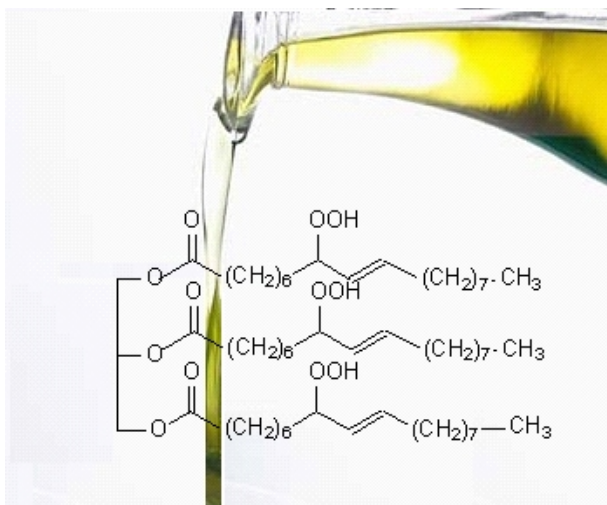


Foto: Odílio Benedito Garrido de Assis



Análise Comparativa dos Espectros de ^1H RMN de Óleos Comestíveis Oxidados

Marina Colzato¹
 Lucimara Aparecida Forato²
 Luiz Alberto Colnago³
 Odílio Benedito Garrido de Assis⁴

Oxidação Lipídica

A rancidez oxidativa é um dos fatores críticos que afetam a qualidade dos óleos comestíveis. A oxidação dos lipídios, que predominantemente contêm ácidos graxos insaturados, causa importantes modificações no sabor e odor, que provocam perda de qualidade do produto. Os lipídios presentes nesses sistemas alimentares são misturas de tri, di e monoglicerídeos, esteróis, glicolipídios, fosfolipídios e ácidos graxos livres, sendo a maior parte destes constituintes susceptíveis à oxidação em diferentes intensidades (SILVA et al., 1999). Os triglicerídeos são ésteres formados a partir do glicerol e ácidos graxos (Fig. 1) e a sua oxidação é a principal causa das alterações organolépticas dos alimentos. A oxidação lipídica se dá naturalmente ao longo do tempo, mas é favorecida quando os produtos são armazenados de forma inadequada.

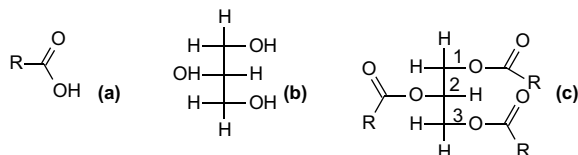


Fig. 1. Fórmula estrutural do (a) ácido graxo, (b) glicerol e (c) triglicerídeo. Sendo R uma cadeia hidrocarbônica com número de carbonos e de insaturações diferentes para cada ácido graxo. A numeração 1, 2 e 3 refere-se à posição de cada ácido graxo no triglicerídeo, sendo as posições 1 e 3 equivalentes.

Comparativamente, os óleos de origem vegetal possuem níveis mais elevados de ésteres de ácidos graxos insaturados que os de outra origem, o que faz com que estes, em princípio, sejam mais susceptíveis à oxidação, considerando que as interações com oxigênio são dependentes do número de insaturações presentes na molécula (QUINN e TANG, 1996). Contudo, os óleos vegetais tendem a oxidar mais lentamente, em função das quantidades significativas de antioxidantes naturais, como tocoferóis e compostos fenólicos presentes em sua composição (QUINN e TANG, 1996).

De um modo geral, a estabilidade oxidativa, ou seja, o tempo em que os lipídios permanecem inalterados, diminui com o aumento da umidade e da temperatura (PRADO FILHO, 1994; KAIJSER et al., 2000). Nos ácidos graxos insaturados a degradação oxidativa pode ocorrer por diferentes vias, seja por ação do meio, de agentes catalisadores como a fotoxidação, ou ainda por atividade enzimática por meio da ação da lipoxigenase. A atividade da lipoxigenase em lipídios está estreitamente ligada às condições de atividade da água nos substratos em que estão contidos. Uma diminuição da água disponível geralmente conduz a uma diminuição nas reações deterioradoras devido à limitação da mobilidade dos reagentes (PRADO FILHO, 1994). Além disso, a baixa atividade da água diminui a possibilidade de crescimento microbiano, fermentação indesejada e outras alterações bioquímicas (VENKATACHALAM e SATHE, 2006).

¹Graduando em química, estagiária, Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua XV de novembro, 1452, São Carlos, SP, CEP 13560-970, mcolzato@yahoo.com.br

²Química, Dra., pesquisadora da Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua XV de novembro, 1452, São Carlos, SP, CEP 13560-970, lucimara@cnpdia.embrapa.br

³Farmacêutico, Dr., pesquisador da Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua XV de novembro, 1452, São Carlos, SP, CEP 13560-970, colnago@cnpdia.embrapa.br

⁴Eng. de Materiais, Dr., pesquisador da Embrapa Instrumentação Agropecuária, Rua XV de novembro, 1452, São Carlos, SP, CEP 13560-970, odilio@cnpdia.embrapa.br

Os produtos primários de oxidação de óleos comestíveis são os hidroperóxidos (SILVA et al., 1999) e dienos conjugados (Fig. 2), que são degradados ou polimerizados via radicais livres, gerando produtos secundários como aldeídos, álcoois, cetonas, ácidos graxos livres, lactonas e hidrocarbonetos (HASENHUETTL e WAN, 1992; GUILLÉN e RUIZ, 2001; GUILLÉN e CABO, 2002), de forte influência sensorial, responsáveis pelas características organolépticas e físico-químicas associadas com a rancificação.

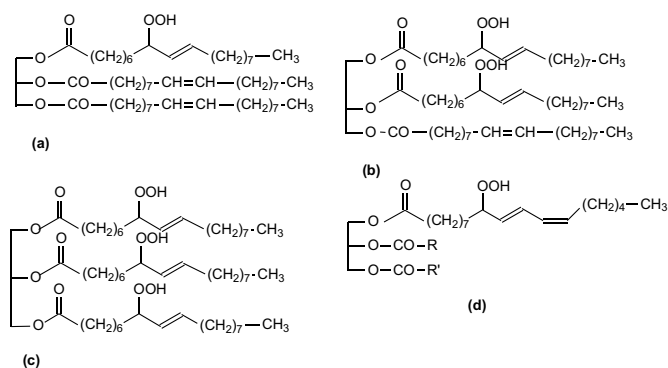


Fig. 2. Fórmula estrutural do (a) mono-hidroperóxido de trioleína (os três ácidos graxos do triglicerídeo são ácido oléico), (b) bis-hidroperóxido de trioleína, (c) tris-hidroperóxido de trioleína e (d) mono-hidroperóxido de dieno conjugado, (GUILLÉN e RUIZ, 2001).

Determinação do Grau de Oxidação por RMN de ^1H

O uso da espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H se mostra vantajoso em relação aos demais métodos químicos analíticos, pois além de requerer pouca preparação e ser rápido, o espectro resultante permite obter parâmetros e informações de interesse e de imediata comparação. Os núcleos de uma molécula são blindados fracamente pelas nuvens eletrônicas que os cercam, cuja densidade varia com o ambiente químico. Essa variação dá origem a diferentes deslocamentos químicos. No espectro, o deslocamento químico de um átomo ou grupo de átomos é medido em relação a um composto de referência, normalmente o tetrametilsilano (TMS), sendo os sinais de deslocamentos químicos de lipídeos são sempre positivos em relação ao TMS.

Preparação e Oxidação Forçada dos Óleos

Amostras de óleos analisadas foram de canola, marca Liza[®] e de azeite de oliva extra virgem da marca Andaluzia[®]. O óleo de macadâmia foi extraído de nozes fornecidas pela Queen Nut (Dois Córregos/SP). Para a extração deste óleo, as nozes foram maceradas e deixadas sob agitação por 2 h em clorofórmio. A separação das fases se deu por centrifugação (Eppendorf[®]) e após a retirada do sobrenadante deixou-se o clorofórmio evaporar-se naturalmente.

Para acelerar a oxidação, as amostras foram acondicionadas em frascos dentro de um reator metálico, o qual foi evacuado levemente e preenchido a pressão de oxigênio a 3,0 atm mantida constante por um período de 30 dias. O reator foi mantido em banho-maria a 60^o C, para favorecer a circulação convectiva no interior da câmara. Alíquotas para análise foram retiradas após 10 e 30 dias de experimento.

Empregou-se espectrômetro Varian INOVA 400 com campo de 9,2 T. Foram obtidos 32 transientes, com pulso $1/2$ e janela espectral de 6,4 KHz. As amostras foram preparadas com 200 μL das amostras dissolvidas em 400 μL de clorofórmio deuterado CDCl_3 e o tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão interno.

Espectros dos óleos anteriores à oxidação

Os espectros dos três óleos são bastante similares com sinais correspondentes a aos ácidos oléico e linoléico, predominantes nos três óleos analisados. A Figura 3 apresenta o espectro de RMN de ^1H para o azeite de oliva indicando acima deste a atribuição dos sinais aos núcleos de hidrogênio na estrutura do triglicerídeo. O sinal de número 1 em 0,9 ppm é referente aos hidrogênios da metila, o número 2, entre 1,4 e 1,2 ppm é atribuído aos hidrogênios de grupos metileno das cadeias alifáticas, o número 3, entre 1,7 e 1,5 ppm é atribuído aos hidrogênios do carbono do éster. O sinal 4, entre 2,1 e 1,9 ppm é atribuído aos hidrogênios ligados aos carbonos da dupla ligação entre carbonos. O sinal 5, entre 2,3 e 2,2 ppm é atribuído aos hidrogênios de carbonos do éster, o sinal 7, entre 4,3 e 4,1 ppm são referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos do glicerol. O sinal 8 corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono de éster e finalmente o sinal 9, entre 5,4 e 5,3 aos hidrogênios ligados aos carbonos que formam duplas ligações. Esses picos podem ser melhor visualizados na Tabela 1, com os deslocamentos identificados com base no trabalho de Guillén e Ruiz (2001).

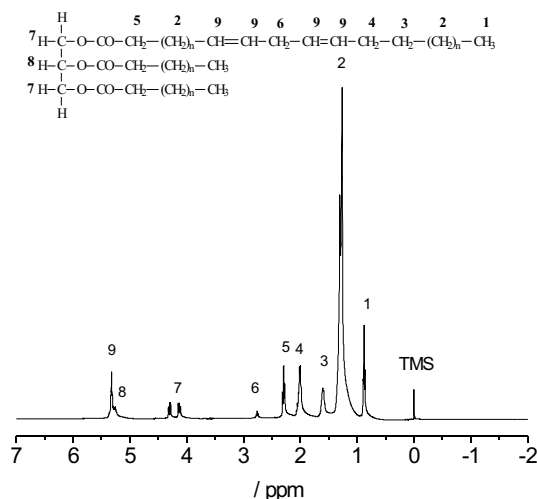


Fig. 3. Espectro de RMN de ^1H do azeite de oliva.

Tabela 1. Atribuição dos picos do espectro de ^1H segundo dados de Guillén e Ruiz (2001).

Número	Deslocamento químico (ppm)	Atribuição
1	0,90-0,80	$-\text{CH}_3$ grupos acil
2	1,40-1,15	$-(\text{CH}_2)_n-$ grupos acil
3	1,70-1,50	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ grupos acil
4	2,10-1,90	$-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ grupos acil
5	2,35-2,20	$-\text{OCO}-\text{CH}_2-$ grupos acil
6	2,80-2,70	$=\text{HC}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$
7	4,32-4,10	$-\text{CH}_2\text{OCOR}-$ glicerol
8	5,26-5,20	$> \text{CHOCOR}$
9	5,40-5,26	$-\text{CH}=\text{CH}-$ grupos acil

De forma similar a Figura 4 apresenta os espectros obtidos para o óleo de canola e de macadâmia, nos quais os mesmos sinais identificados na Figura 3 estão presentes. Cabe observar a ausência do sinal de número 6 para a macadâmia. Este sinal é referente ao

ácido linoléico, presente em muito baixa concentração neste óleo (VENKATACHALAM e SATHE, 2006).

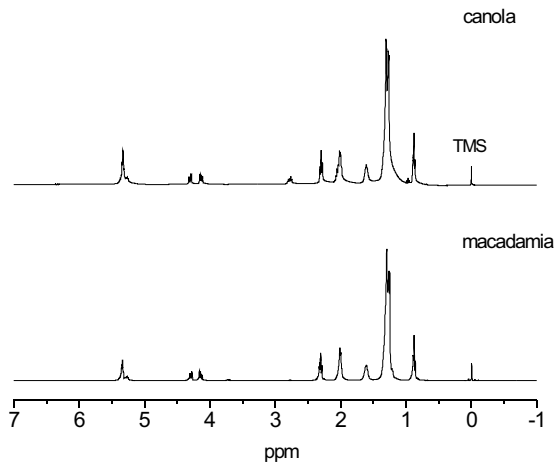


Fig. 4. Espectro de RMN de ^1H do óleo de canola e de macadâmia.

Espectros dos Óleos após a Oxidação

Como a formação de produtos de oxidação é lenta, mesmo nas condições aplicadas neste trabalho, é esperado que o sinal do deslocamento químico seja pequeno no período de observação. Sabendo que os mono-hidroperóxidos derivados da oxidação de óleos e gorduras têm os deslocamentos químicos na região de 8,5 ppm, 6,0 ppm e 4,35 ppm (Tabela 2), buscou-se assim identificar sinais nesta região que alterem de intensidade ao longo do tempo de oxidação (Fig. 5) o que no caso do azeite de oliva, esses produtos de oxidação não ficaram evidentes.

Tabela 2. Deslocamentos químicos dos sinais de RMN de ^1H dos mono-hidroperóxidos, produtos de oxidação de óleos e gorduras.

Deslocamento Químico (ppm)	Atribuição
8,9-8,4	-OOH grupo hidroperóxido
6,56; 6,00; 5,58; 5,45	-CH=CH=CH- (sistema dieno conjugado <i>cis,trans</i>)
6,25; 5,75	-CH=CH=CH- (sistema dieno conjugado <i>trans,trans</i>)
4,35	>CH-OOH

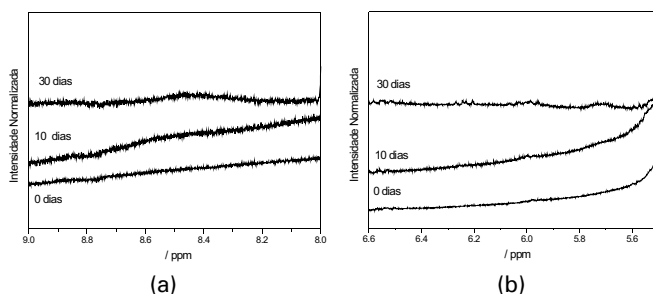


Fig. 5. Espectro do azeite de oliva antes e após 10 e 30 dias sob ambiente oxidante. Em (a), região de absorção de hidroperóxidos e em (b) a região de sinais de dienos conjugados.

Cabe salientar que sinais não observados podem, na realidade, estarem encobertos por outros de maior intensidade, uma vez que o sinal em 5,3 ppm é muito intenso se comparado com a região de 6 ppm dos dienos conjugados.

Os espectros resultantes do óleo de canola de macadâmia (Fig. 6 e 7 respectivamente) evidenciaram indícios de formação de produtos de oxidação após 10 dias, na região dos dienos conjugados, sendo este perfil particularmente intenso após 30 dias, principalmente para o óleo de canola (Fig. 6b). Para o óleo de macadâmia os principais produtos de oxidação estão na posição 5,7 e 6,1 ppm, (dienes conjugados).

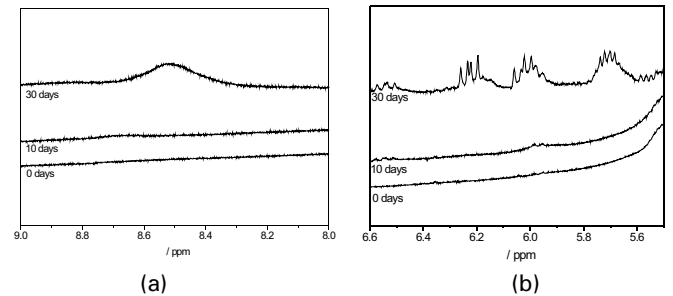


Fig. 6. Espectro do óleo de canola antes da oxidação forçada e após 10 e 30 dias. Em (a), região de absorção de hidroperóxidos e em (b) tem-se a região de sinais de dienos conjugados.

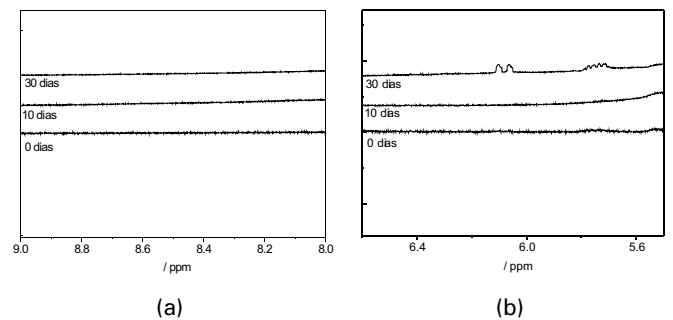


Fig. 7. Espectro do óleo de macadâmia antes da oxidação forçada e após 10 e 30 dias.

De uma forma geral, em todas as amostras, os sinais de oxidação são de pouca intensidade o que não permite uma análise quantitativa por integração comparativa de picos. Contudo, os estudos feitos com óleos indicaram a possibilidade de acompanhar a oxidação através dos sinais referentes aos sistemas de dienos conjugados, na região de 6,0 ppm.

Também foi possível observar que o azeite apresentou apenas traços de dienos conjugados (Fig. 5b) se comparado ao óleo de canola e macadâmia. No entanto, como não há variações nas regiões dos hidroperóxidos, (em 8,5 e 4,3 ppm), para as três amostras analisadas, não é possível concluir qual óleo seja menos susceptível à oxidação entre as amostras analisadas.

Referências

GUILLÉN, M. D.; CABO, N. Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chemistry*, London, v. 77, p. 503-510, 2002.

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

HASENHUETTL, G. L.; WAN, P. J. Temperature effects on the determination of oxidativestability with the metrohm rancimat. **Journal of The American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 69, n. 6, p. 525-527, Jun. 1992.

KAIJSER, A.; DUTTA, P.; SAVAGE, G. Oxidative stability and lipid composition of macadamia nuts grown in New Zealand. **Food Chemistry**, London, v. 71, p. 67-70, 2000.

PRADO FILHO, L. G. Umidade relativa de equilíbrio e oxidação de lipídeos em farinhas de castanha do Pará, de macadâmia e de soja. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 51, n. 2, p. 357-362, 1994.

QUINN, L. A.; TANG, H. H. Antioxidant properties of phenolic compounds in macadamia nuts. **Journal of American Oil Chemist Society**, Chicago, v. 73, n. 11, p. 1585-1588, 1996.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

VENKATACHALAM, M.; SATHE, S. K. Chemical composition of selected edible nuts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 4705-4714, 2006.

Comunicado Técnico, 92

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Instrumentação Agropecuária
Rua XV de Novembro, 1542 - Caixa Postal 741
CEP 13560-970 - São Carlos-SP
Fone: 16 2107 2800 - **Fax:** 16 2107 2902
e-mail: sac@cnpdia.embrapa.br
<http://www.cnpdia.embrapa.br>

1a. edição

1a. impressão 2008: tiragem 300

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Comitê de Publicações

Presidente: Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso
Membros: Dra. Débora Marcondes B. P. Milori,
Dr. João de Mendonça Naime,
Dr. Washington Luiz de Barros Melo
Valéria de Fátima Cardoso

Membro Suplente: Dr. Paulo S. P. Herrmann Junior

Expediente

Supervisor editorial: Dr. Victor Bertucci Neto
Normalização bibliográfica: Valéria de Fátima Cardoso
Tratamento das ilustrações: Valentim Monzane
Editoração eletrônica: Manoela Campos