta**, v. 478, p. 313 – 320, nov. 2003.

BAETEN, V.; DARDENNE, P.; APARICIO, R. Interpretation of Fourier Transform Raman Spectra of the Unsaponifiable Matter in a Selection of Edible Oil, **J. Agric. Food Chem**, v.49, n.11, p.5098 – 5107, 2001.

BARRERA–ARELLANO, D.; BLOCK, J.M. Acidos grasos trans en aceites hidrogenados: implicaciones técnicas y nutricionales, **Grasas y Aceites**, jan. 1993.

BATISTA, E.; MONNERAT, S.; KATO, K.; et al. Liquid–Liquid Equilibrium for Systems of Canola Oil, Oleic Acid, and Short – Chain Alcohols, **J. Chem. Eng. Data**, v.44, n.6, p.1360 – 1364, 1999).

BELL, S.A.; KUNTZE, I.; CAPUTO, A.; et al. Strain – dependent in vitro and in vivo effects of oleic acid anilides on splenocytes and T cells in a murine model of the toxic oil syndrome, **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 19 – 24, jul. 2001.

BERGER, K.G.; AKEHURST, E.E.; 1966. Some applications of differential thermal analysis to oils and fats, **F. Fd Technol.**, London, v. 1, p. 237-247, 1966.

BORS, W.; HELLER, W.; MICHEL, C., et al. Flavonoids as Antioxidants: Determination of Radical – Scavenging Efficiencies, **Methods in Enzymology**, v.186, 1990.

BRENES, M.; GARCÍA, A.; DOBARGANES, M. C., et al. Influence of Thermal Treatments Simulating Cooking Processes on the Polyphenol Content in Virgin Olive Oil, **J. Agric Food Chem**, v.50, n21, p.5062 – 5967, 2002.

CELLA, R.C.F.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. Comportamento do Óleo de Soja Refinado utilizado em Fritura por Imersão com Alimentos de Origem Vegetal, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.22, n.2, p. 111 – 116, maio/ago. 2002.

CHANG, Y.H.; ABDALA, D.S.P.; SEVANI, A. Characterization of Cholesterol Oxidation Products Formed by Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein, **Free Radical Biology & Medicine**, v.23, n.2, p.202 – 214, nov.1996.

CHEN, D.; LIU, Y.; HARTMAN, D.R. Examination of fat oxidation products by FT – NMR and FTIR, **AMERICAN LABORATORY**, may. 1999.

CITROLIMA,2001. Disponível em: < www.citrolima.com.br/limacravo.htm> Acesso em: Janeiro de 2004.

CONSULTEME, 2003. Disponível em: < www.consulteme.com.br/1/biologia/limaol.htm > Acesso em: Janeiro de 2004.

CORSINI, M. S.; GALLEGO, A.C.L.; JORGE, N. Avaliação do Óleo de Soja utilizado em Frituras Descontínuas. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, VIII, 2003, Curitiba. Anais... Curitiba: PUC, 2003. p.214-218.

D'AGOSTINI, Denise. **Obtenção de lípidos estruturados por interesterificação de triacilgliceróis de cadeia média e longa**. 2001, 185f. Tese (Doutorado em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

COSTA NETO, Pedro Ramos. **Estudos Preliminares sobre Alterações e Purificação do óleo de Soja usado em Frituras Múltiplas**. 1993, 114f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

DEIANA, M.; ROSA, A.; CAO, C.F., et al. Novel Approach to Study Oxidative Stability of Extra Virgin Olive Oils: Importance of α - Tocopherol Concentration, **J. Agric. Food Chem.**, v.50, n15, p.4342 – 4346, 2002.

DOBARGANES, M.C.; PÉREZ-CAMINO, M.C. Systematic Evaluation of Heated Fats Based on Quantitative Analytical Methods, **JAOCs**, v.65, n.1, 1988.

DOBARGANES, M. C.; PÉREZ-CAMINO, M. C.; MÁRQUEZ-RIZ, G. Determinación de compuestos polares en aceites y grasas de fritura, **Grasas y Aceites**, v.1, p.35 – 38, 1989.

DOLL, R. An overview of epidemiological evidence linking diet and cancer, **Proceedings of the Nutrition Society**, v.49, p. 119 – 131, 1989.

DUFAURE, C.; THAMRIN, U.; MOULOUNGUI, Z. Comparison of the thermal behaviour of some fatty esters and related ethers by TGA - DTA analysis, **Thermochimica Acta**, Toulouse, v.338, p.77-83, feb. /jun.1999.

DYSZEL, S.M. A Rapid screening technique for vegetable oil identity by sub-ambient DSC, **Thermochimica Acta**, Washington, v.57, p. 209-221, fev.1982.

E2121.COM. Disponível em: <
www.e2121.com/food_db/viewherb.php3?viewid=160&160&setlang=1 > Acesso em:
Janeiro de 2004.

ESPÍN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J. Characterization of the Total Free Radical Scavenger Capacity of Vegetable Oils and Oli Frations Using 2,2,-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical, **J.Agric. Food Chem**, CEBAS-CSIC, v. 48, p. 648-656, 2000.

FARIA, A. A.; LELES, M. I. G.; IONASHIRO, M., et al. Estudo da Estabilidade Térmica de Óleos e Gorduras Vegetais por TG/DTG e DTA, **Ecl. Quím**, São Paulo, v. 27, p. 111-119, 2002.

FARKAS, J.; MOHÁCSI-FARKAS, C. Application of Defferential Sacanning Calorimetry in Food Research and Food Quality Assurance, **Journal of Thermal Analysis**, Budapest, v. 47, p. 1787-1803, dez.1995.

FENNEMA, O.R. **Química de los alimentos**. 2^a.ed. Zaragoza: Acríbia, 2000. 1258p.

FERNANDES, J.B.; DAVID, V.; FACCHINI, P.H., et al. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira, *Atta sexdens* e seu fungo simbiote, **Química Nova**, v.25, n.6B, p.1091 – 1095, jul. 2002.

FERRARI, R.A.; OLIVEIRA, V.S.; SCABIO, A. Óleo neutro de soja usado em fritura como matéria – prima para produção de biodiesel. In: ENCONTRO REGIONAL SUL

DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, VIII, 2003, Curitiba. Anais... Curitiba: PUC, 2003. p. 434-438.

FIRESTONE, D. **Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes**. Washington: 1999, 152p.

_____. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 4.ed. Champaign: AOCS, 1990. v.1/2.

FIRESTONE, D.; STIER, R.F.; BLUMENTHAL, M.M. Regulation of Frying Fats and Oils, **Food Technology**, fev. 1991.

FOOD TECHNOLOGY. Current research in natural food antioxidants. **INFORM**, v.5, n.6, jun.1994

FREIRE, F.; FIGUEIREDO, A.; FERRÃO, P. Thermal Analysis and Drying Kinetics of Olive Bagasse, Coimbra, 1996.

FRITSCH, C.W. Measurements of Frying Fat Deterioration: A Brief Review, **JAACS**, mar. 1981.

GEY, K.F. Lipids, Lipoproteins and Antioxidants in Cardiovascular Dysfunction, **Cardiovascular Dysfunction**, v.18, 1990.

GIANNUZO, A. N.; NAZARENO, M. A.; MISHIMA, H. T., et al. Extracción de Naringina de *Citrus paradisi L.* Estudio Comparativo y Optimización de Técnicas Extractivas, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.20, n.2, maio/ago. 2003.

GIESE, J. Fats, Oils, and Fat Replacers. **Food Technology - Especial Repot**, 1996.

GINSBERG, H.N.; BARR, S.L.; GILBERT, A., et al. Reduction of Plasma Cholesterol Levels in normal Men on an American Heart Association step 1 diet or a step 1 diet with added Monounsaturated Fat, **The New England Journal of Medicine**, v.322, n.9, mar. 1990.

GLAZER, A.N. Phycoerythrin Fluorescence – Based Assay for Reactive Oxygen Species, **Methods in Enzymology**, V.186, 1990.

GOMES, T.; CAPONIO, F.; DELCURATOLO, D.; Fate of Oxidized Triglycerides during Refining of Seed Oils, **J. Agric. Food Chem.**, v.51, n.16, p.4647 – 4651, 2003.

GONÇALVES, C.; BATISTA, E.; MEIRELLES, A.J.A. Liquid–Liquid Equilibrium Data for the System Corn Oil + Oleic Acid + Ethanol + Water at 298.15 K, **J. Chem. Eng. Data**, v.47, n.3, p.416 – 420, 2002.

GORINSTEIN, S.; LEONTOWICZ, H.; LOJEK, A., et al. Olive Oils improve Lipid Metabolism and increase Antioxidant Potential in Rats Fed Diets Containing Cholesterol, **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n.21, p. 6102 – 6108. 2002.

GRINGS, M.B.; FRANCESCHI, E.; CARDOZO-FILHO, L., et al. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, VIII, 2003, Curitiba. Anais... Curitiba: PUC, 2003. p. 513-515.

GRUNDY, S.M. Comparison of Monounsaturated Fatty Acids and Carbohydrates for Lowering Plasma Cholesterol, **The New England Journal of Medicine**, v.314, n.12, p. 745 – 748, 1986.

GUILLÉN, M.D.; RUIZ, A. High resolution ^1H nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats, **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, p. 328 – 338. 2001.

HELLÍN, L.C.; CLAUSELL, M. P.R. Incidencia de la Fritura en la Composición de la Fracción Lipídica de diversos aperitivos de consumo generalizado en nuestro País, **Anal. Bromatol.**, v.36, n.1, p.5 – 31, 1984.

HANASAKI, Y.; OGAWA, S.; FUKUI, S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of Flavonoids, **Free Radical Biology & Medicine**, n.16, n.6, p.845 – 850, 1994.

HANNEWIJK, F.; HAIGHTON, A.J. Differential Thermal Analysis, Unlever Research Laboratory, Vlaardingen, v.35, set.1958.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 475-476, 1973.

HEGSTED, D.M. Serum–cholesterol response to dietary cholesterol: a re–evaluation, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.44, p. 299 – 305, ago. 1986.

HERTOG, M.G.L.; FESKENS, E.J.M.; HOLLMAN, P.C.H., et al. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary Herat disease: the Zutphen Elderly Study, **Lancet**, v.342, p. 1007 –1011, out. 1993.

HIDALGO, F. J.; ZAMORA, R. Edible oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: recent advances and future perspectives, **Trends in Food Science & Technology**, v. 14, p. 499 – 506. 2003.

HIDALGO, F.J.; ALAIZ, M.; ZAMORA, R. Determination of Peptides and Proteins in Fats and Oils, **Anal. Chem.**, v.73, n.3, p.698–702, feb. 2001.

HILL, S.E.; PERKINS, E.G. Determination of Oxidation Stability of Soybean Oil with the Oxidative Stability Instrument: Operation Parameter Effects, **JAACS**, v.72, n.6, 1995.

JIAN-QING, C.; ZHENG-JU, Z.; FAN, P. The study on the constituents of leaf essential oils in *Citrus limon* OSBECK, **Acta Botanica Sinica**, v.30, n.2, p. 226 – 228, 1988.

JOSEPH-NATHAN, P. **Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogenio-1 y de Carbono-13**. Intituto Politécnico Nacional: México, 1982.

KAISERSBERGER, E.; GMBH, N-G. DSC Investigations of the Thermal Characterization of Edible Fats and Oils, **Thermochemica Acta**, Amsterdam, v.151, p. 83-90, 1989.

KANNEL, W.B.; CASTELLI, W.P.; GORDON, T. Cholesterol in the Prediction of Atherosclerotic Disease, *Annals of Internal Medicine*, v. 90, p. 85 –91, 1979.

KATAN, M. B.; GASTEL, A. C.; DE ROVER, C. M., et al. Differences in individual responsiveness of serum cholesterol to fat – modified diets in man, **European Journal of Clinical Investigation**, v.18, p. 644 – 647, jul. 1988.

KATZER, G. LIME (*Citrus aurantifolia* [Chism. Et Panz.] Swingle), 2002. Disponível em: < www-ang.kfunigraz.ac.at/~katzer/eng/Citr_aur.html >Acesso em: Janeiro de 2004.

KESZLER, A.; KRISKA, T.; NÉMETH, A. Mechanism of Volatile Compound Production during Storage of Sunflower Oil, **J. Agric. Food Chem.**, v. 48,n.12, 2000.

KEYS, A.; ANDERSON, J.T.; GRANDE, F. Serum Cholesterol to Changes in the Diet, **Metabolism**, v.14, n. 7, jul. 1965.

KIM, S.M.; CHEN, P.; MCCARTHY, M.J., et al. Fruit Internal Quality Evaluation using ON – line Nuclear Magnetic Resonance Sensors, **J. Agric. Engng Res.**, v. 74, p. 293 – 301, jul. 1999.

KOBORI, C.N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos Extraídos das Sementes de tomate e goiaba como Aproveitamento de Resíduos Industriais. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, VIII, 2003, Curitiba: Anais... Curitiba:PUC, 2003. p.310-314.

_____. Caracterização dos óleos Extraídos das Sementes de laranja e maracujá como Aproveitamento de Resíduos Industriais. In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, VIII, Curitiba. Anais... Curitiba: PUC, 2003. p.315-319.

KOWALSKI, B. Evaluation of the Stability of Some Antioxidants for Fat-Based Foods, **Thermochemica Acta**, Warsaw, v.177, p. 9-14, may. 1990.

_____. Thermal-Oxidative decomposition of Edible oils and fats. DSC studies, **Thermochemica Acta**, Warsaw, v.184, p.49-57, oct.1990.

KUBOW, S. Toxicity of dietary lipid peroxidation products, **Trends in Food Science & Tecnology**, set. 1990.

LAMBELET, P.; GRANDGIRARD, A.; GREGOIRE, S., et al. Formation of Modified Fatty Acids and Oxyphytosterols during Refining of Low Erucid Acid Rapeseed Oil, **J. Agric. Food Chem.**, v.52, n.15, p. 4284 – 4290, jun. 2003.

LAROSA, J.C. Cholesterol Lowering as a Treatment for Established Coronary Heart Disease, **CIRCULATION**, v. 85, p.1229 – 1235, mar. 1992.

LEHNINGER, A.; NIELSON, D.L.; COX, M.M. **Bioquímica**, 3.ed. New York: Worth Publisher, 1995. 1152p.

LI, F.; LAROCK, R.C. Synthesis, Structure and Properties of New Tung Oil – Styrene –Divinylbenzene Copolymers Prepared by Thermal Polimerization, **Biomacromolecules**, v.4, p.1018 – 1025, mar. 2003.

LIMA, J.R.; GONÇALVES, A.G. Avaliação analítica de óleos utilizados em processos de fritura, **Bol. SBCTA**, n.29, v.2, p.186-192, jul/dez. 1995.

LITWINIENKO, G.; KASPRZYSYCKA-GUTTMAN, T. Oxidation of Saturated Fatty Acids Esters, **Journal of Thermal Analysis**, Warsaw, v. 54, p.211-217, 1998.

_____. The Influence of Some Chain-Breaking Antioxidants on Thermal-Oxidative Decomposition of Linolenic Acid, **Journal of Thermal Analysis**, Warsaw, v. 54, p. 203-210, 1998.

LITWINIENKO, G.; KASPRZYSYCKA-GUTTMAN, T.; JAMANEK, D. DSC study of antioxidant properties of dihydroxyphenols, **Thermochemica Acta**, Warsaw, v.331, p. 79-86, março 1999.

LOURY, M. Possible Mechanisms of Autoxidative Rancidity, **Lipids**, v.7, n.10, 1970.

MALTZMAN, T.H.; HURT, L.M.; ELSON, C.E., et al. The prevention of nitrosomethylurea-induced mammary tumors by *d* – limonene and orange oil, **Carcinogenesis**, v.10, n.4, p. 781 – 783, 1989.

MANNINA, L.; LUCHINAT, C.; EMANUELE, M.C., et al. Acyl positional distribution of glycerol tri – esters in vegetable oils: a ¹³C NMR study, **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 103, p. 47 – 55. jul. 1999.

MANNINA, L.; SOBOLEV, A. P.; SEGRE, A. Olive oil as seen by NMR and chemometrics, **Spectroscopy Europe**, mar. 2003.

MÁRQUEZ – RUIZ, G.; PÉREZ – CAMINO, M.C.; DOBARGANES, M.C. Evaluación nutricional de grasas termoxidadas y de fritura, **Grasas y Aceites**, v.41, n.6, p. 432 – 439. 1990.

MELO, E. A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de Compostos Fenólicos Naturalmente presentes em Alimentos, **Bol. SBCTA**, v.36, n.1, p. 1–11, jan / jun. 2002.

MELTZER, J.B.; FRANKEL, E.N.; BESSLER, T.R., et al. Analysis of Thermally Abused Soybean Oils for Cyclic Monomers, **JAOCs**, v.58, n.7, p. 779–784, jul. 1981.

MERCK. **Diagnóstico e Tratamento**. São Paulo: Roca, 1999.

MINN, J. Determination of Oxidative Stability of Rosin Products by High-Pressure Differential Scanning Calorimetry, **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v.91, p.87-94, março 1985.

MONGHARBEL, A. D. I. **Alterações no Óleo de Soja e na Gordura Vegetal Hidrogenada em Processo de Fritura**. 2002, 75f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais**. São Paulo: Varela, 1998. 150p.

MORETTO, E.; FETT, R.; GONZAGA, L.V. et al. **Introdução à Ciência de Alimentos**. Florianópolis: UFSC, 2002. 255Pp.

MOURA, A.F.P.; TENUTA – FILHO, A. Efeito do Processamento sobre os níveis de Colesterol E 7-cetocolesterol em camarão-rosa , **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v.22, n.2, p. 117 – 121, maio/ago. 2002.

MALAYSIAN PAL OIL PROMOTION COUNCIL. Disponível em: < www.mpopc.com.br/9_comerciomundial.htm > Acesso em: Julho. 2003.

MUSEUMS. Disponível em: < www.museums.org.za/bio/images/enb4 > Acesso em: Janeiro de 2004.

OCHOCKA, R.J.; WESOLOWSKI, M. LAMPARCZYK, H. Thermoanalysis Supported by Principal Component Analysis of Essential Oil Samples, **Thermochimica Acta**, Gdansk, v. 173, p.199-210, april. 1990.

OLIVEIRA, T. T. DE; NAGEM, T.J.; DA SILVA, M.C., et al. Ação Antioxidante de Flavonóides Modificados, **Pesq. Agropec. Bras**, Brasília, v.34, n.5, p.879-883, maio 1999.

OWEN, R.W.; GIACOSA, A.; HULL, W.E., et al. The antioxidant / anticancer potencial of phenolic compounds isolated from olive oil, **European Journal of Cancer**, v.36, p. 1235 – 1247, abr. 2000.

OWEN, R.W.; HAUBNER, R.; MIER, W., et al. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes, **Food and Chemical Toxicology**, v.41, p.703 – 717, 2003.

PATRIKIOS, I.S.; PATSALIS, P.C. Monounsaturated fatty acid oligomerization is responsible for the agglutination activity of heated virgin olive oil, **Food Research International**, v.36, p. 985 – 990, jun. 2003.

PATTERSON, G.H.; RIGA, A.T. Factors affecting oxidation properties on differential scanning calorimetric studies, **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 226, p. 201-210, mar/may. 1993.

PARASASSI, T.; BITTOLO-BON, G.; BRUNELLI, R., et al. Loss of apo B-100 secondary Structure and Conformation in Hydroperoxidized, Electronegative LDL, **Free Radical Biology & Medicine**, v.31, n.1, p.82 – 89, mar. 2001.

PEREIRA, T.A.; DAS, N.P. The Effects of Flavonoids on the Thermal Autoxidation of Palm Oil and Other Vegetable Oils Determined by Differential Scanning Calorimetry, **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 165, p. 129-137, jan. 1990.

PÉREZ-CAMINO, M.C.; MÁRQUEZ RUIZ, G.; SALGADO RAPOSO, A., et al. Alteración de grasas usadas en fritura. Correlación entre índices analíticos y métodos de evaluación directa de compuestos de degradación, **Grasas y Aceites**, v.39, n.2, 1988.

POLIQUN, D.; GROSS, D.; LEHMANN, V., et al. Study of water and oil bodies in seeds by nuclear magnetic resonance, **C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie**, v.320, p. 131 – 138. nov. 1997.

RAEMY, A.; FROELINCHER, I.; LOELIGER, J. Oxidation of Lipids Studied by Isothermal Flux Calorimetry, **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 114, p. 159-164, 1987.

RAEMY, A.; LAMBELET, P. Thermal behavior of Foods, **Thermochimica Acta**, Amsterdam, v. 193, p. 417-439, dez. 1990.

RANALLI, A.; ANGEROSA, F. Integral Centrifuges for Olive Oil Extraction. The Qualitative Characteristics of Products, **JAACS**, v.73, n.4, 1996.

RANALLI, A.; FERRANTE, M.L.; DE MATTIA, G., et al. Analytical Evaluation of Virgin Olive Oil of First and Second Extraction, **J. Agric. Food Chem**, v.47, n.2, p.417 – 424, jan. 1999.

RIEMERSMA, R.A.; WOOD, D.A.; MACINTYRE, C.C.A., et al. Increased Risk of Angina in Scottish Men, **Annals New York Academy of Sciences**, 1988.

RODRÍGUEZ, O.; DE GODOY, V.M.; COLMENARES, N.G., et al. Composition lemon essential oil *Citrus limon* (L.) Burm. F., **Rev. Fac. Agron.**, v.15, p.343 – 349, maio. 1998.

ROJO, J.A.; PERKINS, E. Cyclic Fatty Acid Monomer Formation in Frying Fats. Determination and Structural Study, **JAOCs**, v.64, n3, p.414 – 421, mar. 1987.

SÁNCHEZ – MORENO, C.; LARRAURI, J.A.; SUARA – CALIXTO, F. A. Procedure do Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols, **J. Sci. Food Agric.**, v76, p.270 – 276, 1998.

SCHIEBER, A.; STINTZING, F.C.; CARLE, R. By – products of plant food processing as a source of functional compounds – recent developments, **Trends Food Science & Technology**, v.12, p. 401 – 413, 2001.

SGUISSARDI, J.C.Z.; PAROUL, N.; CICHOSKI, A. Análise de Voláteis e Extratos Residuais da Hidrodestilação da Casca de Laranja (*Citrus sinensis*). In: ENCONTRO REGIONAL SUL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, VIII, 2003, Curitiba. Anais... Curitiba: PUC, 2003. p.455-459.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDRAN, P.D. Phenolic Antioxidants, **Food Science and Nutrition**, v.32, n.1, p.67 – 103, 1992.

SHEN, L.; ALEXANDER, K.S. A thermal analysis study of long chain fatty acids, **Thermochimica Acta**, Toledo, v. 340, p. 271-278, ago. 1999.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 6 ed. Wiley: New York, 1998.

SOLOMONS, G.T.W. **Química Orgânica**. 6 ed. Rio de Janeiro, 1996.

SOUZA JÚNIOR, A.J. Considerações sobre o Aproveitamento das Sementes de Citros, **Boletim do Instituto de Tecnologia de alimentos**, v.39, p.3 – 24, set. 1974.

STAHL, E.; SHÜTZ, E.; MANGOLD, H.K. Extraction of Seed Oils with Liquid and Supercritical Carbon Dioxide, **J. Agri. Food Chem**, v.28, p.1153 – 1157, 1980.

STEINBERG, D. Antioxidants and Atherosclerosis, **Circulation**, v.84, n.3, set. 1991.

STEVENSON, S.G.; VAISEY – GENSER, M.; ESKIN, N.A.M. Quality Control in the Use of Deep Frying Oils, **JAACS**, v.61, n.6, jun.1984.

TAI, C.Y.; CHEN, Y.C.; CHEN, B.H. Analysis, Formation and Inhibition of Cholesterol Oxidation Products in Foods: An Overview (Part I), **Journal of Food and Drug Analysis**, v.7, n4, p. 234-257, nov. 1999.

TIAN, Q.; DING, X. Screening for Imonoid glucosides in *Citrus tangerina* (Tanaka) Tseng by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry, **Journal of Chromatography A**, v.874, p.13 –19, dez. 1999.

UIEARA, M. **Lipídeos**. Departamento de Química, UFSC, 2003. Disponível em: <http://qmc.ufsc.br/qmcweb/artigos/colaboracoes/marina_fat_free.html#> Acesso em: Setembro de 2004.

VARELA, G.; MOREIRAS–VARELA, O.; RUIZ–ROSO, B. Utilización de algunos aceites em frituras repetidas. Câmbios em las grasas y análisis sensorial de los alimentos fritos, **Grasas y Aceites**, v.34, fasc.2, p.101 – 107, 1983.

VIGLI, G.; PHILIPDIS, A.; SPYROS, A., et al. Classification of Edible Oils by Employing ³¹P and ¹H 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**, v.52, n. 19, p. 5715 – 5722. 2003.

VOGEL, I. A. **Análise Química Quantitativa**. 5 ed. Koogan: Rio de Janeiro. 1992.

WALTKING, A.E.; SEERY, W.E.; BLEFFERT, G.W. Chemical Analysis of Polymerization Products in Abused Fats and Oils, **AOCS**, set. 1972.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. Total Antioxidant Capacity of Fruits, **J. Agric. Food Chem.**, v.44, n.3, p.701 – 705, dez. 1996.

WAYNER, D.D.M.; BURTON, G.W.; INGOLD, K.U., et al. Quantitative measurement of the total, peroxy radical – trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation, **Febs Letters**, v.187, n.1, jul. 1985.

WESOLOWSKI, M.; ERECINSKA, J. Thermal analysis in quality assessment of rapeseed oils, **Thermochimica Acta**, v. 323, p. 137-143, jul. /ago. 1998.

WHITEHEAD, T.P.; THORPE, G.H.G.; MAXELL, S.R.J. Enhancement chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids, **Analytica Chimica Acta**, v.266, p.265 – 277, 1992.

ZALIHA, O.; CHONG, C.L.; CHEOW, C.S., et al. Crystallization properties of palma oil by fry fractionation, **Food Chemistry**, v.30, p.30 – 36, set. 2003.

ZAMORA, R.; HIDALGO, F.J. Phosphatidylethanolamine Modification by Oxidative Stress Product 4,5 (E) – Epoxy – 2(E) – heptenal, **Chem Res. Toxicol**, v. 16, n.12, p. 1632 – 1641, jun. 2003.

ZENNER, L.; CALLAIT, M.P.; GRANIER, C.; CHAUVE, C. In vitro effect of essential oils from *Cinnamomum aromaticum*, *Citrus limon* and *Allium sativum* on two intestinal flagellates of poultry, *Tetratrichomonas gallinarum* and *Histomonas meleagridis*, **Parasite**, v.10, n.2, p.153 – 157, jum. 2003.

ANEXO A: Publicações

CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO EXTRAÍDO DAS SEMENTES DE LIMÃO ROSA (*Citrus limonia* Osbeck)

REDA¹, S. Y; LEAL², E.S; BATISTA³, E. A. C; BARANA³, A. C; SCHNITZEL⁴, E;
CARNEIRO⁴, P. I. B.

¹ Mestrando do Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG - PR. ² Centro Federal de Educação Tecnológica - CEFET - Ponta Grossa – PR. ³ Departamento de Engenharia de Alimentos – UEPG. ⁴ Departamento de Química – UEPG - Av.: Gal. Carlos Cavalcanti, 4748 – Campus Uvaranas – Ponta Grossa - PR – 84030-900.

pibc@uepg.br, a quem correspondência deve ser enviada.

RESUMO

A finalidade deste estudo foi caracterizar os óleos extraídos das sementes de limão rosa. Foram determinados os índices de iodo, teores de ácidos graxos livres (AGL) e peróxidos; análises termoanalíticas (TG, DTG, DSC), espectroscópicas (infravermelho e ultravioleta) e cromatográficas (cromatografia gasosa). Os resultados mostraram que o óleo apresenta características semelhantes a óleos comestíveis de boa qualidade.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF RANGPUR LIME (*Citrus limonia* Osbeck) OIL SEEDS

The purpose of this study was to characterize the oil extracted from rangpur lime seeds. Were accomplished iodine values, free fatty acid (FFA), peroxide values, thermal analysis (TG, DTG, DSC); infrared and ultraviolet spectroscopic as well gas chromatographic analysis. The results indicated that the oil shows characteristics analogous to the edible oils with good quality.

INTRODUÇÃO

O limão rosa é um dos mais utilizados porta-enxerto no Brasil, participando – na citricultura paulista – em mais de 80% de dos pomares e mais de 90% nos viveiros. É conhecido como limão cravo e limão-vinagre [2,3]. É considerado um híbrido de *Citrus aurantifolia* e *Citrus reticulata* [3] e hoje é encontrado na maior parte do país como uma planta selvagem, amplamente utilizado na citricultura, como

também na produção de sucos e chás [4]. Basicamente, o óleo das sementes de citros é composto de triacilgliceróis e em menores quantidades, de ácidos graxos livres, hidrocarbonetos, esteróis e matéria não-gordurosa [6]. A finalidade deste estudo foi caracterizar o óleo extraído do limão rosa por técnicas cromatográficas, espectroscópicas e termoanalíticas.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes foram submetidas à extração de Soxhlet por 8 horas em hexano. O solvente foi rotoevaporado e um óleo amarelado foi obtido, cuja estabilidade foi determinada por análise térmica (TG, DTG, DSC). Foram determinados os índices de iodo, teores de peróxidos e de ácidos graxos livres [% AGL]. O espectro de infravermelho foi obtido em espectrofotômetro Shimadzu modelo FTIR 8400, em pastilha de KBr (100 mg) e 5 μ l do óleo. O espectro de ultravioleta (UV-VIS) foi obtido em espectrofotômetro Shimadzu modelo MultiSpec 1501 em solução 2.10^{-4} M (ácido oléico) em isopropanol. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram obtidos segundo o método de HARTMAN & LAGO [5] e as análises cromatográficas realizadas segundo o método oficial da FIRESTONE [1] em Cromatógrafo gasoso CG-Master. Os ácidos graxos foram identificados (como ésteres metílicos) por comparação dos tempos de retenção com padrões.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela apresentamos as análises físico-químicas e o perfil cromatográfico dos ácidos graxos presentes no óleo do limão rosa. A concentração em ácidos graxos insaturados - ácido oléico 21,2%; ácido linoléico 43,0% e ácido linolênico [ù-

3] 7,60% - é semelhante à de óleos vegetais de boa qualidade. Os baixos teores de acidez livre (menor que 1,0%) e peróxidos (1,94 mEq.kg⁻¹) atendem às exigências legais para o óleo refinado de boa qualidade. A análise térmica mostrou que o óleo apresenta estabilidade térmica até 250 °C, temperatura maior que a usualmente utilizada para fritura de alimentos [7]. A análise no UV-VIS mostra absorção máxima em 225 nm, compatível com o alto grau de insaturação do óleo (71,80 %). A análise de infravermelho mostrou absorções das ligações C-H do esqueleto hidrocarbônico em 2924, 2855 e 1458 cm⁻¹; das ligações C-OH das carboxilas livres em ligação de hidrogênio em 3600 a 3200 cm⁻¹ e deformações em 1163 e 1099 cm⁻¹; das ligações H-C de olefinas em 3009 cm⁻¹ e absorção da carboxila de éster em 1746 cm⁻¹.

TABELA - Características físico-químicas e composição de ácidos graxos identificados como ésteres metílicos dos triacilgliceróis do óleo extraído com hexano das sementes de limão rosa.

Umidade das sementes frescas (%)	48,00
Umidade das sementes secas (%)	5,80
% AGL (em ácido oléico)	0,30
Índice de iodo (g I ₂ /100g)	140,90
Teor de peróxidos (mEq/kg)	1,94
Lipídios totais (% peso seco)	32,00
Grau de insaturação (%)	71,80
Símbolo	Acido graxo ^a %
Ci	C 8:0 ^b caprílico 0,90
M	C 14:0 mirístico n.d.
P	C 16:0 palmítico 21,40
S	C 18:0 esteárico 2,60
O	C 18:1 oléico 21,20
Li	C 18:2 linoléico 43,00
Lê	C 18:3 linolêncio 7,60
A	C 20:0 araquídico 0,20
	Desconhecidos* 3,10

^a Os ácidos: C 6:0 caprílico; C 7:0 enântico; C 9:0 pelargônico; C 10:0 cáprico; C 11:0 undecílico; C 12:0 láurico; C 13:0 tridecílico e C 22:0 behênico, estão ausentes nos óleos estudados. ^b Em C_x.y, x = número de carbonos e y = número de duplas ligações. n.d.= não detectado. * = não identificados e com tempos de retenção situados entre os dos ácidos palmítico e esteárico [C 18:0 < t_r > C 16:0].

CONCLUSÕES

As análises físico-químicas, espectroscópicas, termoanalíticas e cromatográficas indicaram que o óleo de sementes de limão rosa apresenta altos teores de ácidos graxos insaturados (71,3%) comparáveis a óleos vegetais de boa qualidade. Os teores significativos de ácidos ω -3 (ácido 4 linolênico, 7,60 %) o tornam benéfico à saúde e adequado ao consumo humano, podendo ser uma fonte alternativa importante de alimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] FIRESTONE, D. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 4th ed. Champaign: AOCS, 1990. v.1/2.

[2] CELLA, R. C. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, p. 111-116, maio/ago. 2002.

[3] FERNANDES, J. B.; *et al.* Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbiote. **Química Nova**, v. 25, n. 6B, p. 1091–1095, mar. 2002.

[4] GIANNUZZO, A. N.; *et all.* Extracion de Naringina de *Citrus paradisi* L. Estudio comparativo y optimización de técnicas extrativas. **Ciência e Tecnolgia de Alimentos**, v. 20, n.2, maio/ago, 2000.

[5] HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 475-476, 1973.

[6] KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos extraídos das sementes de laranja e maracujá como aproveitamento de resíduos industriais. In: Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 8, 2003, Curitiba, set. 2003.

CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DAS SEMENTES DE LIMÃO SICILIANO (*Citrus limon*), UM RESÍDUO AGROINDUSTRIAL

REDA¹, S. Y; LEAL², E.S; BATISTA³, E. A. C; BARANA³, A. C; SCHNITZEL⁴, E;
CARNEIRO⁴, P. I. B.

¹ Mestrando do Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG - PR. ² Centro Federal de Educação Tecnológica - CEFET - Ponta Grossa – PR. ³ Departamento de Engenharia de Alimentos – UEPG. ⁴ Departamento de Química – UEPG - Av.: Gal. Carlos Cavalcanti, 4748 – Campus Uvaranas – Ponta Grossa - PR – 84030-900.

pibc@uepg.br, a quem correspondência deve ser enviada.

RESUMO

A finalidade deste estudo foi caracterizar o óleo extraído das sementes de limão siciliano. Foram determinados os índices de iodo, teores de ácidos graxos livres (AGL) e peróxidos; análises termoanalíticas (TG, DTG, DSC), espectroscópicas (infravermelho e ultravioleta) e cromatográficas (cromatografia gasosa). Os resultados mostraram que o óleo apresenta características semelhantes a óleos comestíveis de boa qualidade.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF THE “SICILIAN” LEMON (*Citrus limon*) OIL SEED, AN AGROINDUSTRIAL WASTE

The purpose of this study was to characterize the oil extracted from Sicilian lemon seeds. Were accomplished Iodine values, free fatty acid (FFA), peroxide values; thermal analysis (TG, DTG, DSC); infrared and ultraviolet spectroscopic as well gas chromatographic analysis. The results indicated that the oil shows characteristics analogous to the edible oils with good quality.

INTRODUÇÃO

Um dos citros mais importantes para indústria, depois da laranja, é o limão siciliano que, originário da China, adaptou-se muito bem ao Brasil [7]. Os citros, geralmente usados na produção de sucos e chás, tornaram-se uma fonte importante de matéria-prima para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios [2, 4, 5]. As sementes secas dos citros sem o tegumento podem produzir cerca de 50 a 55%

de óleo. Também se pode extrair produtos de valor agregado da casca e das folhas de frutas cítricas como óleos essenciais [1, 2, 4, 6, 7]. O óleo das sementes de citros é composto basicamente de triacilgliceróis e em menor quantidade por ácidos 2 graxos livres, hidrocarbonetos, esteróis e matéria não-gordurosa como limonina e naringina [7]. A finalidade deste estudo foi caracterizar o óleo extraído das sementes de limão siciliano por técnicas cromatográficas, espectroscópicas e termoanalíticas.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes secas foram submetidas à extração de Soxhlet por 8 horas em hexano. O solvente foi rotoevaporado e um óleo amarelado foi obtido, cuja estabilidade foi determinada por análise térmica (TG, DTG, DSC). Foram determinados os índices de iodo, teores de peróxidos e de ácidos graxos livres [% AGL] O espectro de infravermelho foi obtido em espectrofotômetro Shimadzu modelo FTIR 8400, em pastilha de KBr (100 mg) e 5 μ l do óleo. O espectro de ultravioleta (UV-VIS) foi obtido em espectrofotômetro Shimadzu modelo MultiSpec 1501 em solução $2 \cdot 10^{-4}$ M (ácido oléico) em isopropanol. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram obtidos segundo o método de HARTMAN & LAGO [5] e as análises cromatográficas realizadas segundo o método oficial da FIRESTONE [3] em Cromatógrafo gasoso CG-Master. Os ácidos graxos foram identificados (como ésteres metílicos) por comparação dos tempos de retenção com padrões.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela apresentamos as análises físico-químicas e o perfil cromatográfico dos ácidos graxos presentes no óleo do limão siciliano. A concentração de ácidos graxos insaturados - ácido oléico 28,60%; ácido linoléico 34,40% e ácido linolênico [ù-3] 10,00% - é semelhante à de óleos vegetais de boa qualidade. Os baixos teores de acidez livre (menor que 1,0 %) e peróxidos (1,90 mEq.kg⁻¹) sugerem tratar-se de óleo de boa qualidade.

TABELA - Características físico-químicas e composição de ácidos graxos identificados como ésteres metílicos dos triacilgliceróis do óleo extraído com hexano das sementes de limão siciliano.

Umidade das sementes frescas (%)	48,30	
Umidade das sementes secas (%)	3,60	
% AGL (em ácido oléico)	0,27	
Índice de iodo (g I ₂ /100g)	105,02	
Teor de peróxidos (mEq/kg)	1,90	
Lipídios totais (% peso seco)	38,30	
Grau de insaturação (%)	73,00	
Símbolo	Ácido graxo ^a	%
Ci	C 8:0 ^b caprílico	1,00
M	C 14:0 mirístico	0,10
P	C 16:0 palmítico	19,60
S	C 18:0 esteárico	3,00
O	C 18:1 oléico	28,60
Li	C 18:2 linoléico	34,40
Lê	C 18:3 linolênico	10,00
A	C 20:0 araquídico	0,20
	Desconhecidos*	3,10

^a Os ácidos: C 6:0 caprílico; C 7:0 enântico; C 9:0 pelargônico; C 10:0 cáprico; C 11:0 undecílico; C 12:0 láurico; C 13:0 tridecílico e C 22:0 behênico, estão ausentes no óleo estudado. ^b Em Cx.y, x = número de carbonos e y = número de duplas ligações. * = não identificados e com tempos de retenção situados entre os dos ácidos palmítico e esteárico [C 18:0 < t_r> C 16:0].

A análise térmica mostrou que o óleo apresenta estabilidade térmica até 250 °C, temperatura maior que a usualmente utilizada para fritura de alimentos. Análise

no UV-VIS mostrou absorção máxima em 225 nm, compatível com o alto grau de insaturação do óleo (73,0 %). Análise de infravermelho mostrou absorções das ligações C-H do esqueleto hidrocarbônico em 2924, 2855 e 1458 cm^{-1} ; das ligações C-OH das carboxilas livres em ligação de hidrogênio em 3600 a 3200 cm^{-1} e deformações em 1163 e 1099 cm^{-1} ; das ligações H-C de olefinas em 3009 cm^{-1} e absorção da carboxila de éster em 1746 cm^{-1} .

CONCLUSÕES

Os altos teores de ácidos graxos insaturados (73%), especialmente o alto teor de ácido ω -3 (ácido linolênico, 10%), tornam o óleo benéfico à saúde e adequado ao consumo humano. As análises físico-químicas, espectroscópicas, termoanalíticas e cromatográficas do óleo das sementes deste citro indicaram propriedades comparáveis a óleos vegetais de boa qualidade, podendo ser utilizados na indústria como fonte alternativa de alimentos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] AJEWOLE, K.; ADEYEYE, A. Characterization of Nigerian citrus seed oils. **Food Chemistry**, v. 47, p.77–78, sep. 1993.
- [2] STAHL, E.; SCHUTZ, E.; MANGOLD, H. K. Extraction of seed oils with liquid and supercritical carbon dioxide. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 28, p. 1153–1157, 1980.
- [3] FIRESTONE, D. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 4th ed. Champaign: AOCS, 1990. v.1/2.

[4] FERNANDES, J. B.; *et al.* Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbionte. **Química Nova**, v. 25, n.6B, p. 1091–1095, mar. 2002.

[5] HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 475-476, 1973.

[6] JUAN-QING, C.; ZHENG-JU, Z.; FAN, P. The study on the constituents of leaf essential oils in *Citrus Limonia Osbeck*. **Acta Botanica Sinica**, v. 30, n. 2, p. 226-228, 1988.

[7] KOBORI, C. N.; JORGE, N. Caracterização dos óleos extraídos das sementes de laranja e maracujá como aproveitamento de resíduos industriais. In: Encontro Regional Sul de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 8, 2003, Curitiba, set. 2003.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)