

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

MARINA CALDEIRA TOLENTINO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ÓLEOS VEGETAIS SOB ESTRESSE
FOTOXIDATIVO E TERMOXIDATIVO POR ESPECTROSCOPIA DE UV E
RMN DE ^1H**

PONTA GROSSA
2008

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*
Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

MARINA CALDEIRA TOLENTINO

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE ÓLEOS VEGETAIS SOB ESTRESSE
FOTOXIDATIVO E TERMOXIDATIVO POR ESPECTROSCOPIA DE UV E
RMN DE ^1H**

Dissertação apresentada à banca examinadora como um dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos para o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Irajara Borba Carneiro
Co-orientadora: Prof. Dra. Noemi Nagata

PONTA GROSSA
2008

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e saúde, por iluminar meu caminho e me dar força pra seguir sempre em frente, tornando tudo possível.

Ao meu pai que, do lugar maravilhoso onde deve estar, olha e cuida de mim e vai servir como exemplo pra eu seguir por toda a minha vida.

À minha família: minha mãe, Luiz, Jr, Paty, Amir, Lucas e Be...pessoas que tornam tudo mais fácil pelo simples fato de existirem, agradeço pelo apoio incondicional.

Ao Marcos, meu namorado (eterno) pelo companheirismo, pelo carinho nos momentos de maior aflição e sobrecarga e pelo incentivo na conclusão de mais essa etapa da vida que estamos construindo juntos.

Ao meu querido orientador, professor Dr. Paulo Borba, pelos ensinamentos, confiança, incentivo à pesquisa e presença sempre divertida, e também por me fazer mudar alguns conceitos...

À professora Dra. Noemi Nagata, amiga do coração, co-orientadora, pelos ensinamentos, sugestões sempre pertinentes, companheirismo e ajuda no tratamento dos dados.

Ao professor Dr. Renato João Sossela de Freitas e a professora Dra. Nelci Catarina Chiquetto, pela participação na banca e contribuições ao trabalho.

Às professoras Dra. Ana Cláudia Barana e Dra. Nelci Catarina Chiquetto pela participação no exame de qualificação e pelas sugestões para melhoria do trabalho.

À Dr^a Ivânia Teresinha Albrecht Schuquel (UEM), pelos registros dos espectros de RMN de ^1H .

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À Cargill Agrícola S/A pelo fornecimento dos óleos vegetais.

À Sooro, pela liberação para finalização desse mestrado.

Aos amigos Ana e Ivo, pelo estímulo para o ingresso no mestrado, conselhos e sugestões.

À amiga, chefe e colega de trabalho, Ana, pela amizade, compreensão, apoio e principalmente paciência nos momentos de ansiedade e preocupação.

À amiga Danianni, pelo companheirismo, ajuda, conselhos e ombro amigo.

Às queridas Aninha, Kika, Débora e Leila pela amizade, convivência sempre divertida e pelos momentos de descontração.

Às meninas da Iniciação, queridas amigas, Jaque e Grazi, pela companhia sempre animadora e por tornarem mais agradáveis as várias horas dentro do laboratório.

E...à todas as pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho com críticas, sugestões, idéias e opiniões e que fizeram papel fundamental na torcida. Amo vocês!!

RESUMO

Neste trabalho foram avaliados os efeitos da fotoxidação e termoxidação na estabilidade dos óleos de soja, milho, canola e girassol, por técnicas titulométricas e espectroscópicas. As amostras foram submetidas ao *oven test* (63°C – 45 dias) e à fotoxidação (temperatura ambiente – 4000 lux – 60 dias). Foram avaliados também os efeitos da adição de antioxidantes na proteção dos óleos durante a fotoxidação. Os resultados indicaram que o óleo de canola é o mais resistente à oxidação térmica e fotoxidativa enquanto o óleo de girassol é o menos resistente. Foram obtidas excelentes correlações entre o índice de peróxidos e os dados de ultravioleta e RMN de ^1H , cujos coeficientes de regressão variaram de 0,962 a 0,996. Os dados de ultravioleta indicaram que a eficiência dos antioxidantes na proteção de óleos vegetais sob estresse fotoxidativo foi: propil galato (PG) > terc-butil-hidroquinona (TBHQ) > butil-hidroxitolueno (BHT) > butil-hidroxianisol (BHA) > ácido cítrico. Os resultados mostraram que a espectroscopia de ultravioleta e RMN de ^1H são técnicas eficientes para monitorar os efeitos de antioxidantes, alterações oxidativas e controle de qualidade de óleos vegetais sob estresse térmico ou fotoquímico.

Palavras chave: óleos vegetais, fotoxidação, termoxidação, antioxidantes, análise espectroscópica.

ABSTRACT

Photo and thermal oxidation effects on the stability of refined soybean, corn, canola and sunflower oils was evaluated by spectroscopy and titration methods in this work. Oils samples were submitted to oven test (63°C – 45 days) and photooxidation (room temperature – 4000 lux – 60 days). The antioxidants addition effects was evaluated on the oil protection during photooxidation. The results showed that the canola oil is more resistant to thermal and photooxidation while the sunflower oil shows less resistance. Good correlations between peroxide values and ultraviolet and ¹H NMR data were found (correlation coefficients 0.962 to 0.996). The ultraviolet data indicated that the antioxidants effectiveness on the photooxidation oil protection was: propyl gallate (PG) > *tert*-butyl hydroquinone (TBHQ) > butylated hydroxytoluene (BHT) > butylated hydroxyanisole (BHA) > citric acid. The results showed that UV and NMR are efficient techniques to monitoring antioxidants effects, oxidative changes and vegetable oil quality control under thermal or photochemical stress.

Keywords: vegetable oils, photooxidation, thermal oxidation, antioxidants, spectroscopy analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Estrutura de um triacilglicerol [trilinoleato de glicerila.....	17
Figura 2	Rota clássica da autoxidação	21
Figura 3	Fotoxidação da região insaturada de um ácido graxo	23
Figura 4	Estrutura de alguns antioxidantes sintéticos	25
Figura 5	Mecanismo de ação para antioxidantes fenólicos	27
Figura 6	Estabilização do radical antioxidante por ressonância	27
Figura 7	Espectro simulado de RMN de ^1H de um óleo vegetal	34
Figura 8	Amostras de óleos vegetais durante a fotoxidação.....	37
Figura 9	Amostras de óleos vegetais durante o <i>Schall Oven Test</i>	38
Figura 10	Espectro UV do óleo de soja durante a fotoxidação	41
Figura 11	Espectro UV do óleo de milho durante a fotoxidação	41
Figura 12	Espectro UV do óleo de canola durante a fotoxidação	42
Figura 13	Espectro UV do óleo de girassol durante a fotoxidação	42
Figura 14	Índice de peróxidos de óleos vegetais fotoxidados	43
Figura 15	Formação de dienos conjugados durante a fotoxidação	44
Figura 16	Regressão polinomial entre absorbância a 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de soja	46
Figura 17	Regressão linear entre absorbância a 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de milho	46
Figura 18	Regressão linear entre absorbância a 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de canola	47
Figura 19	Regressão polinomial entre absorbância a 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de girassol	47
Figura 20	Fragmento insaturado de um ácido graxo mostrando as posições alílicas (E), vinílicas (V), dialílicas (G) e a fração residual desses hidrogênios após a fotoxidação de 60 dias.....	50
Figura 21	Efeito dos antioxidantes na formação de dienos conjugados durante a fotoxidação dos óleos de soja, milho, canola e girassol	54
Figura 22	Espectro UV do óleo de soja durante a termoxidação	58

Figura 23	Espectro UV do óleo de milho durante a termoxidação	59
Figura 24	Espectro UV do óleo de canola durante a termoxidação	59
Figura 25	Espectro UV do óleo de girassol durante a termoxidação	59
Figura 26	Índice de peróxidos de óleos vegetais termoxidados	60
Figura 27	Formação de dienos conjugados durante a termoxidação	61
Figura 28	Regressão linear entre absorbância a 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de soja durante a termoxidação	62
Figura 29	Regressão linear entre absorbância a 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de milho durante a termoxidação	62
Figura 30	Regressão linear entre absorbância a 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de canola durante a termoxidação	63
Figura 31	Regressão linear entre absorbância a 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de girassol durante a termoxidação	63
Figura 32	Fragmento insaturado de um ácido graxo mostrando as posições alílicas (E), vinílicas (V), dialílicas (G) e a fração residual desses hidrogênios após a termoxidação de 45 dias	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição em ácido graxos de alguns óleos vegetais.....	17
Tabela 2	Grupos cromóforos de produtos de oxidação e regiões de absorção no espectro de ultravioleta.....	31
Tabela 3	Parâmetros estruturais obtidos dos espectros de RMN de ^1H de óleos vegetais sob estresse fotooxidativo	49
Tabela 4	Dose mais eficiente de antioxidantes para os óleos vegetais fotooxidados.....	52
Tabela 5	Ação dos antioxidantes na prevenção da formação de dienos conjugados nos experimentos de fotoxidação do óleo de soja.....	53
Tabela 6	Ação dos antioxidantes na prevenção da formação de dienos conjugados nos experimentos de fotoxidação do óleo de milho.....	53
Tabela 7	Ação dos antioxidantes na prevenção da formação de dienos conjugados nos experimentos de fotoxidação do óleo de canola.....	53
Tabela 8	Ação dos antioxidantes na prevenção da formação de dienos conjugados nos experimentos de fotoxidação do óleo de girassol.....	54
Tabela 9	Parâmetros estruturais obtidos dos espectros de RMN de ^1H de óleos vegetais sob estresse termoxidativo.....	65

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação I	Cálculo da acidez	38
Equação II	Cálculo do índice de peróxidos	39
Equação III	Regressão múltipla entre índice de peróxidos e parâmetros obtidos por RMN de ^1H durante a fotoxidação.....	51
Equação IV	Regressão múltipla entre índice de peróxidos e parâmetros obtidos por RMN de ^1H durante a termoxidação.....	67
Equação V	Regressão múltipla entre acidez e parâmetros obtidos por RMN de ^1H durante a termoxidação.....	68

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

A	Absorbância
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
E	Hidrogênios alílicos
G	Hidrogênios dialílicos
IP	Índice de peróxidos
L	Ácido linoléico
Ln	Ácido linolênico
O	Ácido oléico
PG	Propil galato
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
R_{oa}	Razão entre hidrogênios olefínicos e alifáticos
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
UA	Unidades de absorbância
UV	Ultravioleta
V	Hidrogênios vinílicos

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1	Tabelas de dados
Anexo 2	Trabalhos publicados

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	ÓLEOS VEGETAIS.....	16
2.2	OXIDAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS.....	18
2.2.1	Autooxidação.....	19
2.2.2	Fotooxidação.....	22
2.3	ANTIOXIDANTES.....	24
2.3.1	Mecanismo de ação dos antioxidantes fenólicos.....	27
2.4	TESTES ACELERADOS.....	28
2.5	ESPECTROSCOPIA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE ÓLEOS.....	29
2.5.1	Espectroscopia de ultravioleta - visível (UV-vis).....	30
2.5.2	Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H).....	31
3	OBJETIVOS.....	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.1	MATERIAL.....	36
4.2	MÉTODOS.....	36
4.2.1	Preparo das amostras.....	36
4.2.2	Fotooxidação acelerada em câmara de luz fluorescente.....	36
4.2.3	Oxidação acelerada em estufa (<i>Schall Oven Test</i>).....	37
4.2.4	Análises físico-químicas.....	38
4.2.4.1	Índice de acidez.....	38
4.2.4.2	Índice de peróxidos.....	39
4.2.5	Análises espectroscópicas.....	39
4.2.5.1	Espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-vis)	39
4.2.5.2	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H).....	40
4.2.6	Análise estatística	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1	FOTOXIDAÇÃO	41
5.1.1	Estabilidade dos óleos vegetais	43
5.1.2	Correlação entre absorbância em 232 nm e índice de peróxidos.....	45
5.1.3	Ressonância Magnética Nuclear de ^1H	48
5.1.4	Análise de Regressão entre os parâmetros estruturais obtidos por RMN de ^1H e índice de peróxidos	51
5.1.5	Estudo da ação de antioxidantes durante a fotooxidação.....	52
5.2	TERMOXIDAÇÃO	57
5.2.1	Estabilidade dos óleos vegetais	60

5.2.2	Correlação entre absorbância em 232 nm e índice de peróxidos	61
5.2.3	Ressonância Magnética Nuclear de ^1H	64
5.2.4	Análise de Regressão entre os parâmetros estruturais obtidos por RMN de ^1H e índice de peróxidos.....	67
5.2.5	Análise de Regressão entre os parâmetros estruturais obtidos por RMN de ^1H e índice de acidez	68
6	CONCLUSÕES.....	69
	REFERÊNCIAS.....	71

1. INTRODUÇÃO

A presença de óleos vegetais na alimentação é importante pelo fato de serem fontes de ácidos graxos essenciais ω -3 e ω -6 que não são produzidos pelo organismo e devem ser ingeridos na dieta. Porém, essas características, importantes do ponto de vista nutricional, são preocupantes do ponto de vista tecnológico, pois os ácidos graxos polinsaturados são altamente susceptíveis a reações de degradação oxidativa, que causam alterações sensoriais nesses óleos, além de formarem compostos potencialmente tóxicos. Devido a esse fato, é importante o estudo da estabilidade de óleos vegetais por técnicas aceleradas de oxidação, as quais permitem verificar as alterações produzidas nos óleos sob diferentes condições de estocagem.

No entanto, a aquisição desse tipo de informação geralmente é obtida empregando-se técnicas clássicas que se baseiam em análises titulométricas que, além de serem limitadas, são trabalhosas e demoradas. Verificando-se a importância do desenvolvimento de métodos analíticos que forneçam resultados confiáveis sobre o real estado oxidativo de óleos vegetais, estudou-se a possibilidade de utilização de técnicas alternativas como as espectroscópicas, que possam fornecer resultados similares ou superiores às técnicas clássicas. As técnicas espectroscópicas, além de serem mais rápidas e precisas, geram um grande número de informações sobre a estrutura da molécula em um curto período de tempo. Dessas técnicas, a mais importante neste estudo foi a Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , da qual obtém-se informações importantes sobre as alterações estruturais durante os processos de oxidação térmica e fotooxidativa.

Outro aspecto abordado neste estudo está relacionado aos principais antioxidantes utilizados em óleos e gorduras. A eficiência dos principais antioxidantes sintéticos em diferentes concentrações foi avaliada, comparando-os em termos de estrutura molecular. A

adição de antioxidantes em óleos vegetais se torna necessária para prolongar a vida-de-prateleira dos mesmos, pois durante o processo de refino são eliminados os antioxidantes naturais presentes no óleo bruto. Embora vários estudos tenham sido realizados visando a substituição de antioxidantes sintéticos por compostos naturais, ainda não há viabilidade do uso desses compostos pela indústria de alimentos, por serem menos disponíveis, mais caros e necessitarem de uma grande quantidade para promover uma proteção efetiva.

Assim, este trabalho teve como objetivo principal a avaliação da qualidade de diferentes óleos vegetais submetidos à oxidação térmica e fotooxidativa, por espectroscopia de ultravioleta e Ressonância Magnética Nuclear, mostrando o potencial dessas técnicas e verificando a existência de correlações com as técnicas clássicas. Além disso, estudou-se a ação de diferentes antioxidantes durante fotooxidação desses óleos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ÓLEOS VEGETAIS

O consumo de óleos vegetais tem aumentado nos últimos anos. Embora eles sejam conhecidos como importantes componentes da dieta humana, pois são fontes de ácidos graxos essenciais, estes últimos são altamente susceptíveis à oxidação devido à presença de duplas ligações, afetando a estabilidade e a qualidade desses óleos (WALISIEWICZ-NIEKBALSKA; KOSMACINSKA; CHMIELARZ, 1997; OLIVEIRA; REGITANO D'ARCE, 2004).

Os lipídeos também desempenham um importante papel em relação à qualidade de alguns alimentos, principalmente no que se refere às propriedades sensoriais como sabor, aroma, cor e textura, que os tornam desejáveis. Conferem valor nutritivo ao alimento constituindo uma fonte de energia metabólica, de ácidos graxos essenciais e de vitaminas lipossolúveis (ST. ANGELO, 1996).

Segundo a legislação brasileira, óleos vegetais são produtos obtidos de espécies vegetais constituídos principalmente de glicerídeos de ácidos graxos, podendo conter pequenas quantidades de fosfolipídeos, constituintes insaponificáveis e ácidos graxos livres (ANVISA, 2005). A proporção desses compostos é geralmente maior em óleos brutos que em óleos refinados e desodorizados, pois os mesmos são decompostos e volatilizam durante as etapas de processamento (JAWAD; KOCHHAR; HUDSON, 1984; JUNG; YOON; MIN, 1989; MANORAMA; RUKMINI, 1991; CMOLÍK et al., 1995). A estrutura de um triacilglicerol, principal componente dos óleos vegetais, pode ser observada na Figura 1.

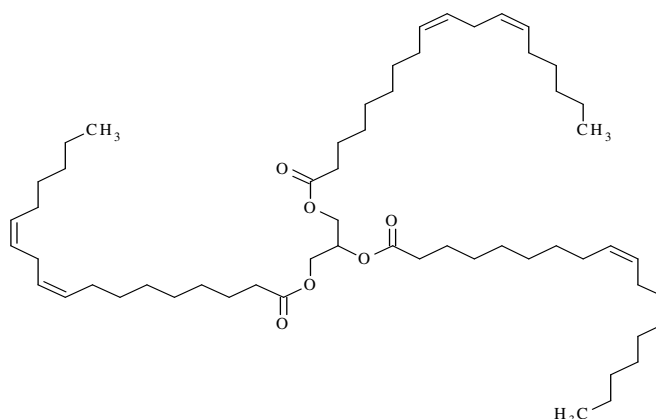


Figura 1 - Estrutura de um triacilglicerol [trilinoleato de glicerila].

A maioria dos ácidos graxos de óleos comestíveis possui cadeia carbônica de 16 a 18 átomos de carbono e contêm de uma a quatro insaturações. Além disso, são líquidos a temperatura ambiente devido ao seu baixo ponto de fusão (NAWAR, 1996; MORETTO et al., 2002; ZALIHA et al., 2004).

O perfil de ácidos graxos presentes nos óleos vegetais afeta diretamente sua estabilidade à oxidação e a susceptibilidade desses ácidos graxos à oxidação depende do seu grau de insaturação. Ácidos graxos polinsaturados como o ácido linolênico (C 18:3, ω -3) e linoléico (C 18:2, ω -6) reagem rapidamente formando hidroperóxidos. No entanto, óleos com alto teor de ácido oléico (C 18:1, ω -9) ou esteárico (C 18:0) mostram alta estabilidade oxidativa (LIU; SINGH; GREEN, 2002). Na Tabela 1 está apresentada a composição de alguns óleos vegetais.

Tabela 1 – Composição em ácidos graxos de alguns óleos vegetais.

Óleos	Ácidos graxos saturados (%)	Ácidos graxos monoinsaturados (%)	Ácidos graxos polinsaturados	
			Ác. linoléico (%)	Ác. linolênico (%)
Soja	15	24	54	7
Milho	13	25	61	1
Canola	6	58	26	10
Girassol	11	20	69	-

FONTE: MORETTO; FETT, 1998, modificado.

Observa-se que na composição de todos os óleos apresentados há predominância de ácidos graxos insaturados, com destaque para o óleo de girassol com cerca de 70% de ácido linoléico e para o óleo de canola, rico em ácidos graxos monoinsaturados, representado principalmente pelo ácido oléico. Uma característica importante do óleo de canola é sua composição em ácidos graxos essenciais, apresentando uma relação entre ácido linolênico e linoléico de aproximadamente 1:2, considerada nutricionalmente favorável (ACKMAN, 1990).

2.2 OXIDAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS

A oxidação é a reação mais importante do ponto de vista da qualidade de óleos e gorduras e pode ocorrer durante estocagem da matéria-prima, processamento, tratamento térmico e estocagem do produto final, quando esses são expostos a fatores ambientais como ar, luz e altas temperaturas (MORETTO; FETT, 1998). Diferentes mecanismos químicos são responsáveis pela oxidação de óleos vegetais, dependendo do tipo de oxigênio que reage com esses óleos. O oxigênio atmosférico ($^3\text{O}_2$), chamado de triplete, reage com radicais lipídicos e promove a autooxidação, que é uma reação em cadeia via radicais livres. No entanto, há outro mecanismo de oxidação de óleos chamado fotoxidação, que ocorre na presença de luz, sensibilizadores e oxigênio atmosférico, que é convertido em oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) pela ação desses sensibilizadores (CHOE; MIN, 2006).

Além de tornar os alimentos impróprios para o consumo, a oxidação lipídica provoca outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação das vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, com a formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos (NAWAR, 1996; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Produtos da oxidação lipídica podem influenciar outros constituintes, interferindo, por exemplo, na absorção de proteínas e ácido fólico pelo organismo. Eles causam alterações patológicas, inibição da atividade de enzimas, aumento do colesterol e peróxidos no sangue, ativando o processo de aterosclerose (KARPINSKA; BOROWSKI; DANOWSKA-OZIEWICZ, 2001).

Durante o processo de refino, necessário para adaptar a maioria dos óleos vegetais para o consumo, elimina-se compostos indesejáveis como peróxidos, produtos de degradação e pigmentos, mas ocorrem também perdas de nutrientes valiosos e antioxidantes naturais, como carotenóides e tocoferóis (GUTFINGER; LETAN, 1974; LANZON et al., 1994). A remoção de antioxidantes naturais dos óleos aumenta sua susceptibilidade à oxidação enzimática e a autooxidação (MALECKA, 2002). Além disso, a presença de pró-oxidantes como metais, particularmente aqueles que possuem dois ou mais estados de valência, também pode aumentar o grau de oxidação (PAQUETTE; KUPRANYEZ; VAN DER VOORT, 1985).

2.2.1 Autooxidação

Aromas desagradáveis, perdas nutricionais e outras alterações deteriorativas em óleos vegetais aparecem por reação com oxigênio atmosférico (rancidez oxidativa) ou por reações catalisadas por enzimas provenientes de alimentos ou microrganismos (rancidez hidrolítica). Os efeitos das reações hidrolíticas podem ser minimizados por armazenamento a frio, transporte, embalagens adequadas e esterilização. No entanto, a rancidez oxidativa é mais difícil de ser evitada, uma vez que é uma reação com baixa energia de ativação, tanto para seu início ($4 - 5 \text{ kcal mol}^{-1}$) quanto para sua continuação ($6 - 14 \text{ kcal mol}^{-1}$) (HAMILTON, 1994; NAZ et al., 2004).

O calor é um importante acelerador de oxidação, especialmente em temperaturas acima de 60°C , quando a velocidade de oxidação dobra a cada aumento de 15°C (SHERWIN; THOMPSON, 1967). Os produtos da oxidação primária são os hidroperóxidos, que não

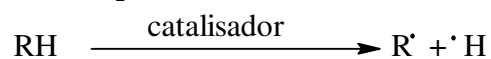
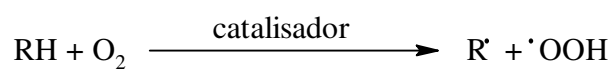
causam alterações no sabor e odor, mas seus produtos de degradação como aldeídos e cetonas são compostos com grande capacidade de alteração de aroma (GORDON, 1991).

A autooxidação geralmente mostra um período de indução, que é um período no qual ocorrem poucas alterações nos lipídeos. Após o final do período de indução, a deterioração oxidativa ocorre mais rapidamente (GORDON, 2001). Esse processo ocorre em várias etapas (Figura 2). Na fase de indução, um hidrogênio do triacilglicerol é abstraído por um radical, formando um radical lipídico. Esse radical reage com o oxigênio atmosférico, formando o radical alquilperoxil (COSGROVE; CHURCH; PRYOR, 1987; GORDON, 2001) que abstrai outro hidrogênio de outra molécula de lipídeo, formando alquilhidroperóxidos e novo radical lipídico, que dá sequência à reação de propagação de cadeia (NAWAR, 1996). Os radicais são formados diretamente a partir de ácidos graxos poliinsaturados na presença de luz, calor, outros radicais e catalisadores como metais (GORDON, 2001).

Na fase de propagação, os peróxidos podem participar das reações de decomposição e formação de novos radicais. A entalpia da reação é relativamente baixa, comparada com as reações de iniciação. Devido a isso, as reações nessa fase ocorrem mais rapidamente. A abstração do hidrogênio ocorre preferencialmente em carbonos onde a energia de dissociação das ligações é baixa, como os hidrogênios do grupo metileno vizinho ao alqueno (posição dialílica e alílica). A abstração é mais rápida no grupo metileno entre dois grupos alquenos no ácido graxo poliinsaturado (posição dialílica) (GORDON, 2001). Esses radicais gerados induzem o processo a tornar-se autocatalítico (ESKIN; PRZYBYLSKI, 2001).

Na fase terminal, os radicais livres reagem entre si. Os peróxidos são clivados formando compostos de oxidação secundários: álcoois, aldeídos, cetonas e epóxidos (MORETTO; FETT, 1998).

Primeira etapa - Iniciação

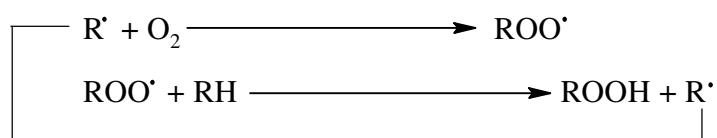


Catalisadores: fontes externas de energia

íons metálicos

metaloproteínas

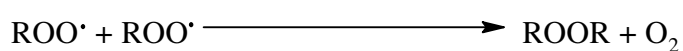
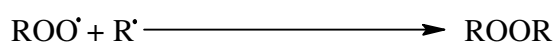
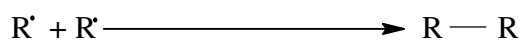
Segunda etapa – Propagação



Reação em cadeia

- alto consumo de oxigênio
- rápido aumento do índice de peróxido

Terceira etapa – Terminação



Produtos estáveis

onde: RH - ácido graxo insaturado

R[•] - radical livre

ROO[•] - radical peroxil

ROOH - hidroperóxido

Figura 2 - Rota clássica da autoxidação.

FONTE: MORETTO; FETT, 1998, modificado.

Alguns compostos podem prevenir ou interferir na propagação da oxidação, desativando os radicais livres do sistema. Antioxidantes ‘*chain breaking*’, como os compostos fenólicos, reagem com os radicais por doação de um átomo de hidrogênio, detendo desse modo a reação de propagação em cadeia pela formação de compostos inativos (SIMIC; JOVANOVIĆ; NIKI, 1992). Os antioxidantes fenólicos competem com lipídeos pela formação de novos radicais, interrompendo a reação de propagação.

2.2.2 Fotoxidação

A energia da radiação ultravioleta ou visível afeta de modo significativo a estabilidade dos alimentos fotossensíveis, pois inicia e acelera as reações de degradação fotoquímica. A radiação ultravioleta (λ 200 a 380 nm) tem maior energia do que a luz emitida na região do visível (λ 380 a 780 nm), uma vez que a energia é diretamente proporcional à frequência e inversamente proporcional ao comprimento de onda (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998).

A fotoxidação, que ocorre na presença de luz e de um sensibilizador, é uma rota alternativa para a formação de hidroperóxidos. Nesse processo não há período de indução (GORDON, 2001) e não há reação em cadeia (OLIVEIRA; REGITANO-D’ARCE, 2004). O mecanismo é diferente da termoxidação e tende a ser mais prejudicial para a estabilidade de óleos e gorduras (GORDON, 2001). É promovida essencialmente pela radiação UV em presença de fotossensibilizadores como clorofila, mioglobina, riboflavina, entre outros (BERGER; HAMILTON, 1995; MELO; GUERRA, 2002).

A molécula de oxigênio, no estado fundamental, apresenta-se no estado eletrônico triplete [$^3\text{O}_2$]. Nesse estado os dois elétrons de maior energia têm spins paralelos $\uparrow \uparrow$ em orbitais moleculares diferentes (GORDON, 2001). Quando recebe energia, da radiação ultravioleta ou de molécula fotosensibilizadora no estado excitado, forma o oxigênio singlete [$^1\text{O}_2$], altamente reativo, por apresentar os dois elétrons de maior energia alinhados de forma

antiparalela $\uparrow\downarrow$ $\uparrow\uparrow$, podendo ocupar o mesmo orbital molecular $\uparrow\downarrow$. Esse oxigênio - $\uparrow\downarrow$ O-O $\uparrow\downarrow$ - mais eletrofílico que o oxigênio tripleto, reage cerca de 1500 vezes mais rápido com substâncias de alta densidade de elétrons, como os ácidos graxos insaturados (FRANKEL, 1991; NAMIKI, 1990; GORDON, 2001). A região nucleófila do oxigênio singlete (orbital preenchido) retira o hidrogênio da molécula lipídica. O par de elétrons deixados pelo hidrogênio forma uma dupla ligação trans [Z], deixando um par de elétrons livres no carbono adjacente. O carbânio formado proporcionará a adição do oxigênio à molécula, preenchendo seu orbital vazio com esses dois elétrons, produzindo hidroperóxidos.

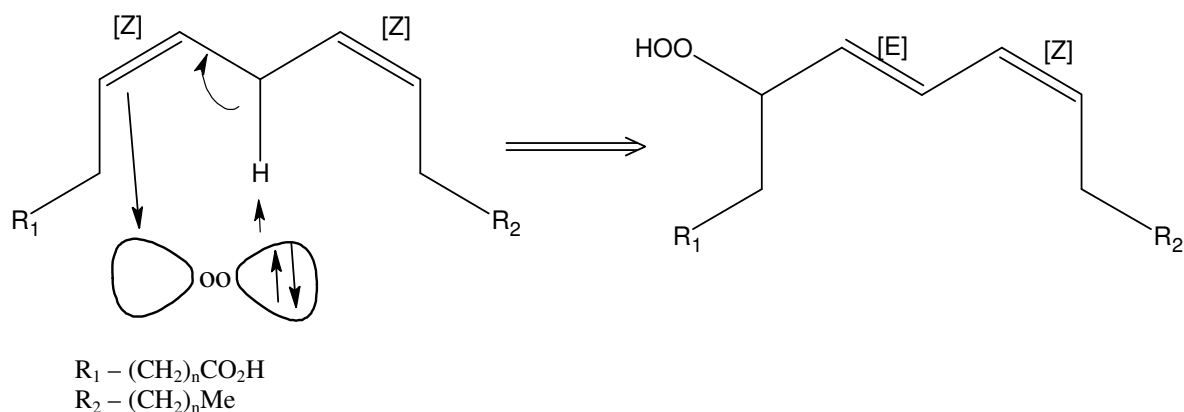


Figura 3 - Fotoxidação da região insaturada de um ácido graxo.

O teor de peróxido formado na fotoxidação é diferente do que se observa na ausência de luz e sensibilizadores (JADHAV et al., 1996; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999), sendo a velocidade de formação de hidroperóxidos durante a fotoxidação de 10 a 30 vezes maior que na autoxidação, pois não há período de indução (ROVELLINI, CORTESI, FEDELI, 1997).

A degradação posterior dos hidroperóxidos leva a formação de aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos (JADHAV et al., 1996; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

2.3 ANTIOXIDANTES

A estabilidade dos alimentos à oxidação é dependente do equilíbrio entre a composição e concentração do substrato e a presença de pró-oxidantes e antioxidantes. A remoção do oxigênio, inativação de enzimas, proteção contra luz e íons metálicos são importantes para evitar ou minimizar a oxidação lipídica. No entanto, essas medidas nem sempre são aplicáveis. A adição de antioxidantes constitui prática comum para aumentar a estabilidade dos lipídeos (DECKER, 1998).

Antioxidantes são substâncias que retardam o aparecimento de reações oxidativas nos alimentos (ANVISA, 1997). São conhecidos como receptores de radicais livres e oxigênio singlete. Reduzem a formação de hidroperóxidos e previnem rancidez ou sabores estranhos em óleos comestíveis, pois aumentam o período de indução das reações oxidativas (SHYAMALA et al., 2005). Os antioxidantes interferem de forma eficiente no processo de autooxidação doando hidrogênio, regenerando a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação (MADSEN; BERTELSEN; SKIBSTED, 1997). A eficiência de um antioxidante está relacionada principalmente à sua capacidade em capturar radicais livres (VICETTI et al., 2005).

Os antioxidantes, segundo o mecanismo de ação, são classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia de reação através da doação de hidrogênio aos radicais livres, convertendo-o em produtos mais estáveis ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídeo-antioxidante que pode reagir com outro radical livre (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992; ADEGOKE et al., 1998; GORDON, 2001). Normalmente, são compostos fenólicos e são consumidos durante o período de indução (GORDON, 2001). Os antioxidantes mais utilizados na indústria de alimentos são butil-hidroxitolueno (BHA), butil-hidroxianisol (BHT), propil galato (PG) e terc butil-

hidroquinona (TBHQ) (Figura 4), por serem mais efetivos e baratos do que os antioxidantes naturais (PIN-DER; GOW-CHIN, 1997; PINHO et al, 2000; RAMALHO; JORGE, 2006).

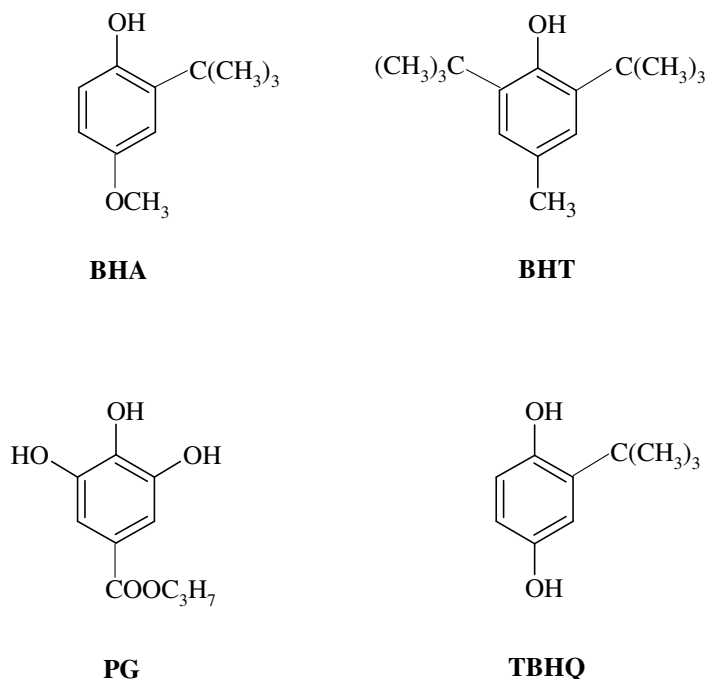


Figura 4 - Estrutura de alguns antioxidantes sintéticos.
 FONTE: RAMALHO; JORGE, 2006.

Os antioxidantes secundários agem por vários mecanismos de ação como ligação com metais, remoção do oxigênio, conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicais, absorvendo a radiação UV ou desativando o oxigênio singlete. Exemplos desse tipo de antioxidantes são os agentes quelantes, como o ácido cítrico (GORDON, 2001).

Os agentes quelantes complexam íons metálicos, principalmente o cobre e o ferro, pela ligação coordenada entre pares de elétrons não compartilhados de sua estrutura com orbitais atômicos vazios do metal de transição. Os mais comuns são o ácido cítrico, fosfatos e EDTA. O ácido cítrico é comumente adicionado nos óleos vegetais após desodorização (GORDON, 1990). Além disso, seu desempenho pode ser melhorado pela ação sinérgica com antioxidantes fenólicos.

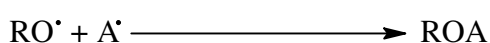
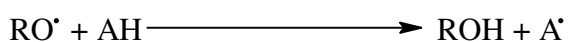
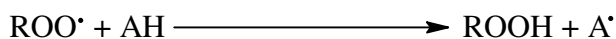
O uso de antioxidantes sintéticos é regulado pelos governos através do controle de aditivos alimentares, em virtude de possíveis efeitos indesejáveis à saúde que esses compostos podem promover. No Brasil, o limite máximo para utilização de antioxidantes em óleos e gorduras é de 0,02% no caso do BHA e TBHQ e de 0,01% para o BHT e PG, sendo que o ácido cítrico pode ser adicionado na quantidade necessária ao produto (ANVISA, 1988). No entanto, os efeitos toxicológicos desses antioxidantes têm sido assunto de controvérsias (PINHO et al., 2000; BOTTERWECK et al., 2000). Estudos disponíveis na literatura geralmente se referem a efeitos carcinogênicos desenvolvidos em ratos devido à presença de BHA e BHT em concentrações extremamente altas quando comparadas com as quantidades usualmente consumidas (CLAYSON et al., 1986; MADHAVI; DESPANDE; SALUNKHE, 1996).

Como resultado da possibilidade dos antioxidantes sintéticos causarem efeitos indesejáveis à saúde, há um grande interesse em obter e utilizar antioxidantes provenientes de fontes naturais. Pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, que permitam a substituição dos antioxidantes sintéticos ou fazer associações entre eles, para que possa haver uma diminuição de sua quantidade nos alimentos (SOARES, 2002). Porém, devido ao alto custo e menor eficiência desses antioxidantes naturais, ainda não há viabilidade de sua utilização pela indústria de alimentos, com exceção do ácido cítrico, que é um agente quelante.

Os antioxidantes naturais mais utilizados são o ácido ascórbico, ácido cítrico e seus sais, tocoferóis e extratos de especiarias como alecrim, sálvia e orégano (WEINREICH, 1998; RAMALHO; JORGE, 2006). Carotenóides podem ser captadores de radicais envolvendo uma ou mais possibilidades: transferência de elétrons, abstração do hidrogênio alílico e adição (AGAMEY et al., 2004).

2.3.1 Mecanismo de ação dos antioxidantes fenólicos

Antioxidantes fenólicos interferem na oxidação lipídica pela doação de um átomo de hidrogênio ao radical lipídico (SHAHIDI; NACZK, 2004). FRANKEL (1980) apresentou o mecanismo de ação dos antioxidantes fenólicos, conforme representado na Figura 5.



onde: $\text{ROO}^\bullet$ e $\text{R}^\bullet$ - radicais livres

AH - antioxidante fenólico

$\text{A}^\bullet$ - radical arila

Figura 5 – Mecanismo de ação para antioxidantes fenólicos.

FONTE: FRANKEL, 1980; SHAHIDI; NACZK, 2004.

O hidrogênio ácido da hidroxila fenólica é mais facilmente abstraído pelos radicais livres que os hidrogênios alílicos ou dialílicos das moléculas insaturadas (Figura 6). Assim, formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e o radical arila do antioxidante é estabilizado por ressonância (RAMALHO; JORGE, 2006).

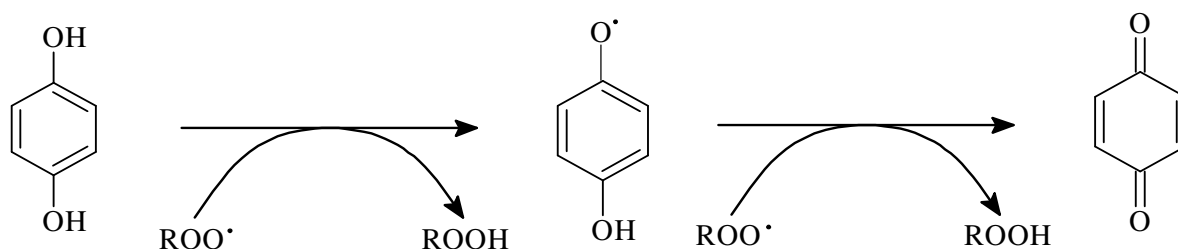


Figura 6 – Estabilização do radical antioxidante por ressonância.

FONTE: SHAHIDI; NACZK, 2004

A atividade de polihidroxifenóis depende do número de grupos hidroxila no anel aromático e da presença de grupos alquila na posição *orto* e *para*, o que é favorável para a

deslocalização do elétron e estabilização do radical fenoxil formado durante a oxidação. Um segundo grupo hidroxila nas posições *orto* ou *para* melhora a estabilidade do radical formado (LITWINIENKO; KASPRZYCKA-GUTTMAN; JAMANEK, 1999).

2.4 TESTES ACELERADOS

Os testes de oxidação acelerada são testes nos quais as amostras são submetidas a condições extremas de degradação para que seja avaliada de forma rápida sua estabilidade e para prever a vida-de-prateleira. Além disso, possibilita a avaliação rápida de diferentes técnicas analíticas e verificação da eficácia de antioxidantes. Com isso, eles se tornaram rotineiros no controle de qualidade de indústrias, principalmente de óleos vegetais, que necessitam de resultados eficientes de uma forma mais rápida, pois o processo de oxidação a condições ambientes é muito lento. No teste de Schall, por exemplo, as amostras são colocadas em estufa à temperatura de 60 a 70°C (FRANKEL, 1993; MALCOMSON et al., 1994). Foi observado que 1 dia de estocagem em estufa a 65°C é equivalente a 1 mês de estocagem a temperatura ambiente (25°C) (ABOU-GHARBIA et al., 1996). Alterações de sabor de óleos estocados a 60°C por 4 dias correspondem àqueles mantidos a temperatura ambiente por 4 meses (WARNER; FRANKEL; MOUNTS, 1989).

Diversos autores têm utilizado testes de oxidação acelerada para avaliação da qualidade de óleos e eficácia de antioxidantes. Oliveira (2003) submeteu os óleos de milho e canola a testes acelerados (*oven test* e fotoxidação) para verificar a melhor dose de TBHQ para ser utilizada nesses óleos, obtendo dados da espectroscopia de UV (absortividade a 232 nm). Seus resultados mostram que o teste de Schall é um procedimento adequado para o estudo de antioxidantes e que 115 mg kg⁻¹ e 108 mg kg⁻¹ foram as doses mais eficientes de TBHQ para os óleos de milho e canola, respectivamente. Siqueira (1998) avaliou a estabilidade oxidativa de óleos de soja, milho e canola submetidos à fotoxidação e verificou

que o óleo de canola é o mais estável a esse processo oxidativo. A estabilidade oxidativa de óleos vegetais foi analisada também por Wanasundara, Shahidi e Jablonski (1995), utilizando técnicas espectroscópicas (RMN de ^1H), durante *oven test*. Eles observaram que a RMN fornece resultados excelentes relativos a alterações estruturais da molécula durante oxidação, sendo um método rápido, simples e não destrutivo. O efeito do aquecimento em microondas do óleo de canola foi avaliado por Vieira e Regitano D'Arce (1998), no qual foi observado que a absorvidade na região de 232 nm aumenta gradativamente com o aumento do tempo de exposição às microondas. Além disso, verificaram que a oxidação acelerada via microondas e análises espectrofotométricas na região do UV fornecem bons índices para medir alterações oxidativas em óleos vegetais.

2.5 ESPECTROSCOPIA NO CONTROLE DE QUALIDADE DE ÓLEOS

As análises clássicas, como índice de peróxidos e acidez, são comumente utilizadas no controle de qualidade de óleos vegetais. Porém, esses métodos não fornecem com clareza informações sobre alterações moleculares produzidas no processo. Além disso, qualquer variação no procedimento pode resultar em grande variação nos resultados. Isso porque são métodos pouco sensíveis, de baixa confiabilidade e seletividade, com grande dependência da eficiência do analista. No caso do índice de peróxidos, pode haver falha quando o teor desses compostos é baixo em razão da dificuldade na visualização do ponto final de titulação e seu uso deve ser limitado aos estágios iniciais de oxidação por causa de sua natureza transitória (GRAY, 1978).

Com isso, observa-se um esforço especial no desenvolvimento de métodos analíticos baseados na quantificação de compostos gerados na oxidação de lipídeos. Esses métodos devem ser rápidos e sensíveis, permitindo a avaliação do estado oxidativo do óleo durante sua

vida útil e as condições de processamento e estocagem (PÉREZ-CAMINO et al., 1988). As técnicas espectroscópicas aparecem como uma alternativa, pelo fato de serem mais sensíveis, rápidas e com resultados mais confiáveis.

2.5.1 Espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-vis)

Na espectroscopia de ultravioleta (UV) se utiliza radiação de baixo comprimento de onda (λ 200-380 nm) e alta energia e a resposta é analisada em espectrofotômetro. A amostra, para ser observável, deve apresentar estrutura molecular adequada: presença de ligações insaturadas, ou seja, ligações π (duplas ou triplas). Quando a radiação na frequência do UV passa por um composto insaturado, parte dela é absorvida. A absorção é causada pela redução da energia do feixe da radiação quando elétrons em orbitais moleculares de baixa energia são excitados a orbitais moleculares de maior energia. O espectrofotômetro UV-vis mede a intensidade da radiação absorvida a cada comprimento de onda (λ). (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998).

A oxidação de lipídeos, térmica ou fotooxidativa, gera compostos conjugados devido à abstração dos hidrogênios alílicos e dialílicos da molécula do ácido graxo insaturado e deslocamento da dupla ligação formando conjugação. Os dienos conjugados formados pela oxidação dos ácidos graxos insaturados com duas ou mais insaturações tornam a molécula mais estável (SMITH; KING; MIN, 2007), diminuindo a energia de absorção e, portanto, deslocando o comprimento de onda da absorção para valores maiores, na direção do visível (deslocamento batocrômico) ocasionando também um aumento na intensidade da absorção.

Óleos vegetais em seu estado mais puro mostram absorção em 210 nm, devido às ligações duplas isoladas carbono-carbono presentes nos ácidos oléico, linoléico e linolênico e que contribuem para o seu alto grau de insaturação (REDA, 2004). Quando oxidados, os ácidos graxos apresentam insaturações conjugadas que mostram intensa absorção na região de

230 a 270 nm. Os dienos conjugados absorvem em 232 nm e, num estágio mais avançado de oxidação, formam-se compostos secundários que absorvem em 270 nm. Na Tabela 2 está apresentada a absorção máxima dos principais grupos cromóforos de produtos de oxidação.

Tabela 2 – Grupos cromóforos de produtos de oxidação e regiões de absorção no espectro de ultravioleta.

Produtos	Absorção máxima (nm)
Monoenos	190
Dienos	220 - 230
Trienos	265 - 270
Tetraenos	310 - 320
Aldeído cetônico	265 - 280
α - dicetonas	280
α - cetoaldeído	282
β - dicetona	274
Ácido α - cetônico	210

FONTE: ROVELLINI; CORTESI; FEDELI, 1997.

Portanto, quando um óleo é oxidado, o espectro gerado mostra um deslocamento de bandas e aumento da intensidade dos sinais de absorção (A), acusando de imediato que o óleo não está no seu estado mais puro (REDA, 2004).

2.5.2 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN de ^1H)

A técnica de RMN de ^1H está relacionada aos níveis de energia do núcleo do ^1H que resulta quando a amostra é colocada no interior de um campo magnético externo. Esses núcleos, em ambientes diversos, mostram comportamentos químicos diferentes pela diferença

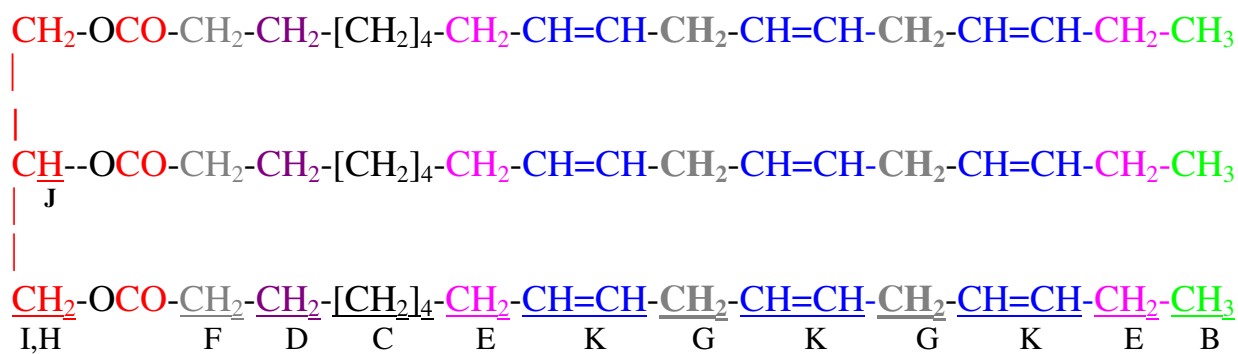
de energia. Essas separações no nível de energia podem ser medidas com muita precisão como frequências usando a transformada de Fourier, a qual monitora a resposta do núcleo após ele ter sido perturbado do seu equilíbrio por um pulso curto e intenso de radiação eletromagnética de radio-frequência.

O espectro de RMN fornece uma série de sinais agudos cujas frequências podem ser relacionadas à natureza química dos átomos de hidrogênios (grupos metil, metilenos, etc.) e cujas intensidades são proporcionais ao número de hidrogênios que produzem o sinal (GUILLÉN; RUIZ, 2001). Esses sinais são representados por multipletes, devido à multiplicidade produzida pelo acoplamento dos hidrogênios. Esse acoplamento ocorre devido à tendência do elétron ligante emparelhar seu spin com o spin do hidrogênio mais próximo. Uma vez que o spin do elétron ligante foi influenciado, o efeito se transmite ao spin do outro elétron ligante, limitando-se a três ligações, exceto quando há tensão no anel ou deslocalização da ligação como nos sistemas conjugados. A multiplicidade é determinada pelo número de hidrogênios vizinhos ao hidrogênio que representa o sinal. Assim, um hidrogênio vizinho produz um dublete; dois hidrogênios vizinhos produzem um triplete, desde que a constante de acoplamento seja a mesma. A multiplicidade é, portanto, de $n + 1$, sendo n o número de hidrogênios vizinhos de mesmo acoplamento (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998).

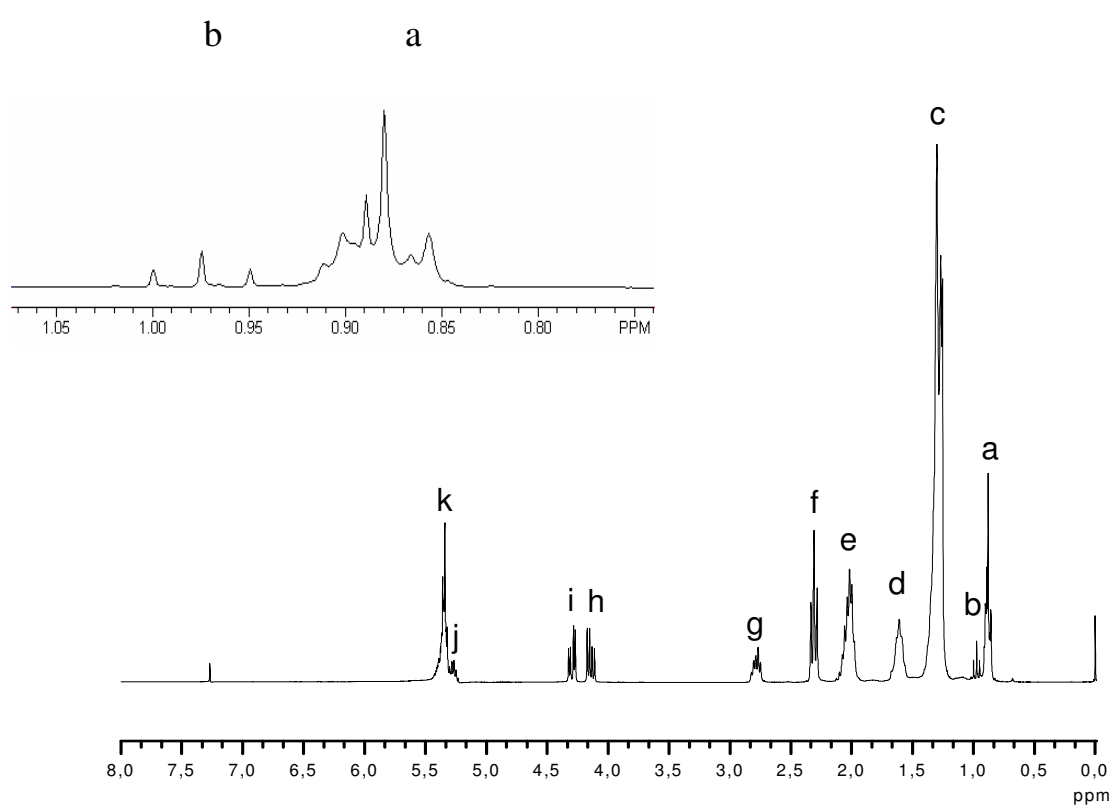
As vantagens dessa técnica na avaliação do grau de oxidação e da estabilidade oxidativa em comparação com as técnicas clássicas como índice de peróxidos é evidente, não somente em relação à simplicidade e rapidez, mas também em relação ao grande número de informações úteis obtidas (GUILLÉN; RUIZ, 2004). Dados quantitativos fornecidos pelos espectros de RMN de ^1H permitem a determinação de diversos parâmetros estruturais como o grau de insaturação dos óleos - indicador do provável desenvolvimento de rancidez, peso molecular médio, índice de saponificação e perfil de ácidos graxos insaturados, rapidamente e

de modo simples, usando diferentes abordagens. O uso de RMN de ^1H no estudo de óleos, gorduras e alimentos que os contêm tem aumentado devido à grande quantidade de informações que a RMN pode oferecer em um curto período de tempo (GUILLÉN; RUIZ, 2001).

O espectro de RMN de ^1H dos triacilgliceróis é bem resolvido, conforme mostrado na Figura 7. Os sinais são distintos, característicos para os hidrogênios olefínicos, do glicerol e alquílicos. Os hidrogênios olefínicos são observados em (δ) 5,26-5,40 ppm (K); os hidrogênios metilênicos do glicerol em (δ) 4,10-4,32 ppm (I+H) [H-1 e H-3]; H-2 o hidrogênio metilênico em (δ) 5,25 ppm (J). Os hidrogênios 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) e sua concentração pode ser diretamente medida a partir do valor da curva de integração. Hidrogênios dialílicos são observados em (δ) 2,90-2,70 ppm (G). Os hidrogênios alílicos são observados em (δ) 2,10-1,90 ppm (E). Hidrogênios α -carboxílicos são observados em (δ) 2,34-2,22 ppm (F). Os hidrogênios β -carboxílicos são observados em (δ) 1,70-1,50 ppm (D). Um cluster de picos sobrepostos em (δ) 1,40-1,15 ppm e centrado em (δ) 1,20 ppm (C) corresponde aos demais prótons metilênicos dos ácidos graxos presentes no triacilglicerol (VIGLI et al., 2003).



1,2,3-tris-linoleato de glicerila

Figura 7 – Espectro de RMN de ^1H de um óleo vegetal.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo monitorar, por espectroscopia de ultravioleta e Ressonância Magnética Nuclear, a qualidade de alguns óleos vegetais submetidos à oxidação térmica e fotooxidativa.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mostrar o potencial das técnicas espectroscópicas no monitoramento da oxidação térmica e fotooxidativa de óleos vegetais;
- Verificar a existência de correlações entre as técnicas titulométricas e as espectroscópicas;
- Avaliar a eficiência de antioxidantes na proteção dos óleos vegetais submetidos à fotooxidação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

Foram utilizados óleos de soja, milho, canola e girassol recém processados cedidos pela Cargill Agrícola S/A e reagentes de grau analítico (pro analysis). Os antioxidantes utilizados foram ácido cítrico, butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), propil galato (PG) e terc-butilhidroquinona (TBHQ). As amostras foram armazenadas em frascos âmbar até o momento dos testes.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo das amostras

Foram preparadas soluções dos antioxidantes BHA, BHT, ácido cítrico, PG e TBHQ em isopropanol na concentração de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Cada antioxidante foi adicionado individualmente em béqueres contendo 50 mL de óleo de soja, milho, canola e girassol, sob agitação, na quantidade de 400, 800 e 1200 μL , de forma a obter uma concentração final de 0,4; 0,8 e 1,2 mmol, respectivamente. Optou-se por estudar os antioxidantes em concentrações molares para se verificar sua eficiência em termos de estrutura química, sendo os valores das concentrações baseados nos valores máximos permitidos pela legislação brasileira (ANVISA, 1988), tomando como base as concentrações molares de cada antioxidante.

4.2.2 Fotoxidação acelerada em câmara de luz fluorescente

Amostras dos óleos sem antioxidante (controle) e com antioxidantes em diversas concentrações foram mantidos durante 60 dias a temperatura ambiente ($28 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$) em câmara de fotoxidação - caixa retangular de 80 cm de comprimento, 60 cm de largura e 35 cm de altura contendo 6 lâmpadas fluorescentes de 20W (OLIVEIRA, 2003), dispostas lateralmente

- que fornecia às amostras uma intensidade luminosa média de 4000 lux (Figura 8). Alíquotas de 4 mL de cada óleo foram retiradas periodicamente (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 e 60 dias) para realização das análises físico-químicas e espectroscópicas.



Figura 8 – Amostras de óleos vegetais durante a fotoxidação.

4.2.3 Oxidação acelerada em estufa (*Schall Oven Test*)

As amostras dos óleos sem antioxidante (controle) e com antioxidantes em concentrações variadas foram estressadas termicamente em estufa a $63 \pm 1^\circ\text{C}$ (OLIVEIRA; REGITANO D'ARCE, 2004) durante 45 dias (Figura 9). Alíquotas de cerca de 4 mL de cada óleo foram periodicamente retiradas (0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 dias) para realização das análises físico-químicas e espectroscópicas.

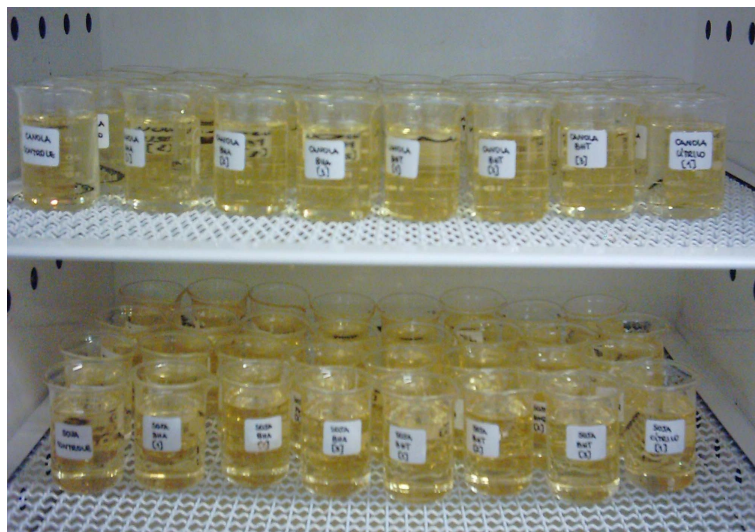


Figura 9 – Amostras de óleos vegetais durante o *Schall Oven Test*.

4.2.4 Análises físico-químicas

4.2.4.1 Índice de acidez

O índice de acidez foi determinado nos óleos termoxidados utilizando-se metodologia da AOCS Ca 5a-40 (1990) modificada. Dissolveu-se 0,5 g de amostra em 15 mL de álcool isopropílico, 1 mL de fenolftaleína (0,1 % em etanol) como indicador, seguido de titulação com hidróxido de sódio 0,01 mol L⁻¹. O volume gasto na titulação indicou o teor de ácidos graxos livres (mg de KOH/g óleo) presentes na amostra, determinado de acordo com a Equação I.

$$A = [V \times f \times 56,1]/m \quad (I)$$

onde:

V = volume da solução de NaOH 0,01 mol L⁻¹ gasto na titulação da amostra (mL);

f = fator de correção da solução de NaOH;

56,1 = equivalente-grama do KOH;

m = massa da amostra em gramas.

4.2.4.2 Índice de peróxidos

O índice de peróxidos foi determinado utilizando-se metodologia da AOCS Cd 8-53 (1990) modificada. Dissolveu-se 0,5 g da amostra em 15 mL solução de ácido acético-clorofórmio 3:2 e 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio (60%), adicionando após 1 minuto 30 mL de água seguido de titulação com solução padrão de tiosulfato de sódio 0,01 mol L⁻¹, utilizando-se solução de amido 1% como indicador. O resultado final foi expresso em mmol de peróxido por 1 kg de amostra calculado pela Equação II:

$$IP = [(B-A) \times M \times f \times 1000]/m \quad (II)$$

onde:

B = volume da solução de tiosulfato de sódio 0,01 mol L⁻¹ gasto na titulação do branco (mL);

A = volume da solução de tiosulfato de sódio 0,01 mol L⁻¹ gasto na titulação da amostra (mL);

M = concentração em mol L⁻¹ da solução de tiosulfato de sódio;

f = fator da solução de tiosulfato de sódio;

m = massa da amostra em gramas.

4.2.5 Análises espectroscópicas

4.2.5.1 Espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-vis)

Foram utilizadas soluções das amostras termo e fotoxidadas em isopropanol, em diluição 1:1000, utilizando-se cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico. Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu modelo MultiSpec 1501, operando na região de 200-800 nm.

4.2.5.2 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H)

Os espectros foram obtidos em espectrômetro Varian modelo Mercuri-300 MHz, operando no modo FT a temperatura ambiente. A concentração das amostras para as análises foi de aproximadamente 10% do óleo em 0,7 mL de CDCl_3 contendo traços de TMS como referência interna, em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro (BELESKI-CARNEIRO; REDA; CARNEIRO, 2005). Os espectros foram obtidos utilizando-se 16K de pontos dados, largura espectral 14 ppm, tempo de aquisição 3,6 s, tempo de relaxação 1,3 s, largura de pulso 45° , número de varreduras 16 e tempo total de aproximadamente 90 s.

4.2.6 Análise estatística

A avaliação dos antioxidantes foi realizada através de um teste *t* de diferença entre pares de observações, pelo qual foi possível verificar a melhor dosagem dentre as utilizadas e o melhor antioxidante, durante fotoxidação, através dos dados de absorbância a 232 nm, visto que não foram realizadas replicatas das amostras analisadas (CENTENO, 2002).

As regressões lineares simples foram realizadas utilizando-se o programa Microsoft Excel 2003 e as regressões múltiplas, o programa Origin 6.1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FOTOXIDAÇÃO

Os espectros dos óleos de soja, milho, canola e girassol das amostras controle (sem antioxidantes), fotoxidadas durante 60 dias, são apresentados nas Figuras 10 a 13 e podem indicar uma medida relativa da degradação oxidativa desses óleos.

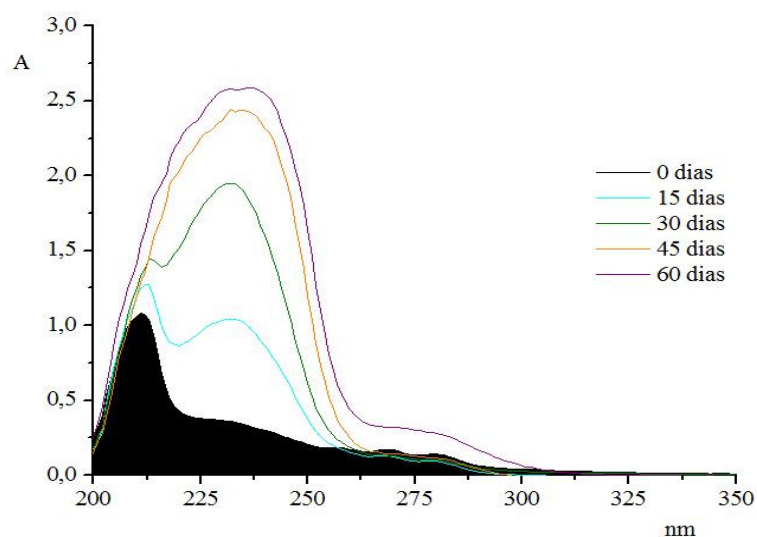


Figura 10 – Espectro UV do óleo de soja durante a fotoxidação.

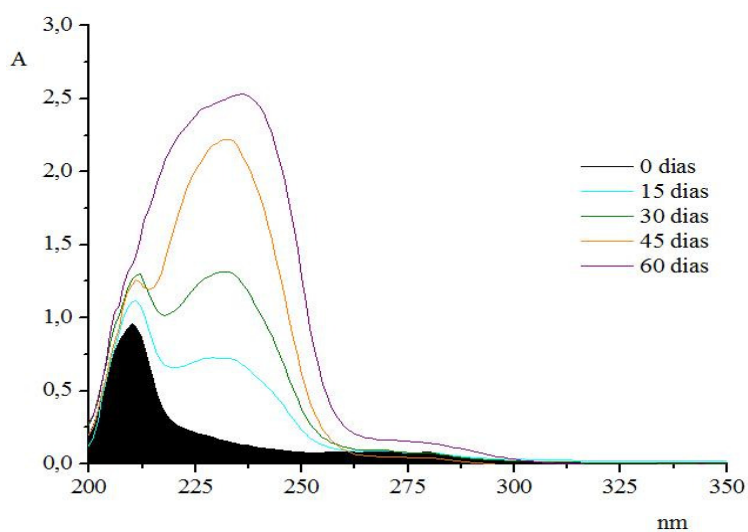


Figura 11 – Espectro UV do óleo de milho durante a fotoxidação.

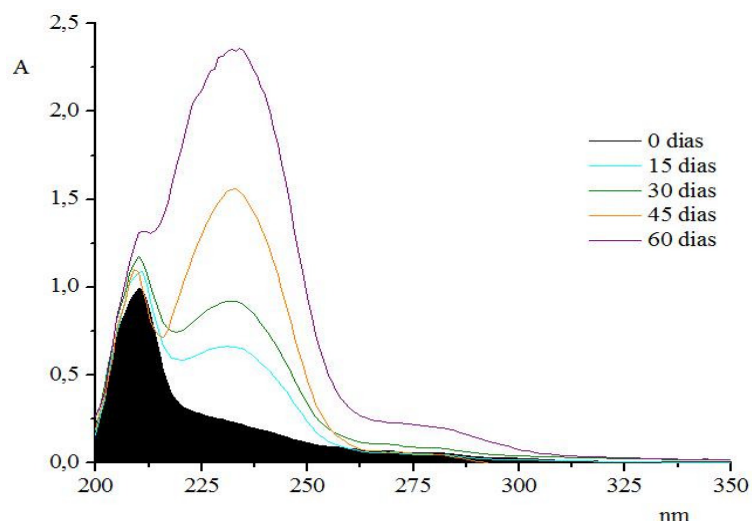


Figura 12 – Espectro UV do óleo de canola durante a fotoxidação.

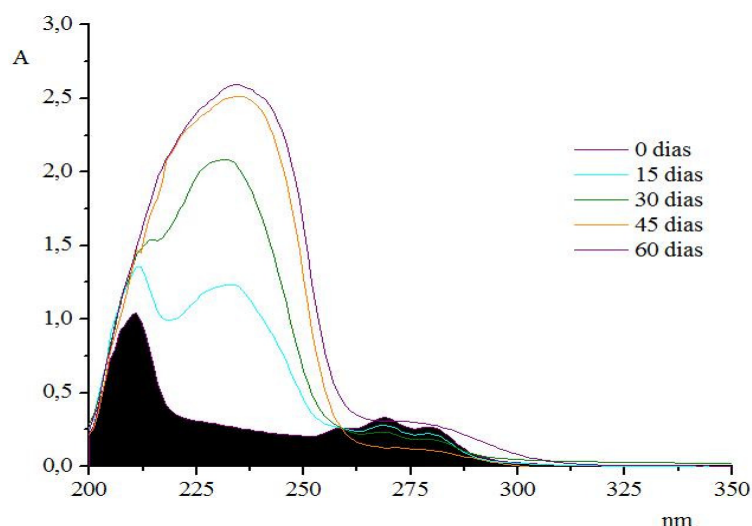


Figura 13 – Espectro UV do óleo de girassol durante a fotoxidação.

Observa-se que há um aumento progressivo da absorbância em 232 nm para todos os óleos estudados à medida que tornam-se mais degradados. Isso indica a formação de duplas ligações conjugadas provenientes da oxidação dos ácidos linolênico e linoléico, presentes em quantidades significativas nos óleos estudados.

Observa-se que não há formação significativa de compostos secundários como aldeídos e cetonas, que absorvem em 265 - 280 nm, o que mostra que a técnica da fotoxidação utilizada foi relativamente branda.

5.1.1 Estabilidade dos óleos vegetais

A Figura 14 apresenta o efeito da fotoxidação no índice de peróxidos das amostras controle durante 60 dias de experimento.

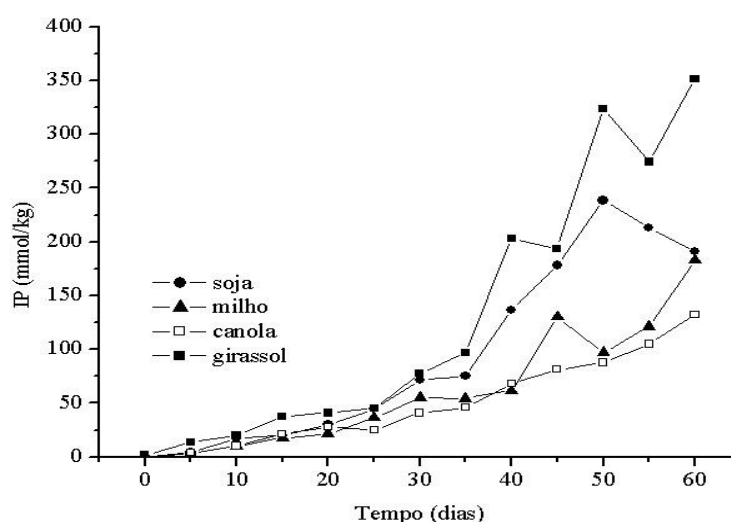


Figura 14 – Índice de peróxidos de óleos vegetais fotoxidados.

A observação da Figura 14 mostra aumento do teor de peróxidos com o tempo de fotoxidação para todos os óleos estudados. A quantidade de peróxidos formados durante a fotoxidação é diretamente proporcional à quantidade de luz absorvida (LUNDBERG, 1962). Porém, esses compostos são instáveis, sendo seus produtos de decomposição os responsáveis pela rancidez oxidativa (FRANKEL, 1985). Com isso, eles devem ser monitorados apenas nos estágios iniciais de oxidação, pois, como é possível observar, o índice aumenta até um determinado nível e depois torna-se instável.

Segundo Berset e Cuvelier (1996), a variação do nível de peróxidos ao longo do tempo ocorre de uma forma gaussiana. Sendo assim, um nível baixo de peróxidos não constitui uma garantia de boa estabilidade oxidativa, podendo, pelo contrário, ser sinônimo de alteração pronunciada.

Sabe-se que a formação de hidroperóxidos coincide com a formação de duplas ligações conjugadas nos ácidos graxos polinsaturados, medida pela absorbância em 232 – 234 nm no espectro de ultravioleta (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1997). Hidroperóxidos dos ácidos linoléico e linolênico contêm dienos conjugados, os quais absorvem radiação ultravioleta. Assim, a medida da absorbância nesse comprimento de onda fornece uma indicação do grau de oxidação lipídica (IRWIN; HEDGES, 2004).

A Figura 15 apresenta a formação de dienos conjugados durante fotoxidação dos óleos.

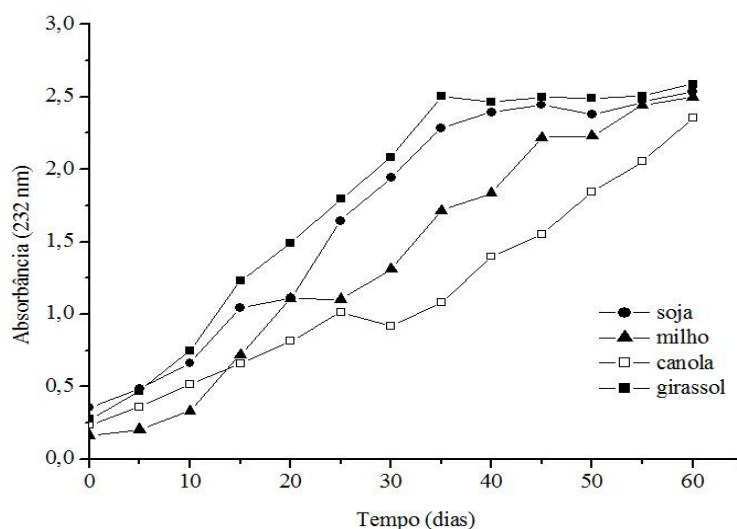


Figura 15 – Formação de dienos conjugados durante a fotoxidação

A análise das Figuras 14 e 15 permite verificar, qualitativamente, que o óleo de canola é o mais estável à fotoxidação, seguido pelo óleo de milho, soja e girassol. Isso porque os óleos apresentam diferente sensibilidade à luz, dependendo de sua composição e dos diferentes tipos de sensibilizadores presentes (GRAVANI, 1986). Valores mais elevados de absorbância para o óleo de canola no início da fotoxidação podem estar relacionados ao alto teor de ácido linolênico quando comparado com os outros óleos.

Óleos com alto teor de ácido oléico (C 18:1, ω -9) ou esteárico (C 18:0) mostram alta estabilidade oxidativa (LIU; SINGH; GREEN, 2002). O óleo de canola, apesar de apresentar um maior teor de ácido linolênico quando comparado com os demais óleos estudados,

apresenta predominância de ácido oléico em sua composição, o que explica sua maior estabilidade ao processo fotoxidativo.

O óleo de milho foi mais estável à fotooxidação que o óleo de soja no estudo de Siqueira (1998). Segundo o autor, o óleo de milho é mais estável devido provavelmente à ausência de fotossensibilizadores, como clorofila, menor teor de ácidos graxos polinsaturados e presença de antioxidantes naturais.

5.1.2 Correlação entre absorbância em 232 nm e índice de peróxidos

Alguns autores relatam problemas relacionados à falta de acurácia na determinação do índice de peróxidos (GRAY, 1978; WARNER; ESKIN, 1995). Os desvios padrão das determinações são baixos quando existe uma baixa concentração de peróxidos na amostra e altos quando há uma alta concentração desses compostos. No último caso, variações de até 10% foram encontradas (GUILLÉN; CABO, 2002). Além disso, o teor de oxigênio no meio reacional pode interferir oxidando o I^- gerando I_2 , que será titulado pelo tiosulfato dando origem ao índice de peróxidos superestimado. Assim, há a necessidade de desaerar o meio reacional e evitar a agitação no decurso da reação. Outro fator prejudicial está relacionado ao ponto final da titulação, que é de difícil visualização quando o nível de peróxidos é baixo, mesmo em presença de indicador (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Em função de todas estas desvantagens, é desejável a aplicação de uma técnica que forneça resultados mais seguros e confiáveis. A análise de dienos conjugados mostra-se como boa alternativa, pois é rápida, simples, requer pouco volume de amostra e não depende de reações químicas para sua determinação.

A observação do comportamento similar dos óleos em relação à formação de peróxidos e dienos conjugados, e sabendo-se que a formação de um está relacionada com a formação do outro, procedeu-se a análise de correlação entre o índice de peróxidos e absorbâncias em 232 nm, apresentadas nas Figuras 16 a 19.

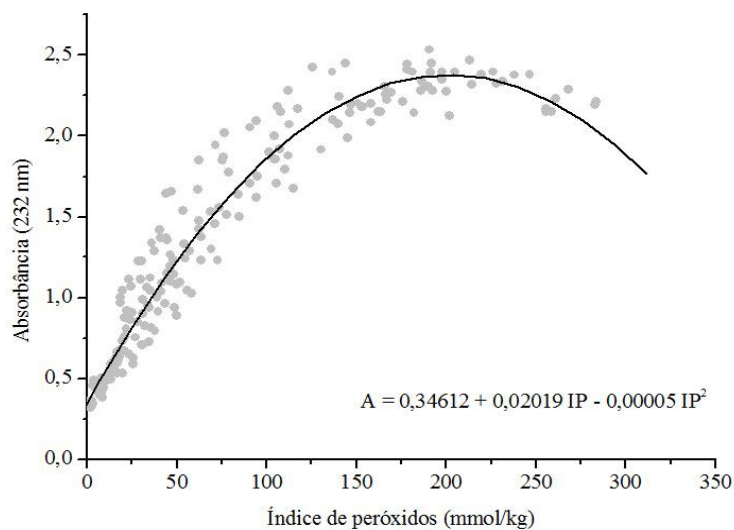


Figura 16 - Regressão polinomial entre absorbância em 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de soja ($r^2 = 0,9447$, $r = 0,9720$, $n = 200$).

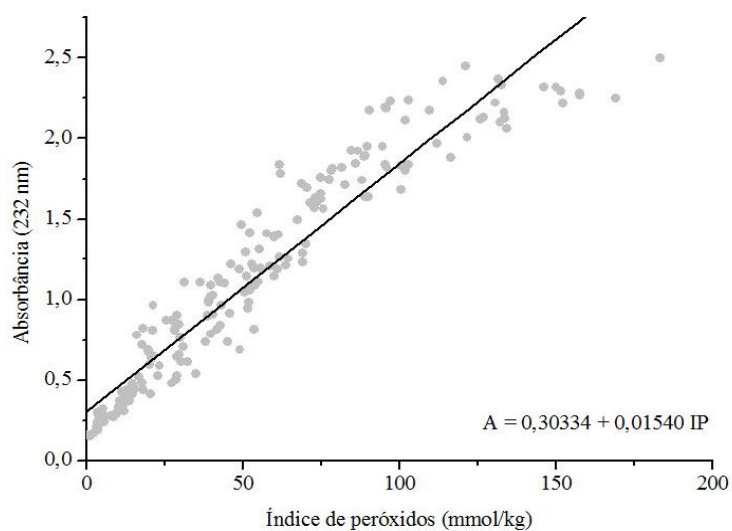


Figura 17 - Regressão linear entre absorbância em 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de milho ($r^2 = 0,9533$, $r = 0,9764$, $n = 200$).

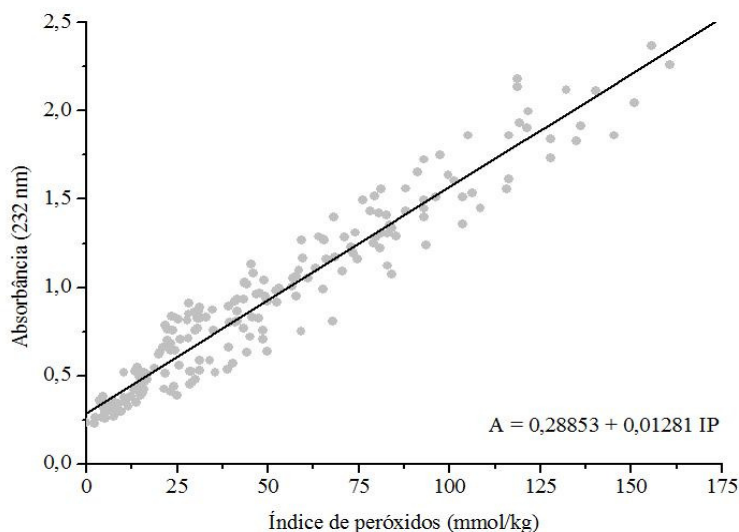


Figura 18 - Regressão linear entre absorbância em 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de canola ($r^2 = 0,9619$, $r = 0,9808$, $n = 200$).

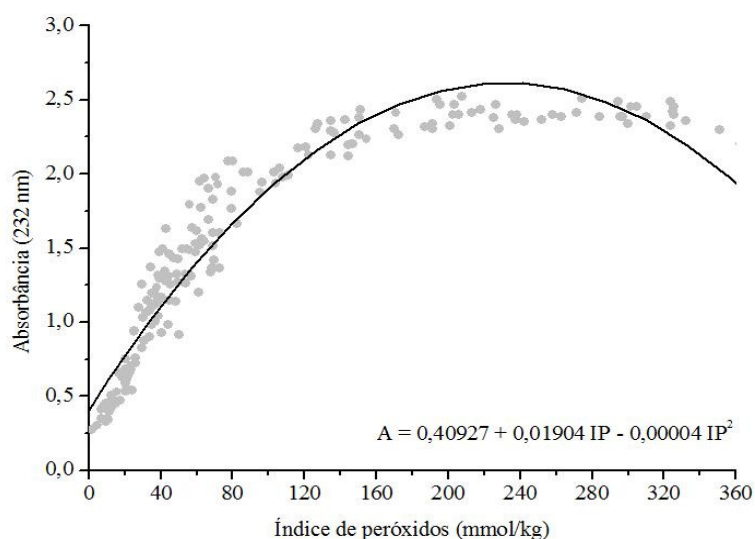


Figura 19 – Regressão polinomial entre absorbância em 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de girassol ($r^2 = 0,9265$, $r = 0,9625$, $n = 194$).

A análise das Figuras 16 a 19 mostra que até 2 unidades de absorbância (UA) o índice de peróxidos se comporta linearmente. Acima de 2 UA observam-se desvios da Lei de Lambert-Beer. Devido a esse comportamento, foram obtidas correlações não-lineares para os óleos de soja e girassol e correlações lineares para os óleos de milho e canola, já que os mesmos apresentaram-se mais estáveis à oxidação.

A análise dos dados mostra que a espectroscopia de ultravioleta é uma análise que pode ser utilizada aliada à técnica convencional de índice de peróxidos, fornecendo

informações sobre o estado oxidativo de óleos vegetais. Assim, substituindo-se o valor máximo permitido pela legislação brasileira (ANVISA, 2005) para índice de peróxidos (5 mmol kg^{-1}) nas equações dos gráficos 16 a 19 verifica-se que o óleo de soja está em condições apropriadas para o consumo até apresentar absorbância máxima de 0,52; o óleo de milho 0,26; canola 0,35 e girassol 0,52 UA, utilizando uma diluição de 1:1000. Com isso, valores de aproximadamente 0,3 a 0,5 de absorbância são aceitáveis para esses óleos.

5.1.3 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

O uso da espectroscopia de RMN de ^1H para o estudo de óleos tem aumentado devido à grande quantidade de informações obtidas em um curto período de tempo (GUILLÉN; RUIZ, 2001).

Alguns autores têm monitorado a oxidação de óleos vegetais por RMN. Prestes et al. (2007) analisaram por RMN a qualidade de óleos utilizados na produção de biodiesel e verificaram que essa técnica pode ser muito útil na seleção de óleos de alta qualidade para produção desse combustível. Wanasundara, Shahidi e Jablonski (1995) compararam metodologias padrão e RMN no estudo da estabilidade oxidativa dos óleos de soja e canola. Conseguiram boas correlações entre as técnicas de índice de peróxidos e R_{oa} , mostrando que a metodologia pode ser utilizada no monitoramento da oxidação de óleos, com vantagens sobre as técnicas clássicas por ser um método rápido, simples e não destrutivo. Guillén e Ruiz (2004) estudaram a estabilidade oxidativa de filés de salmão adicionados ou não de sal por espectroscopia de RMN de ^1H e verificaram a sua vantagem em relação às técnicas clássicas, como o índice de peróxidos e valores de TBA, pelo grande número de informações obtidas.

Vários parâmetros determinados por RMN podem ser utilizados para se obter informações sobre o estado de oxidação dos óleos: o teor de hidrogênios alílicos, dialílicos e vinílicos; o perfil de ácidos graxos insaturados (linolênico, linoléico e oléico) e a razão entre

os hidrogênios olefínicos e alifáticos (R_{oa}). A Tabela 3 apresenta os dados obtidos dos espectros de RMN de 1H dos óleos estudados.

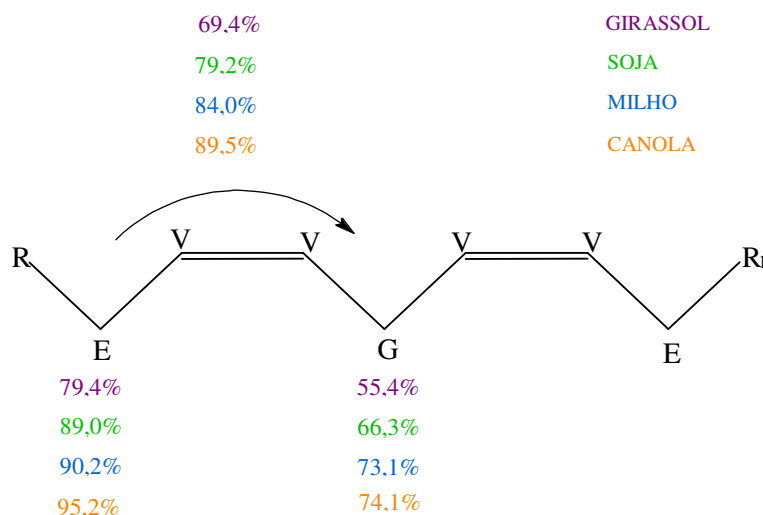
Tabela 3 – Parâmetros estruturais obtidos dos espectros de RMN de 1H de óleos vegetais sob estresse fotooxidativo.

	Girassol		Soja		Milho		Canola	
	0	60	0	60	0	60	0	60
K+J	9,52	7,37	9,23	7,66	8,65	7,39	7,81	7,21
I+H	4,00	4,64	3,89	4,75	4,00	4,24	3,84	4,22
G	3,77	2,09	3,80	2,52	2,90	2,12	2,01	1,49
F	6,11	6,71	5,93	7,18	6,07	6,11	5,82	6,29
E	10,41	8,27	9,86	8,78	10,12	9,13	10,72	10,21
D	6,40	7,57	6,61	6,36	5,55	7,19	6,44	5,89
C	51,27	54,16	51,78	54,00	54,25	54,40	54,57	56,24
B	0,00	0,00	0,81	0,40	0,00	0,00	1,20	0,42
A	8,52	9,19	8,09	8,35	8,46	9,42	7,59	8,03
A+B	8,52	9,19	8,90	8,75	8,46	9,42	8,79	8,45
Σ	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
V	8,98	6,23	8,73	6,91	7,96	6,69	7,37	6,60
R_{oa}	1,05	0,68	0,98	0,79	0,94	0,71	0,84	0,78
Ln	0,00	0,00	0,09	0,05	0,00	0,00	0,14	0,05
L	0,63	0,35	0,45	0,33	0,48	0,35	0,06	0,15
O	0,24	0,34	0,28	0,36	0,36	0,41	0,69	0,65

Os parâmetros estruturais foram obtidos dos espectros integrados de RMN de 1H e calculados conforme descrito por BELESKI-CARNEIRO, REDA e CARNEIRO, 2005. V = hidrogênios vinílicos (olefínicos); Roa = razão entre hidrogênios olefínicos e alifáticos; Ln = concentração de ácido linolênico; L = ácido linoléico; O = ácido oléico; as letras A....K = correspondem aos hidrogênios mostrado na Figura 7.

Na Tabela 3 observa-se que durante o tempo de fotooxidação ocorreu redução gradativa da concentração dos hidrogênios dialfílicos (G), vinílicos (V) e alílicos (E). Calculando-se o teor residual dos hidrogênios nos tempos 0 e 60 dias, determina-se quais hidrogênios foram preferencialmente abstraídos durante a fotooxidação (Figura 20).

Observa-se na Figura 20 que a posição dialfílica (G) é a mais degradada, como indicado pela seta. A análise dos teores residuais dos hidrogênios (E, V, G) confirma que o óleo de canola é o mais resistente a fotooxidação, seguido pelos óleos de milho, soja e girassol.



onde:

V – hidrogênios vinílicos

E – hidrogênios alílicos

G – hidrogênios dialílicos

R – $(CH_2)_nCO_2H$

R_i – $(CH_2)_nMe$

Figura 20 – Fragmento insaturado de um ácido graxo mostrando as posições alílicas (E), vinílicas (V), dialílicas (G) e a fração residual desses hidrogênios após a fotoxidação de 60 dias.

A composição em ácidos graxos insaturados nos óleos tem efeito na sua estabilidade oxidativa (LABUZA, 1971; MIN; BOFF, 2002). O grau de oxidação dos ácidos oléico, linoléico e linolênico é de aproximadamente 1:12:25 (MIN; BOFF, 2002). Pelos dados obtidos neste estudo, pode-se confirmar que o ácido graxo mais susceptível à fotoxidação é o linolênico, o que é facilmente compreendido se for analisada sua estrutura molecular. A presença de 3 duplas ligações e o maior teor de hidrogênios dialílicos, mais susceptíveis à oxidação, o torna mais degradável, seguido pelo ácido linoléico e oléico. Isso explica a maior estabilidade do óleo de canola, rico em ácido oléico, à fotoxidação.

Informações sobre a estabilidade oxidativa dos óleos também podem ser obtidas da quantificação da razão entre hidrogênios olefínicos e alifáticos (R_{oa}) durante os processos oxidativos. Comparando-se os valores iniciais, particulares para cada óleo vegetal devido a diferentes teores de hidrogênios olefínicos e alifáticos, observa-se que esse índice diminui com o tempo de fotoxidação em razão da redução do teor de hidrogênios olefínicos. Pela

análise desse índice, calculando-se o seu valor residual (razão entre o valor final e inicial para cada óleo), pode-se estimar a resistência à oxidação de cada óleo e o quanto desse óleo permanece inalterado. O óleo de soja permaneceu 80,5% inalterado após 60 dias de fotoxidação, contra 75,4% do óleo de milho; 93,1% do óleo de canola e 64,3% do óleo de girassol. R_{oa} confirma que o óleo de canola é o mais resistente frente à fotoxidação e o óleo de girassol é o menos resistente.

5.1.4 Análise de Regressão entre os parâmetros estruturais obtidos por RMN de 1H e índice de peróxidos

Os dados dos espectros de RMN de 1H foram utilizados para ser obter, quantitativamente, os valores residuais correspondentes a cada hidrogênio durante os experimentos de fotoxidação (0, 15, 30, 45 e 60 dias). Os valores residuais dos hidrogênios alílicos (E), vinílicos (V), dialílicos (G) e o índice R_{oa} foram usados nas regressões múltiplas, utilizando-se como variável dependente o índice de peróxidos (IP). Essa abordagem é interessante porque a RMN é uma metodologia rápida e simples para avaliação de alterações oxidativas durante estocagem de óleos vegetais ao contrário da metodologia de quantificação de peróxidos.

Uma boa correlação entre os dados foi obtida ($r^2 = 0,9253$, $r = 0,9619$, $n = 14$) e explicada pela Equação III.

$$IP = 716,32 - 13,91 V + 8,75 E - 1,58 R_{oa} - 0,25 G \quad (III)$$

Na Equação III observa-se que os hidrogênios vinílicos (V) e os alílicos (E) apresentam maior contribuição para a correlação com o índice de peróxidos. Além disso, 92,5% da variância dos dados é explicada por esse modelo de regressão. Dados da análise de

variância mostram que, com 95% de confiança, o modelo de regressão é significativo, pois $F_{\text{calc}} = 27,88 > F_{\text{tab}} = 3,63$.

As correlações múltiplas entre o índice de peróxidos e os dados de UV e RMN ^1H mostram que a fotoxidação é um processo multifatorial, pois diversas variáveis operam simultaneamente na determinação do processo.

5.1.5 Estudo da ação dos antioxidantes durante a fotoxidação

O critério para escolha do melhor antioxidante e da dosagem mais eficiente dentre as estudadas se baseou no teste estatístico de diferença entre pares de observações (CENTENO, 2002). Verificou-se se existia diferença significativa entre as dosagens testadas para cada antioxidante (0,4 mmol; 0,8 mmol e 1,2 mmol) e qual dessas dosagens apresentou o melhor desempenho para cada óleo durante 60 dias de fotoxidação. Os dados para essa análise foram obtidos pelo espectro de UV, absorção em 232 nm (dienos conjugados). Quanto menor a formação de dienos conjugados, melhor a proteção do antioxidante. Quando não houve diferença significativa entre as dosagens, optou-se pela menor concentração.

A melhor dose dos antioxidantes para cada óleo é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 – Dose mais eficiente* de antioxidantes para os óleos vegetais fotoxidados.

	BHA	BHT	ÁC. CIT	PG	TBHQ
Soja	0,40	1,20	0,80	1,20	1,20
Milho	0,40	1,20	0,40	1,20	1,20
Canola	NA	0,80	NA	0,80	1,20
Girassol	0,80	0,40	0,40	0,40	0,40

(*) – em mmol

NA – não adicionar, não produz efeito

A análise da Tabela 4 mostra que maiores dosagens de antioxidantes não implica necessariamente em melhoria da sua eficiência. Para alguns antioxidantes, a menor dose (0,4 mmol) foi mais eficiente, como o BHA para os óleos de soja e milho, BHT para o óleo de

girassol, ácido cítrico para os óleos de milho e girassol e PG e TBHQ para o óleo de girassol. A adição de ácido cítrico e BHA no óleo de canola não mostrou nenhuma melhora em relação à proteção contra a fotoxidação. Sendo assim, considerou-se que é melhor não adicioná-los.

As Tabelas 5 a 8 mostram o comportamento dos óleos vegetais em relação à formação de dienos conjugados, com a melhor dosagem de cada antioxidante.

Tabela 5 – Ação dos antioxidantes na prevenção da formação de dienos conjugados* nos experimentos de fotoxidação do óleo de soja.

	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	Média	Desvio padrão
CONT.	0,358	0,488	0,664	1,042	1,112	1,646	1,945	2,286	2,394	2,443	2,376	2,464	2,533	1,673	0,813
BHA	0,358	0,454	0,625	1,004	1,112	1,228	1,368	1,668	1,665	2,052	2,179	2,363	2,423	1,423	0,707
BHT	0,358	0,423	0,551	0,731	0,848	1,004	1,039	1,242	1,532	1,706	1,854	2,203	2,275	1,213	0,652
AC. CIT.	0,358	0,425	0,600	0,806	0,992	1,153	1,233	1,554	1,897	2,075	2,221	2,394	2,231	1,380	0,728
PG	0,358	0,399	0,498	0,598	0,650	0,706	0,727	0,796	0,914	0,940	0,889	1,025	1,233	0,749	0,253
TBHQ	0,358	0,458	0,489	0,533	0,589	0,708	0,825	1,084	1,378	1,619	0,889	2,192	2,122	1,019	0,625

(*) – absorbância em 232 nm, 0-60 dias

Tabela 6 – Ação dos antioxidantes na prevenção da formação de dienos conjugados* nos experimentos de fotoxidação do óleo de milho.

	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	Média	Desvio padrão
CONT.	0,159	0,207	0,336	0,723	1,108	1,106	1,314	1,715	1,836	2,221	2,228	2,446	2,498	1,377	0,850
BHA	0,159	0,241	0,314	0,779	0,964	1,090	1,220	1,395	1,713	1,816	1,705	2,173	2,354	1,225	0,721
BHT	0,159	0,228	0,321	0,478	0,641	0,707	0,813	0,915	1,197	1,345	1,253	1,709	1,838	0,893	0,545
AC. CIT.	0,159	0,325	0,432	0,691	0,900	1,020	1,088	1,210	1,600	1,740	1,841	2,173	2,291	1,190	0,697
PG	0,159	0,281	0,362	0,417	0,439	0,525	0,480	0,505	0,616	0,613	0,541	0,689	0,737	0,489	0,162
TBHQ	0,159	0,208	0,273	0,285	0,369	0,415	0,526	0,786	0,946	1,085	0,541	1,680	2,008	0,714	0,579

(*) – absorbância em 232 nm, 0-60 dias

Tabela 7 – Ação dos antioxidantes na prevenção da formação de dienos conjugados* nos experimentos de fotoxidação do óleo de canola.

	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	Média	Desvio padrão
CONT.	0,235	0,362	0,518	0,661	0,813	1,016	0,919	1,080	1,398	1,553	1,843	2,053	2,354	1,139	0,662
BHA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BHT	0,235	0,258	0,420	0,545	0,708	0,756	0,932	0,952	1,063	1,160	1,226	1,397	1,258	0,839	0,387
AC. CIT.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PG	0,235	0,299	0,377	0,420	0,470	0,410	0,524	0,560	0,586	0,517	0,569	0,634	0,704	0,485	0,134
TBHQ	0,235	0,267	0,348	0,351	0,425	0,391	0,450	0,524	0,809	0,758	0,641	1,077	1,433	0,593	0,349

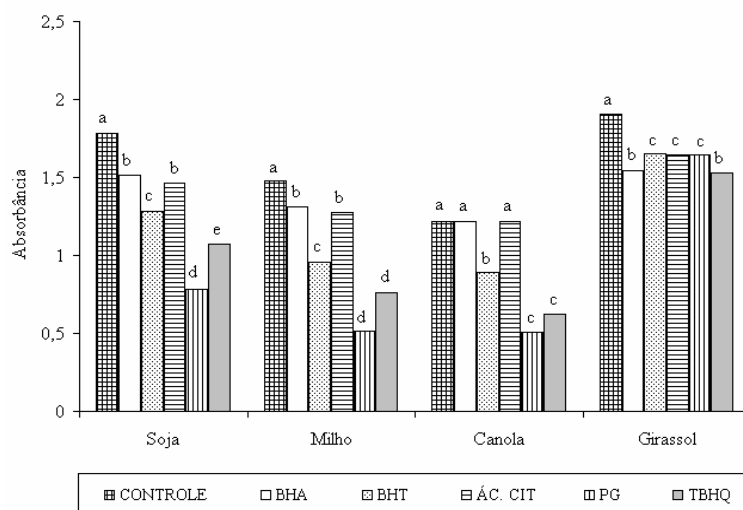
(*) – absorbância em 232 nm, 0-60 dias

Tabela 8 – Ação dos antioxidantes na prevenção da formação de dienos conjugados* nos experimentos de fotoxidação do óleo de girassol.

	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	Média	Desvio padrão
CONT.	0,276	0,469	0,749	1,232	1,491	1,793	2,083	2,502	2,466	2,498	2,490	2,506	2,587	1,780	0,852
BHA	0,276	0,433	0,629	1,033	1,148	1,347	1,428	1,460	1,932	2,087	2,178	2,366	2,468	1,445	0,731
BHT	0,276	0,421	0,707	1,187	1,314	1,494	1,615	1,952	2,130	2,357	2,432	1,725	2,486	1,546	0,744
AC. CIT.	0,276	0,441	0,660	1,105	1,296	1,270	1,564	1,771	2,122	2,276	2,380	2,381	2,451	1,538	0,768
PG	0,276	0,397	0,678	1,041	1,273	1,324	1,604	1,825	2,202	2,197	2,397	2,381	2,389	1,537	0,771
TBHQ	0,276	0,344	0,629	0,942	1,254	1,264	1,422	1,363	2,013	1,987	2,335	2,366	2,389	1,430	0,748

(*) – absorvância em 232 nm, 0-60 dias

Pela análise das Tabelas 5 a 8 pode-se verificar que o antioxidante mais eficiente, ou seja, o que proporcionou uma menor média em relação aos valores de absorvância a 232 nm e menor desvio padrão foi o propil galato (PG). Em virtude de um aumento repentino nos últimos dias de oxidação, o TBHQ proporcionou um desvio padrão nem sempre compatível com os resultados da média. Na Figura 21 estão apresentadas as médias obtidas pelos antioxidantes para cada óleo estudado, em relação à formação de dienos conjugados.



Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si a 5% de significância

Figura 21 – Efeito dos antioxidantes na formação de dienos conjugados durante a fotoxidação dos óleos de soja, milho, canola e girassol.

Na Figura 21 pode-se observar que para o óleo de soja o antioxidante mais eficiente foi o PG. Para o óleo de milho, os antioxidantes PG e TBHQ demonstraram a mesma

eficiência na mesma dosagem (1,2 mmol) e foram mais eficientes que os outros antioxidantes estudados. No óleo de canola, a adição dos antioxidantes BHA e ácido cítrico não foi eficiente na prevenção da fotoxidação, visto que seus resultados não diferiram significativamente dos resultados obtidos para a amostra controle. O PG na dosagem de 0,8 mmol não mostrou diferença significativa ao TBHQ a 1,2 mmol, com relação à eficiência. Isso mostra que o PG é mais eficiente nesse caso, pois necessita de uma menor dosagem. No óleo de girassol, nenhum dos antioxidantes se destaca na proteção contra a oxidação. Uma melhor eficiência foi obtida pelo BHA (0,8 mmol) e TBHQ (0,4 mmol), sendo o TBHQ mais eficiente em razão de sua menor dosagem.

A atividade dos antioxidantes fenólicos é determinada pelos grupos funcionais presentes, principalmente hidroxilas, pela posição que ocupam no anel aromático e pelo tamanho da cadeia alquílica. A conjugação do par de elétrons não ligante da hidroxila com o sistema π do anel aromático ativa fortemente as posições *orto* e *para*. Do mesmo modo, os grupos alquila, por efeitos hiperconjugativos, são ativadores fracos das posições *orto* e *para*, o que favorece a deslocalização do elétron e estabilização do radical fenoxil formado nos processos de oxidação (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992; RAJALAKSHMI; NARASIMHAN, 1995; JADHAV et al., 1996; LITWINIENKO; KASPRZYCKA-GUTTMAN; JAMANEK, 1999). Nos processos termoxidativos e autoxidativos, que ocorrem via radicais livres, os antioxidantes igualmente agem como doadores de hidrogênio aos radicais lipídicos, estabilizando-os.

A observação dos dados permite concluir que o PG é o antioxidante mais eficiente na proteção de óleos vegetais sob estresse fotoxidativo. Sua estrutura molecular pode justificar esse desempenho. A presença de três hidroxilas no anel aromático disponibiliza até 3 hidrogênios para serem abstraídos pelo oxigênio singlete. Agindo como fonte de até 3

hidrogênios, protege melhor os óleos vegetais. Isso também explica o péssimo desempenho do ácido cítrico na prevenção da fotoxidação.

Embora sem propriedades antioxidantes, quelantes de metais como o ácido cítrico agem sinergicamente se utilizado com os antioxidantes primários (compostos fenólicos), produzindo uma atividade antioxidante mais pronunciada (GORDON; WENG, 1992). Ao quelar com metais (pró-oxidantes por doação de elétrons e alteração do estado de oxidação) indisponibilizando-os, o ácido cítrico mostra sinergia na presença de antioxidantes como o TBHQ (RAMALHO; JORGE, 2006).

A eficiência dos antioxidantes durante a fotoxidação pode ser classificada da seguinte forma: PG > TBHQ > BHT > BHA > ácido cítrico. A melhor eficiência do PG provavelmente decorra por possuir 3 hidroxilas, seguido pelo TBHQ com 2 hidroxilas, o BHT com 1 hidroxila e 1 metila na posição *para* que o torna mais eficiente que o BHA (1 hidroxila), seguido pelo ácido cítrico (não aromático), o menos eficiente nesse processo. Porém, a legislação brasileira (ANVISA, 1988) permite a adição de somente 100 ppm de PG (0,47 mmol) para utilização em óleos vegetais e sua dosagem mais eficiente foi superior a essa exigência para todos os óleos estudados. Devido a restrições legais quanto ao PG, o TBHQ (máximo 200 ppm ou 1,2 mmol) foi definido como o antioxidante mais viável para ser utilizado em óleos vegetais nos processos fotoxidativos, pois além de apresentar um excelente desempenho quando comparado com os outros antioxidantes, esse desempenho ocorreu numa dosagem permitida pela legislação brasileira.

Segundo Sherwin (1985), o TBHQ é mais eficiente que o BHA e BHT, por possuir dois grupos hidroxila e não tem impedimento estérico. TBHQ também foi o melhor antioxidante no estudo realizado por Almeida-Doria e Regitano D'Arce (2000) com óleo de soja após 5 e 7 dias a 63°C, quando comparado com extratos etanólicos de alecrim e orégano e mistura de BHA e BHT. Pesquisas indicam o TBHQ como o mais efetivo inclusive sob altas

temperaturas, mas os antioxidantes naturais demonstraram ter melhor efetividade que BHA e BHT, como os extratos de orégano, alecrim e gergelim para óleo de soja; extrato de gergelim, ácidos clorogênico, gálico, protocatequínico e caféico para óleo de girassol; ascorbil palmitato e extrato de alecrim para óleo de canola; e ácido caféico para óleo de oliva (RAMALHO; JORGE, 2006). Iqbal e Bhanger (2007) concluíram em seus estudos que o extrato de alho (1000 ppm) é mais efetivo na proteção do óleo de girassol submetido à estocagem acelerada a 65°C do que BHA e BHT.

Há pouca informação quantitativa disponível sobre a influência de antioxidantes na fotoxidação de lipídeos. Segundo Yasaei et al. (1996), antioxidantes fenólicos apresentam baixa efetividade na proteção contra fotoxidação, pois alguns desses compostos podem ser degradados pela luz. Além disso, não devem atuar com doação de hidrogênios quando o mecanismo de oxidação é fotoquímica, visto que não há formação de radicais livres. No entanto, Oliveira e Regitano D'Arce (2004) verificaram que a adição de TBHQ no óleo de milho durante a fotoxidação por 7 dias promoveu a proteção desse óleo e, neste estudo, essa proteção foi observada pela maioria dos antioxidantes. Isso confirma que os antioxidantes primários podem desempenhar um papel importante na proteção de óleos contra a fotoxidação.

5.2 TERMOXIDAÇÃO

A autoxidação é a principal forma de oxidação dos óleos vegetais. Consiste em uma complexa série de reações químicas e é caracterizada pela diminuição no teor de insaturação total do óleo por causa da degradação oxidativa que se inicia pela abstração do hidrogênio adjacente à dupla ligação, formando radicais livres (NAZ et al., 2004), diferente do que acontece na fotoxidação.

Os ácidos graxos insaturados são relativamente estáveis à oxidação a temperaturas abaixo de 60°C, mas oxidam em temperaturas maiores (JELÉN et al., 2000). Nas Figuras 22 a 25 está apresentado o comportamento dos óleos vegetais estudados quando submetidos à oxidação térmica.

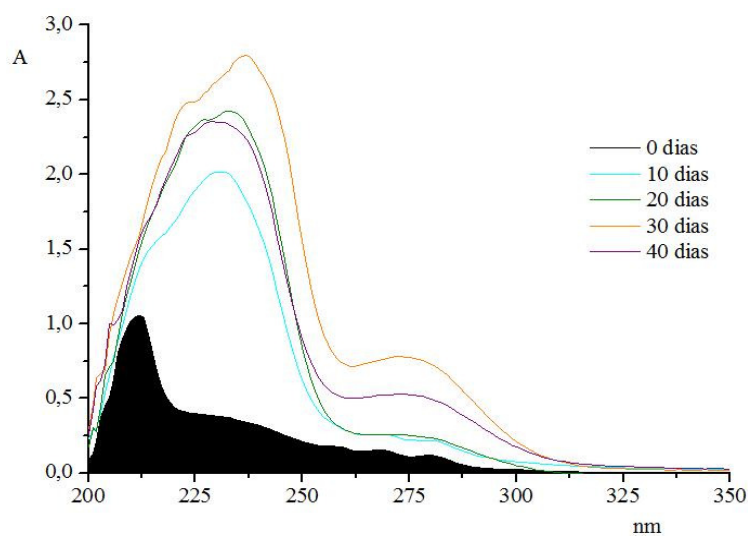


Figura 22 – Espectro UV do óleo de soja durante a termoxidação.

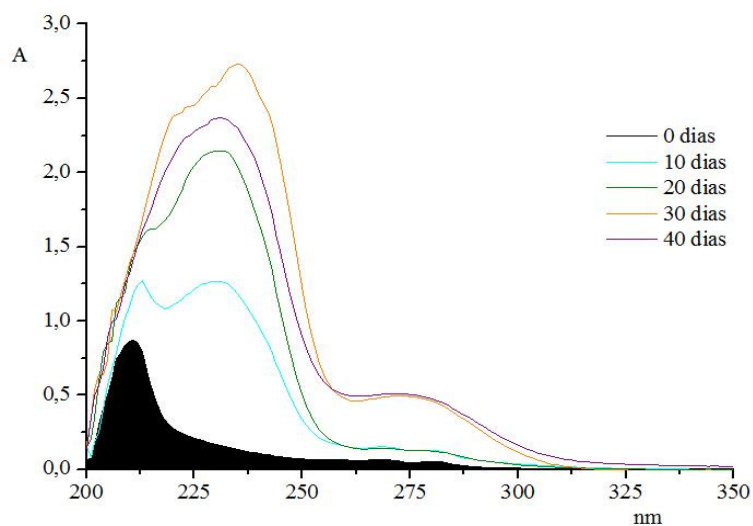


Figura 23 – Espectro UV do óleo de milho durante a termoxidação.

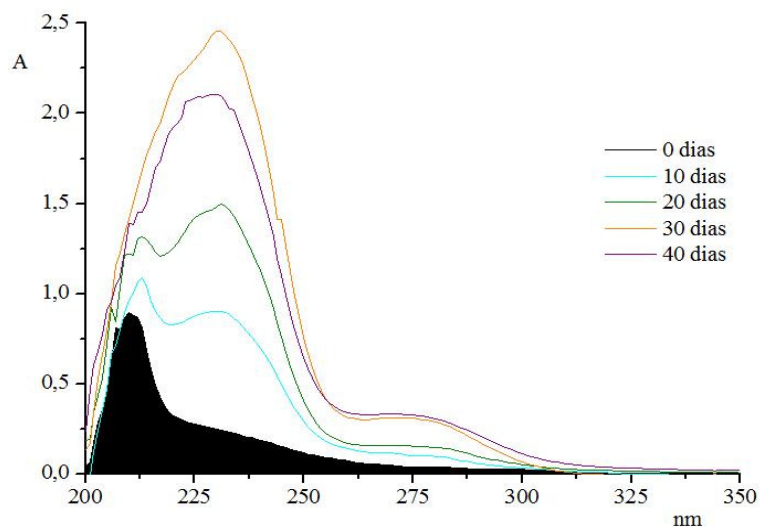


Figura 24 – Espectro UV do óleo de canola durante a termoxidação.

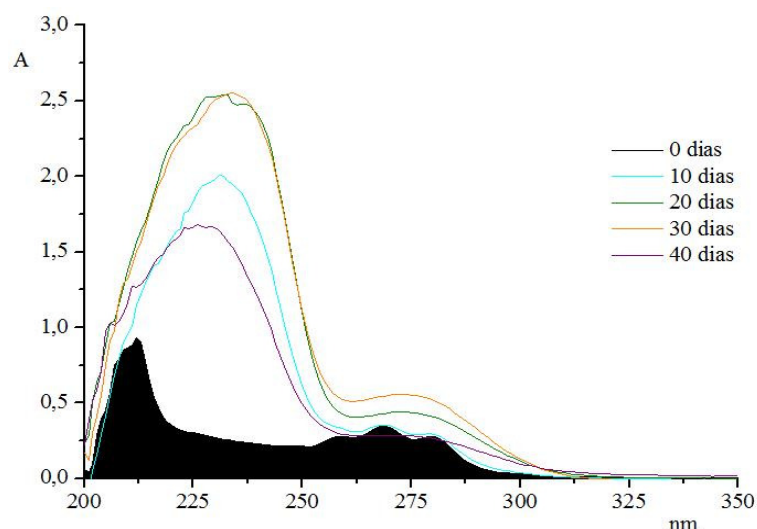


Figura 25 – Espectro UV do óleo de girassol durante a termoxidação.

Observa-se que, para todos os óleos estudados, há um aumento da absorvância na região de 232 nm, significando a formação intensa de dienos conjugados e, diferentemente da fotoxidação, há aumento da absorvância na região de 270 nm, que corresponde a compostos secundários de oxidação e trienos conjugados. Isso ocorre pois os peróxidos formados na fase inicial de oxidação são extremamente instáveis ao calor, dando origem, mais rapidamente que na fotoxidação, a compostos secundários como aldeídos e cetonas.

Além disso, para todos os óleos estudados, a absorbância em 232 nm com 35 dias de oxidação é maior que com 40 dias. Maior tempo de exposição ao calor degrada peróxidos e dienos conjugados, provoca hidrólise, formação de polímeros e outros compostos.

A termoxidação foi realizada durante 45 dias. Porém, no último dia os óleos polimerizaram, impossibilitando a realização das análises de rotina: índice de peróxidos, acidez e espectroscopia no UV. Das técnicas utilizadas, somente a RMN de ^1H permitiu a análise desses óleos.

5.2.1 Estabilidade dos óleos vegetais

De acordo com Rovellini, Cortesi e Fedeli (1997), a velocidade de oxidação de compostos polinsaturados com grupos metilênicos adjacentes a ligações duplas (sistema alila) é maior que nos compostos que apresentam apenas uma dupla ligação, pois o grupamento metilênico é ativado pelas duplas ligações adjacentes, aumentando assim a velocidade de reação à oxidação.

Na termoxidação observou-se o mesmo comportamento da fotoxidação em relação à estabilidade dos óleos. Isso pode ser verificado nas Figuras 26 e 27.

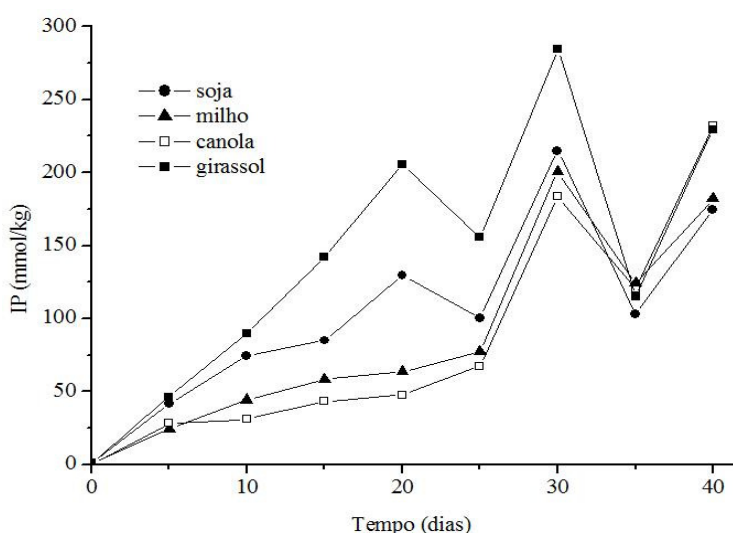


Figura 26 – Índice de peróxidos de óleos vegetais termoxidados.

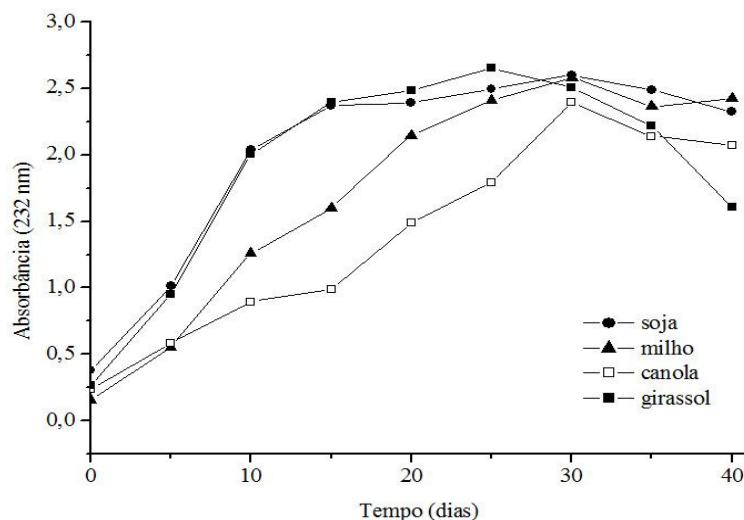


Figura 27 – Formação de dienos conjugados durante a termoxidação.

Verifica-se que na termoxidação a formação de peróxidos é rápida, assim como sua degradação. Observa-se também o aumento gradativo do teor de dienos conjugados. Qualitativamente, pode-se verificar que na termoxidação, assim como na fotoxidação, o óleo de canola é o mais estável, seguido pelo óleo de milho, soja e girassol. Reda (2004) encontrou essa mesma relação quando submeteu óleos de soja, milho, canola, girassol e oliva ao aquecimento a 180°C, 8 horas por dia durante 10 dias.

5.2.2 Correlação entre absorbância em 232 nm e índice de peróxidos

A relação entre índice de peróxidos e absorbância em 232 nm foi investigada na termoxidação (Figuras 28-31). Devido aos possíveis desvios da Lei de Lambert-Beer, utilizou-se os dados até 2 unidades de absorbância, o que implica em variação do número de amostras de cada óleo utilizadas na construção dos modelos de regressão.

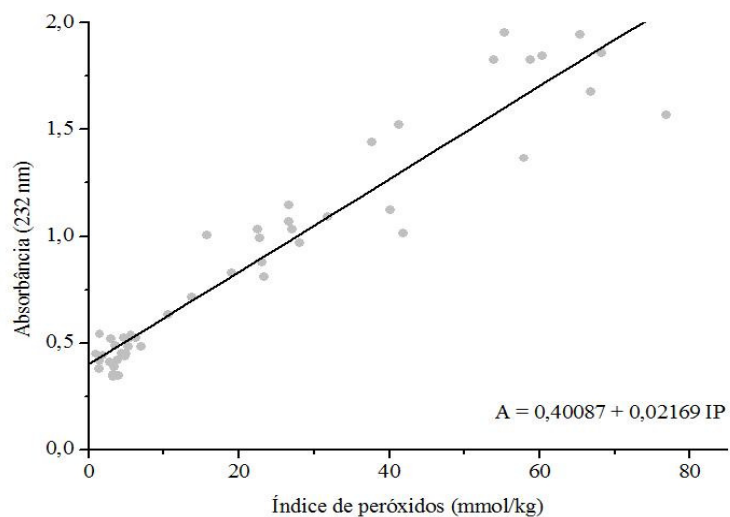


Figura 28 - Regressão linear entre absorbância em 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de soja durante a termoxidação ($r^2 = 0,9162$; $r = 0,9572$; $n = 49$).

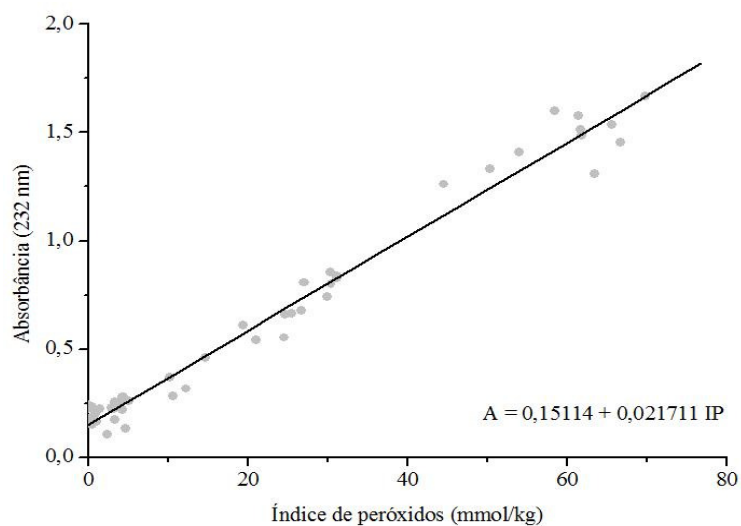


Figura 29 - Regressão linear entre absorbância em 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de milho durante a termoxidação ($r^2 = 0,9779$; $r = 0,9889$; $n = 51$).

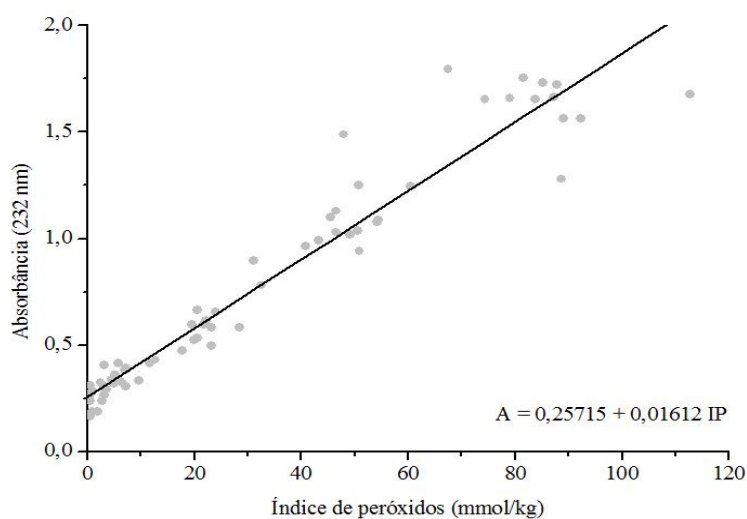


Figura 30 - Regressão linear entre absorbância em 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de canola durante a termoxidação ($r^2 = 0,9370$; $r = 0,9680$; $n = 68$).

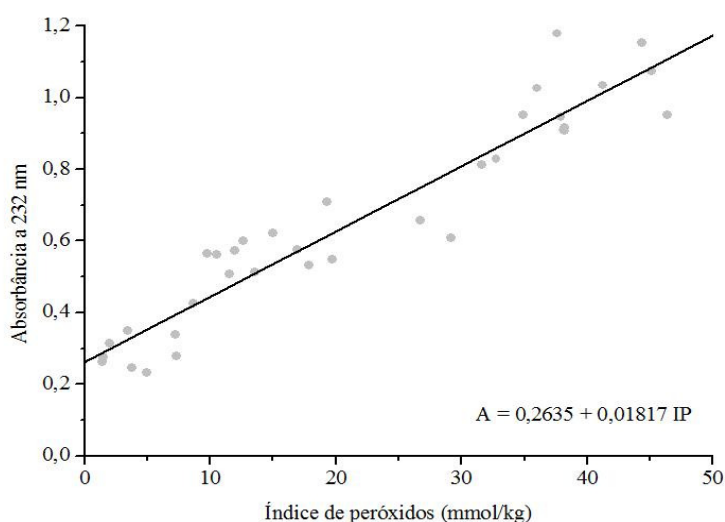


Figura 31 - Regressão linear entre absorbância em 232 nm e índice de peróxidos para o óleo de girassol durante a termoxidação ($r^2 = 0,9168$; $r = 0,9575$; $n = 35$).

Conforme pode-se verificar, foram obtidas ótimas correlações para todos os óleos, confirmando a relação entre essas duas técnicas analíticas. Substituindo o valor máximo de índice de peróxidos permitido pela legislação brasileira (ANVISA, 2005) obteve-se o valor máximo de absorbância no qual os óleos estão apropriados para o consumo, encontrando-se 0,51 para o óleo de soja, 0,26 para o de milho, 0,34 para o de canola e 0,35 para o de girassol. Esse valores são semelhantes aos obtidos nos experimentos de fotoxidação: valores entre 0,3 a

0,5 UA são aceitáveis para óleos vegetais de boa qualidade. Essa observação reforça a hipótese de que a espectroscopia de ultravioleta pode ser utilizada no controle de qualidade de óleos vegetais.

Wanasundara, Shahidi e Jablonski (1995) obtiveram excelentes correlações entre índice de peróxidos e dienos conjugados para o óleo de canola ($r = 0,997$) e soja ($r = 0,989$) durante *oven test* (65°C/30 dias). Vieira e Regitano D'Arce (2001) também obtiveram boa correlação para o óleo de canola durante *oven test*, adicionado de diferentes antioxidantes ($r = 0,995$), assim como Wanasundara e Shahidi (1994), que obtiveram um coeficiente de correlação de 0,966 a 0,997 para o mesmo óleo sujeito ao *oven test* a 65°C por 17 dias. Com isso, sugerem que os valores de dienos conjugados podem ser usados como um índice de estabilidade de óleos e alimentos gordurosos. Regitano D'Arce (1998) obteve um coeficiente de correlação de 0,9182 para óleo de castanha-do-pará estocado durante 120 dias a temperatura ambiente.

5.2.3 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

Várias técnicas químicas, instrumentais e sensoriais são utilizadas para monitorar a oxidação e prever a vida de prateleira de óleos vegetais e alimentos que os contêm (GORDON, 2001). A técnica de espectrometria de RMN de ^1H , ao contrário das técnicas clássicas, permite fazer uma estimativa rápida da qualidade dos óleos, pela análise dos valores obtidos da curva de integração que fornece informações quantitativas da população de hidrogênios que gerou cada sinal. RMN de ^1H foi a única técnica, dentre as estudadas, que permitiu a análise dos óleos polimerizados, após 45 dias de termoxidação. Isso mostra que a técnica é sensível, precisa e superior.

Na Tabela 9 estão apresentados os parâmetros estruturais obtidos dos espectros de RMN de ^1H após 45 dias de oxidação acelerada em estufa.

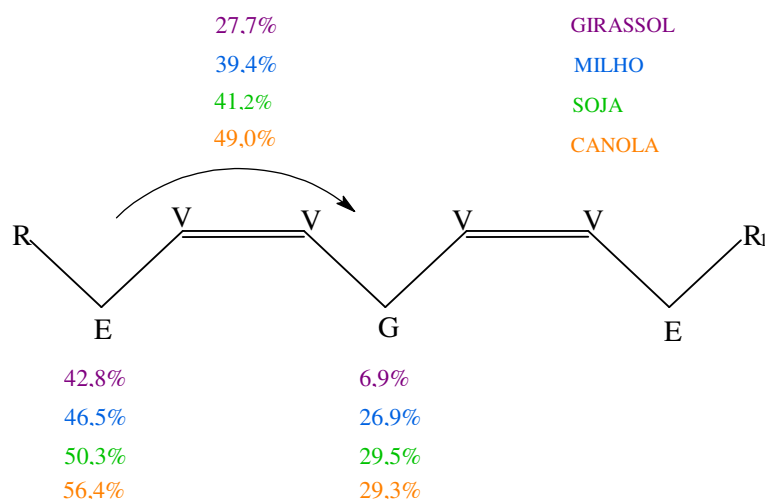
Tabela 9 – Parâmetros estruturais obtidos dos espectros de RMN de ^1H de óleos vegetais sob estresse termoxidativo.

	Girassol		Milho		Soja		Canola	
	0	45	0	45	0	45	0	45
K+J	9,52	3,13	8,65	3,79	9,23	4,26	7,81	4,23
I+H	4,00	4,77	4,00	5,20	3,89	5,34	3,84	5,01
G	3,77	0,26	2,90	0,78	3,80	1,12	2,01	0,59
F	6,11	8,35	6,07	7,37	5,93	7,37	5,82	6,90
E	10,41	4,46	10,12	4,71	9,86	4,96	10,72	6,05
D	6,40	68,64	5,55	69,42	6,61	68,28	6,44	68,96
C	51,27		54,25		51,78		54,57	
B	0,00	0,00	0,00	0,00	0,81	0,00	1,20	0,00
A	8,52	10,39	8,46	8,73	8,09	8,67	7,59	8,26
A+B	8,52	10,39	8,46	8,73	8,90	8,67	8,79	8,26
Σ	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00
V	8,98	2,49	7,96	3,14	8,73	3,60	7,37	3,62
R_{oa}	1,05	0,24	0,94	0,36	0,98	0,42	0,84	0,44
Ln	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,00	0,14	0,00
L	0,63	0,04	0,48	0,13	0,45	0,19	0,06	0,10
O	0,24	0,33	0,36	0,26	0,28	0,23	0,69	0,41

Os parâmetros estruturais foram obtidos dos espectros integrados de RMN de ^1H e calculados conforme descrito por BELESKI-CARNEIRO, REDA e CARNEIRO, 2005. V = hidrogênios vinílicos (olefínicos); R_{oa} = razão entre hidrogênios olefínicos e alifáticos; Ln = concentração de ácido linolênico; L = ácido linoléico; O = ácido oléico; as letras A....K = correspondem aos hidrogênios mostrados na Figura 7.

O monitoramento da concentração dos hidrogênios olefínicos (vinílicos) permite uma estimativa rápida da qualidade dos óleos estudados. Observa-se que houve redução da concentração dos hidrogênios vinílicos (V), dialfílicos (G) e alfílicos (E), implicando que o grau de insaturação dos óleos é afetado na termoxidação. Observa-se também o decréscimo do teor de ácido linolênico dos óleos de soja e canola, cuja concentração é zero após 45 dias de termoxidação. Da mesma forma, há redução do teor de ácido linoléico e, num menor grau, do ácido oléico.

Na Figura 32 é mostrado o teor residual dos principais hidrogênios da molécula de triacilglicerol após 45 dias de termoxidação. Pode-se observar que, assim como ocorre na fotoxidação, os hidrogênios preferencialmente abstraídos durante o processo da termoxidação foram os dialfílicos (G), seguido pelos vinílicos (V) e alfílicos (E), justificando, assim, a maior instabilidade do ácido linolênico à termoxidação.



onde:

V – hidrogênios vinílicos

E – hidrogênios alílicos

G – hidrogênios dialílicos

R – $(CH_2)_nCO_2H$

R₁ – $(CH_2)_nMe$

Figura 32 – Fragmento insaturado de um ácido graxo mostrando as posições alílicas (E), vinílicas (V), dialílicas (G) e a fração residual desses hidrogênios após a termoxidação de 45 dias.

O monitoramento do índice R_{oa} permite a análise da estabilidade de cada óleo. A razão entre o valor inicial e final torna possível verificar que, após 45 dias de termoxidação, o óleo de soja degradou 57,1%, contra 61,7% do óleo de milho, 47,6% do óleo de canola e 77,1% do óleo de girassol. Esse perfil também é observado pela análise dos hidrogênios residuais na Figura 32.

Assim, a estabilidade térmica dos óleos estudados apresentou a seguinte ordem: canola > soja > milho > girassol. Os óleos estudados mostram comportamento análogo nos experimentos de termoxidação e fotoxidação monitorados por espectroscopia de ultravioleta e RMN de 1H .

Smith, King e Min (2007) verificaram que a composição em ácidos graxos interfere diretamente na estabilidade dos óleos quando compararam a estabilidade oxidativa do óleo de girassol geneticamente modificado com óleos de milho, soja e girassol tradicional em

temperaturas de 55°C e 185°C. O óleo de girassol modificado contém 87,4% de ácido oléico (70% a mais que o tradicional) e 5,45% de ácido linoléico (60% a menos que o original). O óleo modificado foi o mais estável, seguido pelo óleo de milho, soja e girassol tradicional.

5.2.4 Análise de Regressão entre os parâmetros estruturais obtidos por RMN de ^1H e índice de peróxidos

O índice de peróxidos não é uma técnica que permite verificar o real estado da termoxidação dos óleos, devido à natureza transitória desses compostos e sua sensibilidade frente a altas temperaturas. O valor de índice de peróxidos passa por um máximo e depois decresce com o tempo de aquecimento, implicando que um baixo valor não significa necessariamente boa qualidade do óleo. Com isso, há o interesse no desenvolvimento de métodos alternativos para quantificação da oxidação de óleos vegetais.

Os valores residuais dos hidrogênios alílicos (E), vinílicos (V), dialílicos (G) e o índice R_{oa} , obtidos dos espectros de RMN de ^1H foram usados na regressão múltipla, utilizando-se como variável dependente o índice de peróxidos (IP).

Uma excelente correlação entre os dados foi obtida ($r^2 = 0,9905$, $r = 0,9952$, $n = 11$) conforme a equação IV.

$$\text{IP} = 611,56 + 45,29 \text{ V} - 19,12 \text{ E} - 18,98 \text{ G} - 13,22 \text{ R}_{\text{oa}} \quad (\text{IV})$$

A Equação IV mostra que os hidrogênios vinílicos (V) são os que apresentam maior contribuição para a correlação, seguido dos hidrogênios dialílicos e alílicos. 99,0% da variância dos dados é explicada por esse modelo de regressão. Os dados da análise de variância mostram que, com 95% de confiança, o modelo de regressão é significativo, pois $F_{\text{calc}} = 156,83 > F_{\text{tab}} = 4,53$.

A RMN de ^1H pode ser utilizada na obtenção do índice de peróxidos, pois excelentes correlações foram obtidas entre os dados para essas duas técnicas.

5.2.5 Análise de Regressão entre os parâmetros estruturais obtidos por RMN de ^1H e índice de acidez

Dentre os diversos métodos analíticos utilizados para avaliar a qualidade dos óleos e gorduras termoxidadas está a determinação do índice de acidez. Esse índice revela o estado de conservação do óleo, assim como a hidrólise e decomposição do triacilglicerol que é acelerada pelo aquecimento. É uma técnica volumétrica que está sujeita a erros, assim como o índice de peróxidos, em virtude da dificuldade na visualização do ponto final da titulação.

Foi realizada uma regressão múltipla, utilizando os dados de valores residuais dos hidrogênios alílicos (E), vinílicos (V), dialílicos (G) e o índice R_{oa} , tendo como variável dependente a acidez (A).

Uma excelente correlação entre os dados foi obtida ($r^2 = 0,9918$, $r = 0,9959$, $n = 11$) conforme a equação V.

$$A = 13,70 - 0,33 V + 0,11 R_{oa} + 0,11 G - 0,02 E \quad (V)$$

A Equação V mostra que os hidrogênios vinílicos (V) são os que apresentam maior contribuição para a correlação sendo que 99,2% da variância dos dados é explicada por esse modelo de regressão. Dados da análise de variância indicam que, com 95% de confiança, o modelo de regressão é significativo, pois $F_{calc}=181,87 > F_{tab} = 4,53$.

Assim, verifica-se que o índice de acidez pode ser determinado por RMN de ^1H .

6. CONCLUSÕES

- A espectroscopia de ultravioleta é uma análise eficiente no monitoramento da qualidade de óleos vegetais sob estresse fotooxidativo ou termoxidativo, podendo ser utilizada como análise de rotina, com vantagens sobre a determinação de peróxidos, devido à confiabilidade nos resultados, rapidez e facilidade de execução.
- A espectrometria de RMN ^1H é uma ferramenta excelente para mostrar alterações estruturais e pode ser utilizada na verificação do real estado de oxidação de óleos sob estresse fotooxidativo ou termoxidativo pelo grande número de informações obtidas.
- Em óleos vegetais, os espectros de RMN ^1H demonstraram que as posições mais susceptíveis à fotooxidação e à termoxidação são aquelas contendo hidrogênios dialílicos, vinílicos e alílicos, respectivamente.
- As análises quantitativas de RMN de ^1H mostraram que a estabilidade dos ácidos graxos insaturados decresce na seguinte ordem: oléico, linoléico e linolênico, respectivamente.
- O parâmetro R_{oa} é um importante índice do estado de oxidação de óleos vegetais, confirmando que o óleo de canola é o mais resistente à fotooxidação e à termoxidação e o óleo de girassol é o menos resistente.
- Boas correlações foram obtidas entre índice de peróxidos e dados de UV, na fotooxidação e termoxidação, com coeficiente de correlação variando entre 0,9575 e 0,9889.
- Excelentes correlações foram obtidas entre os dados de índice de peróxidos e da espectrometria de RMN de ^1H , com coeficiente de correlação de 0,9616 na fotooxidação e 0,9952 na termoxidação.
- Em relação ao índice de acidez, foi obtida uma excelente correlação com os dados de RMN de ^1H , com coeficiente de correlação de 0,9959.

- A espectroscopia de ultravioleta é eficiente no estudo da atividade de antioxidantes na proteção de óleos vegetais sob estresse fotoxidativo e mostrou que a eficiência dos antioxidantes segue a seguinte ordem: PG > TBHQ > BHT > BHA > ácido cítrico.
- Devido a restrições legais quanto ao PG, o TBHQ foi o antioxidante mais viável para utilização em óleos vegetais sob estresse fotoxidativo.

BERGER, K. G.; HAMILTON, R. J. In: HAMILTON, R. J. **Developments in Oils and Fats**. London: Chapman & Hall, 1995. cap.7.

BERSET, C.; CUVELIER, M. E. **Sciences des aliments**, v.16, p. 219, 1996.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHN, R.A.; KLEINJANS, J.; Van den BRANDT, P.A. Intake of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene and Stomach Cancer Risk: Results from Analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, p. 599-605, 2000.

CENTENO, A. J. **Curso de estatística aplicada à Biologia**. Goiânia: Editora da UFG, 2002. p. 95-108.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.5, p. 169-186, 2006.

CLAYSON, D. B.; IVERSON, F.; NERA, E.; LOK, E.; ROGERS, C.; RODRIGUES, C. Histopathological and radioautographical studies on the forestomach of F344 rats treated with butylated hydroxyanisole and related chemicals. **Food Chemistry Toxicology**, v.24, n.10/11, p. 1171-1182, 1986.

CMOLÍK, W. S.; HOLASOVA, M.; POKORNY, J.; REBLOVA, Z.; SCHWARZ, W. Minor lipophilic substances in rapessed oil. **Fat Science Technology**, v.97, p. 534-538, 1995.

COSGROVE, J. P.; CHURCH, D. F.; PRYOR, W. A. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. **Lipids**, v.22, p. 299-304, 1987.

DECKER, E. A. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of food to maximize oxidative stability. **Trends in Food Science and Technology**, v.9, n.6, p. 241-248, 1998.

ESKIN, N. A. M.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidantes and shelf life of foods. In: ESKIN, N. A. M.; ROBINSON, D. S. **Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical and Microbiological Changes**. New York, CRC, 2001. cap.6. p. 175-209.

FRANKEL, E. N. Lipid oxidation. **Progress in Lipid Research**, v.19, n.1, p. 1-22, 1980.

FRANKEL, E. N. Chemistry of autoxidation mechanism products and flavor significance. In: MIN, D. B.; SMOUS, T. H. **Flavor Chemistry of Fats and Oils**. Champaign: American Oil Chemists' Society, 1985. p. 1-37.

FRANKEL, E. N. Recent advances in lipid oxidation. **Journal of the Sciences of Food and Agriculture**, v.54, p. 495-511, 1991.

FRANKEL, E. N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science and Technology**, v.4, p. 220-225, 1993.

GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action in vitro. In HUDSON, B. J. F. **Food antioxidants**. New York: Elsevier, 1990. p. 1-18.

GORDON M. H. Oils and fats: taint or flavour? **Chemistry in Britain**, p. 1020-1022, nov. 1991.

GORDON, M. H. The development of oxidative rancidity in foods. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food**. England: Woodhead publishing, 2001.

GORDON, M. H; WENG, X. C. Antioxidant properties of extracts from tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge). **Food Chemistry**, v.44, p. 119-122, 1992.

GRAVANI, R. B. Food deterioration and spoilage caused by light. **Dairy and Food Sanitation**, v.6, p. 2-23, 1986.

GRAY, J. I. Measurement of Lipid Oxidation: A Review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.55, p. 539-546, 1978.

GUILLÉN, M. D. CABO, N. Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. **Food Chemistry**, 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**, v.12, p. 328-338, 2001.

GUILLÉN, M. D.; RUIZ, A. Study of the oxidative stability of salted and unsalted salmon fillets by ^1H Nuclear Magnetic Resonance. **Food Chemistry**, v.86, p. 297-304, 2004.

GUTFINGER T.; LETAN, A. Quantitative changes in some unsaponifiable components of soybean oil due to refining. **Journal of the Sciences of Food and Agriculture**, v.25, p. 1143, 1974.

HAMILTON, R. J. The chemistry of rancidity foods. In: ALLEN, J. C.; HAMILTON, R. J. **Rancidity in foods**. London: Black Academic & Professional, 1994. cap.1, p. 1-21.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. **Food Chemistry**, v.100, p. 246-254, 2007.

IRWIN, J. W.; HEDGES, N. Measuring lipid oxidation. In: STEELE, R. **Understanding and measuring the shelf-life of food**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004. p. 289-316.

JADHAV, S. J.; NIMBALKAR, S. S.; KULKARNI, A. D.; MADHAVI, D. L. Lipid oxidation in biological and food systems. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. **Food antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives**. New York: Marcel Dekker, 1996.

JAWAD, I. M.; KOCHHAR, S. P.; HUDSON, B. J. F. The physical refining of edible oils. 2- Effect on unsaponifiable components. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.17, n.3, p. 155-159, 1984.

JELÉN, H. H.; OBUCHOWSKA, M.; ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R.; WASOWICS, E. Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.6, p. 2360-2367, 2000.

JUNG, M. Y.; YOON, S. H.; MIN, D. B. Effects of processing steps on the contents of minor compounds and oxidation of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.66, n.1, p. 118-120, 1989.

KARPINSKA, M.; BOROWSKI, J.; DANOWSKA-OZIEWICZ, M. The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. **Food Chemistry**, v.72, p. 5-9, 2001.

LABUZA, T. P. Kinetics of lipid oxidation in foods. **Critical Review in Food Technology**, v.2, n.10, p. 473-476, 1971.

LANZON, A.; ALBI, T.; CERT, A.; GRACIAN, J. The hydrocarbon fraction of virgin olive oil and changes resulting from refining. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.71, p. 285-291, 1994.

LITWINIENKO, G; KASPRZYCKA-GUTTMAN, T.; JAMANEK, D. DSC studies of antioxidants properties of dihydroxyphenols. **Thermochimica Acta**, v.331, p. 79-86, 1999.

LIU, Q.; SINGH, S; GREEN, A. High-oleic and high-stearic cottonseed oils: nutritionally improved cooking oils developed using gene silencing. **Journal Am. Coll. Nutr.**, v.21, p. 205-211, 2002.

LUNDBERG, W. O. Mechanisms. In: SCHULTZ, H. W.; DAY, E. A.; SINNHUBER, R. O. *Lipids their oxidation*. Westport: AVI, 1962. p. 31-50.

MADHAVI, D. L.; DESPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. Toxicological aspects of food antioxidants, In: **Food antioxidants**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 267-311.

MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G.; SKIBSTED, L. H. Antioxidative activity of spices and spices extract. In: RISCH, S. J. e HO, C. **Spices: flavor chemistry and antioxidant properties**. Washington: American Chemical Society, 1997. p. 176-187.

MALCOLMSON, L. J.; VAISEY-GENSER, M.; PRZYBYLSKI, R.; ESKIN, N. A. M. Sensory stability of canola oil: present status of shelf life studies. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, p. 435-440, 1994.

MALECKA, M. Antioxidant properties of the unsaponifiable matter isolated from tomato seeds, oat grains and wheat germ oil. **Food Chemistry**, v.79, p. 327-330, 2002.

MANORAMA, R.; RUKMINI, C. Effects of processing on α -carotene retention in crude palm oil and its products. **Food Chemistry**, v.42, p. 253-264, 1991.

MELO, E. de A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim SBCTA**, Campinas, v.36, n.1, p. 1-11, jan./jun. 2002.

MIN, D. B.; BOFF, J. F. Lipid Oxidation in edible oil. In: AKOH, C.; MIN, D. B. **Food Lipids**. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 335-363.

MORETTO, E.; FETT, R.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M. **Introdução à Ciência de Alimentos**. Florianópolis: UFSC, 2002. 255p.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais**. São Paulo: Varela, 1998. 150p.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **CRC- Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.29, p. 273-300, 1990.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. cap.5. p. 225-319.

NAZ, S.; SHEIKH, H.; SIDDIQI, R.; SAYEED, S. A. Oxidative stability of olive, corn and soybean oil under different conditions. **Food Chemistry**, v.88, p. 253–259, 2004.

OLIVEIRA, J. T. G. S. B. **Melhor dose e dose econômica de TBHQ nos óleos de milho e canola**. 2003, 75f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

OLIVEIRA, J. T. G. S. B.; REGITANO-D’ARCE, M. A. B. Determining economical TBHQ doses for corn oil stability. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.24, n.3, p. 413-418, jul./set. 2004.

PAQUETTE, G., KUPRANYEZ, D. B.; VAN DER VOORT, F. R. The mechanisms of lipid autoxidation I. Primary oxidation products. **Canadian Institute Food Science Technology Journal**, v.18, p. 112-118, 1985.

PÉREZ-CAMINO, M. C.; RUIZ, G. M.; RAPOSO, S.; DOBARGANES, M. C. Alteración de grasas usadas in frituras. III. Correlación entre índices analíticos y métodos de evaluación directa de compuestos e degradación. **Grasas y Aceites**, v.39, p. 72-76, 1988.

PIN-DER, D.; GOW-CHIN, Y. Antioxidant efficacy of methanolic extracts of peanut hulls in soybean and peanut oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.74, n.6, p. 745-748, 1997.

PINHO, O.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, M. A. Quantification of synthetic phenolic antioxidants in liver pâtés. **Food Chemistry**, v.68, p. 353-357, 2000.

PRESTES, R.; COLNAGO, L. A.; FORATO, L. A.; VIZZOTTO, L.; NOVOTNY, E. H.; CARRILHO, E. A Rapid and automated low resolution NMR method to analyse oil quality in intact oilseeds. **Analytica Chimica Acta**, v.596, p. 325-329, 2007.

RAJALAKSHMI; D.; NARASIMHAN, S. Food Antioxidants: sources and methods of evaluation. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. **Food Antioxidants**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 65-157.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, n.4, p. 755-760, 2006.

REDA, S. Y. **Estudo comparativo de óleos vegetais submetidos a estresse térmico**. 2004, 143f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2004.

REGITANO D'ARCE, M. A. B. Castanha do Pará: óleo e subprodutos sob a ótica da lipidologia. 1998, 64f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo – ESALQ, Piracicaba, 1998.

ROVELLINI, P.; CORTESI, N.; FEDELI, E. Ossidazione dei lipid. **La Revista Italiana delle Sostanze Grasse**, v.74, n.5, p. 181-189, 1997.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **CRC-Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.32, n.1, p. 67-103,1992.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Antioxidant Properties of Food Phenolics. In: SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. New York: CRC, 2004. p. 403-442.

SHAHIDI F.; WANASUNDARA, U. N. Methods of measuring oxidative rancidity in fats and oils. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food Lipids – Chemistry, Nutrition and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1997. p. 377-396.

SHERWIN, E. R. Synthetic antioxidants for fats and oils. In: MIN, D. B.; SMOUSE, T. H. **Flavor chemistry of fats and oils**. Champaign: AOCS Press, 1985. p. 155-173.

SHERWIN, E. R.; THOMPSON, J. W. Tertiary-butylhydroquinone – An antioxidant for fats and oils and fat-containing foods. **Food Technology**, v.21, p. 912-916, jun. 1967.

SHYAMALA, B. N.; GUPTA, S.; LAKSHMI, A. J.; PRAKASH, J. Leafy vegetable extracts - antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils. **Food Science and Emerging Technologies**, v.6, p. 239-245, 2005.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Methods for the evaluation of the degree of lipid oxidation and the antioxidant activity. **Química Nova**, v.22, p. 94, jan./fev. 1999.

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

SIMIC, M. G.; JOVANOVIĆ, V.; NIKI, E. Mechanisms of lipid oxidative processes and their inhibition. In: ALLEN, J. A. **Lipid oxidation in food**. New York: American Chemical Society, 1992. p. 14-32.

SIQUEIRA F. M. Estabilidade oxidativa de óleos de soja, milho e canola. 1998, 91f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo – ESALQ, Piracicaba, 1998.

SMITH, S. A.; KING, R. E.; MIN, D. B. Oxidative and thermal stabilities of genetically modified high oleic sunflower oil. **Food Chemistry**, v.102, p. 1208-1213, 2007.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de nutrição**, v.15, n.1, p. 71-81, 2002.

ST. ANGELO, A. J. Lipid oxidation in foods. **CRC-Critical Review in Food Science and Nutrition**, v.36, n.3, p. 175-224, 1996.

VICETTI, R.; ISHITANI, T.; SALAS, A.; AYALA, M. Use of alpha-tocopherol combined with synergists and compared to other antioxidants on the oxidative stability of sardineskin lipids. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p. 131-137, 2005.

VIEIRA, T. M. F. S.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Stability of oils heated by microwave: UV spectrophotometric evaluation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.18, n.4, p. 433-437, out./dez. 1998.

VIEIRA, T. M. F. S.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Canola Oil Thermal Oxidation During Oven Test and Microwave Heating. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.34, n.4, p. 215-221, jun. 2001.

VIGLI, G.; PHILIPPIDIS, A.; SPYROS, A.; DAIS, P. 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. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 5715-5722, 2003.

WALISIEWICZ-NIEKBALSKA, W.; KOSMACINSKA, B.; CHMIELARZ, B. New trends in the processing of vegetable oils and animal fats for technical purposes. **Pollena: Tłuszcze, Środki Pielęgnacyjne Kosmet**, v.41, n.5, p. 190-194, 1997.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Canola extract as an alternative natural antioxidant for canola oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.71, p. 817-822, 1994.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F.; JABLONSKI, C. R. Comparison of standard and NMR methodologies for assessment of oxidative stability of canola and soybean oils. **Food Chemistry** v.52, p. 249-253, 1995.

WARNER, K. W.; ESKIN, N. A. M. **Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods**. Champaign: AOCS Press, 1995. p. 49-75.

WARNER, K.; FRANKEL, E. N.; MOUNTS, T. L. Flavor and oxidative stability of soybean, sunflower and low erucic acid rapeseed oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.66, p. 558-564, 1989.

WEINREICH, B. Frischeschutz mit weisser West. **Die Zeitschrift für die Lebensmittelwirtschaft**, v.49, p. 24-26, 1998.

YASAEI, P. M.; YANG, G. C.; WARNER, C. R.; DANIELS, D. H.; KU, Y. Singlet oxygen oxidation of lipids resulting from photochemical sensitizers in the presence of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.73, p. 1177-1181, 1996.

ZALIHA, O.; CHONG, C. L.; CHEOW, C. S.; NORIZZAH, A. R.; KELLENS, M. J. Crystallization properties of palma oil by dry fractionation. **Food Chemistry**, v.86, p. 245-250, 2004.

ANEXO 1

1 - Índice de peróxidos de óleos vegetais fotooxidados.

	SOJA	MILHO	CANOLA	GIRASSOL
0	0,00	0,00	0,00	1,75
5	4,02	3,16	3,80	13,90
10	16,96	10,35	10,41	20,22
15	19,94	17,69	21,33	37,72
20	30,12	21,76	27,84	40,95
25	44,38	36,44	25,17	45,25
30	71,62	55,18	40,98	77,55
35	75,23	54,58	45,88	96,95
40	136,59	61,73	68,18	203,24
45	178,25	130,48	81,26	193,79
50	238,23	97,28	87,89	323,56
55	213,19	121,13	104,97	274,26
60	190,79	183,19	132,12	350,97

2 - Formação de dienos conjugados a durante fotoxidação.

	SOJA	MILHO	CANOLA	GIRASSOL
0	0,3585	0,1594	0,2355	0,2764
5	0,4880	0,2074	0,3616	0,4694
10	0,6635	0,3357	0,5182	0,7488
15	1,0422	0,7225	0,6610	1,2324
20	1,1115	1,1083	0,8130	1,4915
25	1,6457	1,1058	1,0160	1,7932
30	1,9455	1,3143	0,9193	2,0830
35	2,2864	1,7146	1,0795	2,5017
40	2,3943	1,8356	1,3977	2,4657
45	2,4431	2,2206	1,5535	2,4977
50	2,3757	2,2280	1,8434	2,4896
55	2,4640	2,4462	2,0533	2,5063
60	2,5325	2,4976	2,3543	2,5871

3 - Análise de Regressão entre os parâmetros estruturais obtidos por RMN de ^1H e índice de peróxidos (fotoxidação).

Peróxidos	Roa	V	G	E
0,00	100,00	100,00	100,00	100,00
178,25	96,40	91,70	83,40	98,10
190,79	80,50	79,10	66,30	89,00
0,00	100,00	100,00	100,00	100,00
17,69	98,90	98,50	99,31	98,00
55,18	94,80	96,80	97,93	96,20
130,48	81,50	91,80	86,55	94,80
183,19	75,40	84,00	73,10	90,20
0,00	100,00	100,00	100,00	100,00
81,26	99,00	96,50	93,30	97,50
132,12	93,10	89,50	74,10	95,20
1,75	100,00	100,00	100,00	100,00
193,79	83,50	87,50	79,30	93,40
350,97	64,30	69,30	55,40	79,40

4 - Índice de peróxidos de óleos vegetais termoxidados.

	SOJA	MILHO	CANOLA	GIRASSOL
0	1,35	0,50	0,47	1,41
5	41,91	24,57	28,44	46,41
10	74,79	44,54	31,08	89,85
15	85,05	58,41	43,21	142,40
20	129,48	63,62	47,90	205,53
25	100,23	77,32	67,48	155,65
30	214,95	200,84	183,52	284,65
35	102,95	124,32	120,02	114,99
40	174,43	182,11	231,72	229,03

5 - Formação de dienos conjugados durante a termoxidação.

	SOJA	MILHO	CANOLA	GIRASSOL
0	0,3770	0,1542	0,2383	0,2620
5	1,0134	0,5540	0,5837	0,9503
10	2,0367	1,2615	0,8964	2,0033
15	2,3692	1,5994	0,9895	2,3948
20	2,3922	2,1478	1,4878	2,4843
25	2,4938	2,4086	1,7923	2,6560
30	2,6023	2,5811	2,3982	2,5054
35	2,4892	2,3626	2,1407	2,2199
40	2,3250	2,4247	2,0710	1,6086

6 - Análise de Regressão entre os parâmetros estruturais obtidos por RMN de ^1H e índice de peróxidos (termoxidação).

Peróxidos	R _{oa}	V	G	E
1,35	100	100	100	100
85,05	92,8	92,38	87,4	96,2
214,95	73,09	72,97	61,3	81,9
0,5	100	100	100	100
58,41	95,75	96,98	97,9	96,4
200,84	80,34	82,6	74,8	87
0,47	100	100	100	100
183,52	93,2	85,55	71,1	90,1
1,41	100	100	100	100
142,4	87,18	88,8	80,9	94,5
284,65	65,62	65,51	52	75,31

7 - Análise de Regressão entre os parâmetros estruturais obtidos por RMN de ^1H e acidez (termoxidação).

Acidez	R _{oa}	V	G	E
0,44	100	100	100	100
0,75	92,8	92,38	87,4	96,2
2,47	73,09	72,97	61,3	81,9
0,53	100	100	100	100
0,78	95,75	96,98	97,9	96,4
1,47	80,34	82,6	74,8	87
0,39	100	100	100	100
1,55	93,2	85,55	71,1	90,1
0,39	100	100	100	100
0,88	87,18	88,8	80,9	94,5
3,5	65,62	65,51	52	75,31

ANEXO 2

XII Congresso Latinoamericano de Óleos e Gorduras, 2007, Florianópolis, Brasil.

DETECÇÃO DE ADULTERAÇÃO DE AZEITE DE OLIVA COM ÓLEO DE SOJA POR RMN DE ^1H

TOLENTINO, MARINA CALDEIRA¹; CARNEIRO, PAULO IRAJARA BORBA¹;
NAGATA, NOEMI¹

¹ Universidade Estadual de Ponta Grossa, CP 992, Ponta Grossa, Paraná, Brasil. Email: mtolentino10@yahoo.com.br.

Resumo

A adulteração do azeite de oliva é um dos principais aspectos a ser considerado no controle de qualidade desse produto. Geralmente, esta adulteração ocorre com a adição de óleo de soja, uma vez que este último é um produto mais barato e de fácil obtenção. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para detectar e quantificar a adulteração do azeite de oliva com óleo de soja por análise de RMN de ^1H . Monitorando-se a fração de hidrogênios dialílicos e teores de azeite de oliva em amostras adulteradas foi obtido uma boa correlação linear ($r = -0,9955$; $r^2 = 0,9911$; $n = 8$). Utilizando-se a equação definida pela regressão linear foi determinada com boa precisão a autenticidade das amostras comerciais de azeite de oliva adulteradas com óleo de soja. Nossos resultados mostram que a RMN de ^1H é uma excelente ferramenta para a investigação de adulteração de azeite de oliva. Palavras chave: RMN de ^1H , azeite de oliva, adulteração.

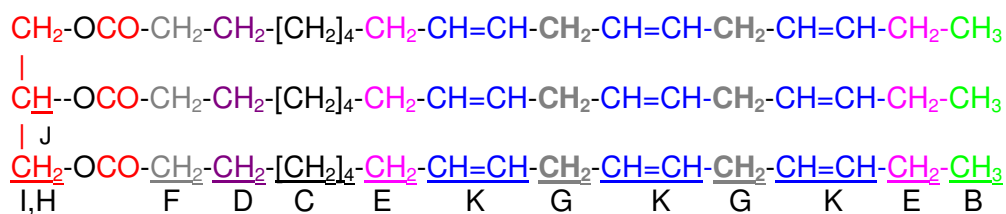
Introdução

O azeite de oliva é bastante apreciado pelos consumidores devido a sua qualidade sensorial e nutricional. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, o azeite de oliva é o produto obtido somente dos frutos da oliveira (*Olea europaea* L.), excluídos os óleos obtidos através de solventes ou processos de reesterificação e/ou qualquer mistura de outros óleos. O azeite de oliva virgem é o produto obtido do fruto da oliveira por processos mecânicos ou outros meios físicos, em condições térmicas, que não produzam alteração do azeite. Além disso, ele não pode ser submetido a outros tratamentos além da lavagem, decantação, centrifugação e filtração [1].

As dificuldades de produção do azeite decorrentes principalmente das características específicas de clima e solo, o tempo necessário para frutificar e a baixa produtividade anual justificam seu alto custo, o que estimula as adulterações. Isto demonstra a importância de uma fiscalização eficiente para controlar e detectar essa adulteração.

Atualmente, várias propostas de autenticação do azeite de oliva têm sido realizadas. A análise por cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são técnicas onerosas e demandam tempo de análise [2,3]. As técnicas espectroscópicas representam boa alternativa por serem rápidas, precisas e de alta sensibilidade. A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, principalmente de ^1H e ^{13}C , tem sido muito utilizada como uma ferramenta que fornece informações sobre a estrutura química de moléculas como as do triacilglicerol.

A Figura 1 mostra o espectro de RMN de ^1H genérico de um óleo vegetal. Os deslocamentos químicos (δ) estão bem estabelecidos na literatura. Os hidrogênios 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]; o H-2 do glicerol em δ 5,25 ppm (J). Os hidrogênios metílicos em δ 0,80-1,00 ppm (A, B) e somente os prótons metílicos do ácido linolênico são observados em δ 0,98 ppm (B). Hidrogênios dialílicos são observados em δ 2,90-2,70 ppm (G) e os hidrogênios alílicos em δ 2,10-1,90 ppm (E). Os hidrogênios α -carboxílicos aparecem em δ 2,34-2,22 ppm (F) e os β -carboxílicos em δ 1,70-1,50 ppm (D). Um cluster de picos centralizados em δ 1,20 ppm corresponde aos demais prótons metilênicos dos ácidos graxos presentes no triacilglicerol (C) [2-4].



1,2,3-tris-linoleneato de glicerila

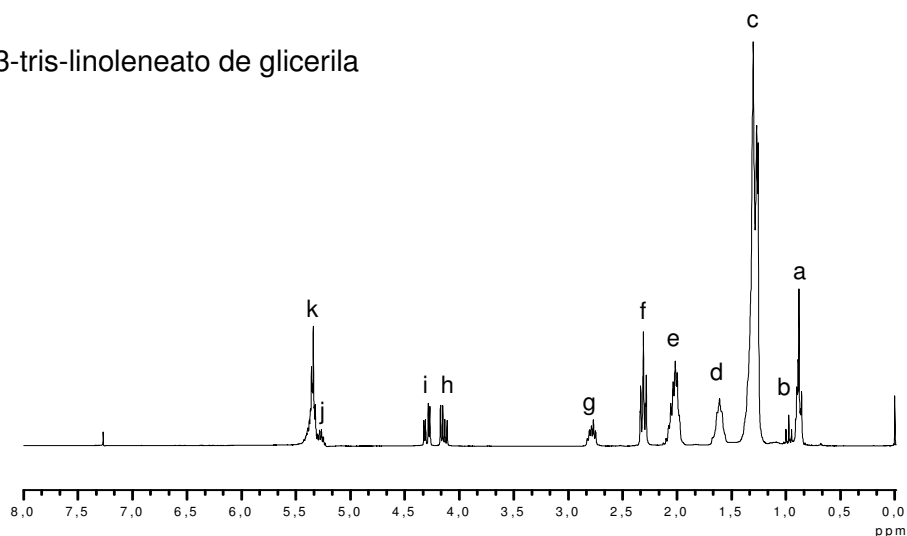


Figura 1. Espectro de RMN de ^1H de um óleo vegetal.

O azeite de oliva contém altos teores de ácido oléico (76 %) e baixos teores de ácidos linolêico (10 %) e linolênico (0,7 %) quando comparado com outros óleos vegetais, como os de soja, milho e girassol (Tabela 1). Portanto, teores de ácido linolênico maior que 0,9% em azeite de oliva pode ser indicativo de adulteração [5].

Assim, a autenticação do azeite de oliva e a avaliação de sua qualidade podem ser realizados por RMN de ^1H que fornece informações quantitativas sobre os hidrogênios do triacilglicerol [4].

Tabela 1 – Perfil de ácidos graxos de alguns óleos vegetais

	Ácidos graxos saturados (%)	Ácido Oléico (%)	Ácido Linolêico (%)	Ácido Linolênico (%)
Oliva	13 (8-27,1)	76 (55-83)	10 (3,5-21)	0,7 (0-1,5)
Soja	15 (13,1-20,7)	24 (17,7-28,5)	54 (49,8-57,1)	7 (5,5-9,5)
Milho	13 (9,5-22)	25 (20-42,2)	61 (39,4-65,6)	1 (0,5-1,5)
Canola	6 (4,6-10,5)	58 (52-67)	26 (16-26)	10 (6-14)
Girassol	11 (8,2-17,5)	20 (13-40)	69 (48-74)	0 (0-0,3)

FONTE: Firestone [6] e Moretto [7]

Devido às diferenças dos perfis de ácidos graxos do azeite de oliva e demais óleos vegetais pode-se quantificar as adulterações produzidas pela adição de outros óleos comestíveis ao azeite de oliva, monitorando-se a concentração dos hidrogênios alílicos, dialílicos e vinílicos no espectro de RMN de ^1H . O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia para detectar e quantificar a adulteração em azeite de oliva com óleo de soja por RMN de ^1H .

1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Azeite de oliva e óleo de soja de boa procedência foram adquiridos do mercado local. Realizaram-se as misturas nas seguintes proporções oliva/soja (%): 100/0; 97/3; 95/5; 93/7; 90/10; 87/13; 85/15; 83/17; 80/20; 75/25; 70/30. Três dessas misturas (97/3; 93/7 e 83/17) não fizeram parte da construção do modelo, sendo utilizadas para sua validação.

Os espectros de RMN de ^1H de amostras das misturas foram analisadas em espectrômetro Varian, modelo Mercury 300, operando no modo FT a temperatura ambiente. Foram utilizadas amostras em concentração de 10 % em 0,7 mL de CDCl_3

contendo traços de TMS como referência interna em tubos de 5 mm de diâmetro. As condições foram as seguintes: 16 K; largura espectral: 14 ppm; tempo de aquisição: 3.6 s; tempo de relaxação: 1.3 s, largura de pulso: 45 μ s; número de varreduras: 16; tempo total: 90 s.

1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 são apresentados os dados de RMN de ^1H dos sinais integrados.

Tabela 2. Parâmetros estruturais derivados do espectro de RMN de ^1H das misturas de azeite de oliva e óleo de soja.

% Oliva	K+J	I+H	G	F	E	D	C	B	A
100	6.230	3.930	0.510	5.930	10.110	5.610	59.370	0.000	8.310
97*	6,360	3,920	0,620	5,940	10,060	5,670	59,340	0,000	8,090
95	6.410	3.950	0.690	5.990	10.120	5.580	59.060	0.000	8.200
93*	6,470	3,940	0,770	5,980	10,140	5,650	58,890	0,000	8,160
90	6.570	3.950	0.870	5.970	10.090	5.730	58.670	0.000	8.150
87	6.730	3.950	0.990	5.980	10.150	5.680	58.520	0.000	8.000
85	6.840	3.920	1.050	5.890	10.120	5.650	58.550	0.000	7.980
83*	6,850	3,950	1,090	5,960	10,150	5,660	58,280	0,000	8,060
80	6.960	3.990	1.210	5.980	10.180	5.630	57.970	0.000	8.080
75	6.900	3.800	1.290	5.690	9.950	6.370	56.970	0.430	8.600
70	7.070	3.860	1.530	5.790	9.780	6.250	56.920	0.800	8.000

* Amostras utilizadas para validação do modelo (amostras de previsão)

A análise da tabela mostra um aumento progressivo da fração de hidrogênios dialílicos (G) na medida em que aumenta o teor de óleo de soja na mistura. O óleo de soja apresenta teores mais elevados de ácidos linoléico e linolênico, que são ácidos graxos poliinsaturados que apresentam significativos teores de hidrogênios dialílicos (hidrogênios em carbono saturado situado entre 2 ligações C=C). Os teores de hidrogênios alílicos (E) praticamente não se alteram, pois tanto o azeite de oliva como o óleo de soja apresentam elevado grau de insaturação e altos teores de hidrogênios alílicos (hidrogênio de carbono saturado vizinho a uma ligação C=C).

Estas informações podem ser confirmadas através da Análise de Componentes Principais (PCA), cujos scores e loadings são apresentados na Figura 2. Uma

avaliação destes dados indica que a diminuição do teor de azeite de oliva faz com que as amostras se desloquem para valores mais positivos de PC2 e também de PC1, sendo que as adulterações mais altas geram um agrupamento mais diferenciado (70 e 75%). Este comportamento pode ser explicado pelos sinais G e K+J do espectro RMN de ^1H . No entanto, estes dois sinais apresentam-se altamente correlacionados ($r = 0,9760$), o que indica que ambos fornecem o mesmo tipo de informação.

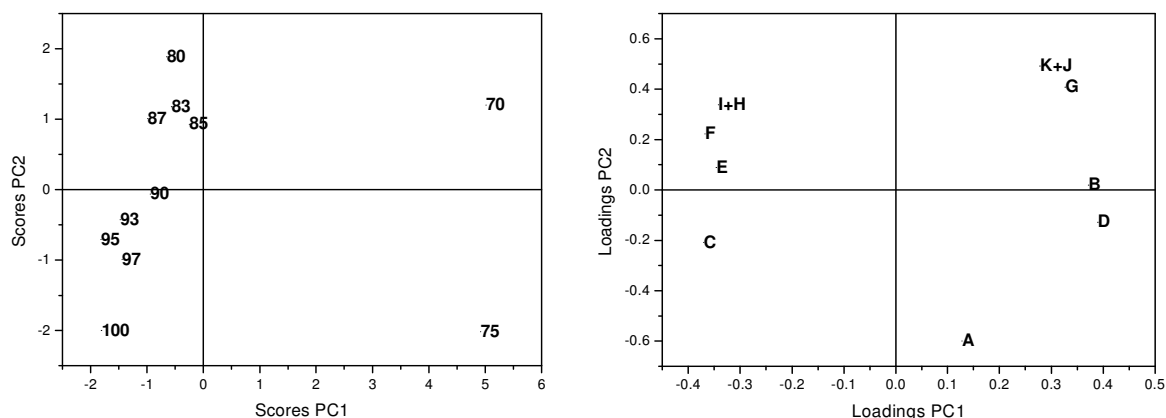


Figura 2 – Scores e Loadings da Análise por Componentes Principais

Os valores das concentrações dos hidrogênios dialílicos (G) e do azeite de oliva da Tabela 1 foram utilizados para a análise de regressão linear, obtendo-se uma boa correlação apresentada na Figura 3, conforme a Equação (I).

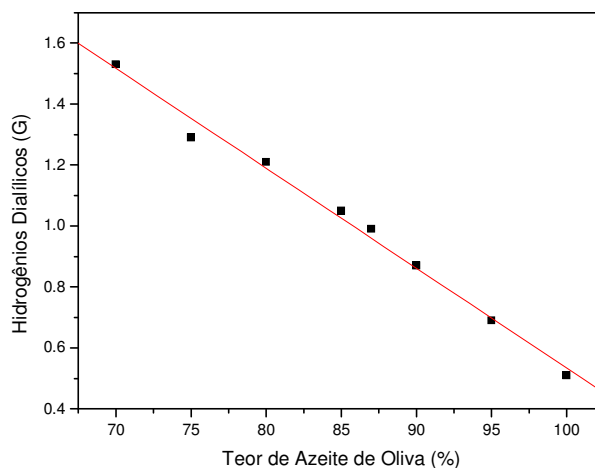


Figura 3 - Correlação linear entre concentração de azeite de oliva e hidrogênios dialílicos ($r = -0,9955$; $r^2 = 0,9911$; $n = 8$).

$$G = -3,28 \cdot 10^{-2} \% \text{ oliva} + 3,81 \quad (I)$$

Utilizando-se a Equação (I) foram calculados os teores de azeite de oliva nas amostras de previsão, apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Concentração de azeite de oliva nas amostras de previsão analisadas.

Experimental (%)	Calculado (%)	Erro relativo (%)
97	97,26	0,26
93	92,68	-0,34
83	82,93	-0,09

Os resultados sugerem que a análise de RMN de ^1H permite a determinação numerosos parâmetros estruturais com pouca manipulação das amostras. Monitorando a fração de hidrogênios dialílicos é possível determinar a concentração de azeite de ol em misturas e sua autenticidade de uma maneira precisa e confiável. Assim, o RMN de é uma excelente ferramenta para investigação de adulteração de azeite de oliva.

1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Agência Nacional de Vigilância Sanitária, <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18829&word=> (acessado em Jun. 2007).
- [2] Mannina, L., A. P. Sobolev, and A. L. Segre, Olive oil as seen by NMR and chemometrics, *Spectr. Europe*. 15(3):6-14 (2003).
- [3] Vigli, G., A. Philippidis, A. Spyros, and P. Dais, Classification of Edible Oils by Employing ^{31}P 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.* 32(19): 5715-5722 (2003).
- [4] Guillén, M. D., and A. Ruiz, High resolution ^1H Nuclear Magnetic Resonance in the study of Edible Oils and Fats, *Trends Food Sci. Technol.* 12: 328-338 (2001).
- [5] Mannina, L., M. Patumi, P. Fiordiponti, M. C. Emanuele, and A. L. Segre, Olive and hazelnut oils: a study by high-field ^1H NMR and gas chromatography, *Ital. J. Food Sci.* 2: 139–149 (1999).
- [6] Firestone, D., *Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes*. Canuto, Washington D. C., 1999.
- [7] Moretto, E., e R. Fett, *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais*, Varela, São Paulo, 1998.

TERMOXIDAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS POR ESPECTROSCOPIA DE ULTRAVIOLETA

Marina Caldeira TOLENTINO^{1*}; Paulo Irajara Borba CARNEIRO²; Noemi NAGATA³; Eliana Beleski Borba CARNEIRO⁴

RESUMO: Foi avaliada a estabilidade térmica dos óleos de soja, milho, canola e girassol por espectroscopia de ultravioleta. Os óleos, adicionados de diferentes antioxidantes (BHA, BHT, PG, TBHQ e ácido cítrico), foram submetidos ao *oven test* (63°C) por 25 dias. Após análise exploratória dos dados por Análise de Componentes Principais determinou-se o coeficiente de correlação linear entre índice de peróxidos e absorção em 232nm para cada óleo vegetal. Foram encontradas boas correlações para todos os óleos estudados, sendo o óleo de canola o que apresentou maior estabilidade à termoxidação. Esses resultados indicam que a espectroscopia de ultravioleta pode ser utilizada no controle de qualidade de óleos vegetais.

Palavras-chave: óleos vegetais, termoxidação, ACP, índice de peróxidos, ultravioleta.

SUMMARY: Thermal stability of soybean, corn, canola and sunflower oil was evaluated by ultraviolet spectroscopy. Oil samples with several antioxidants (BHA, BHT, PG, TBHQ and citric acid) were submitted to oven test (63°C) for 25 days. After exploratory analysis by Principal Component Analysis (PCA), the linear coefficient of correlation between peroxide value and absorbance at 232 nm to the oils was determined. We found good correlations for all the oils studied, being the canola oil which shows the highest thermal stability. These results indicated that Ultraviolet Spectroscopy can be utilized in the quality control of vegetable oils.

Keywords: vegetable oils, thermal oxidation, PCA, peroxide value, ultraviolet.

1 – INTRODUÇÃO

O consumo de óleos vegetais com alto teor de ácidos graxos insaturados é considerado bom para a saúde, porém as insaturações os tornam mais susceptíveis às reações de oxidação, as quais diminuem sua vida de prateleira [10]. Os grupos alilas presentes nestes ácidos graxos insaturados são os mais susceptíveis a reações via radicais livres, sendo que estes radicais podem ser formados pela presença de luz, calor, outros radicais e catalisadores metálicos [5], que acabam induzindo o processo de oxidação e tornando-o autocatalítico [3]. Os ácidos graxos insaturados são relativamente estáveis à oxidação a temperaturas abaixo de 60°C, mas oxidam em temperaturas maiores [7]. O perfil de ácidos graxos dos principais óleos vegetais é apresentado na Tabela 1.

TABELA 1 – PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE ALGUNS ÓLEOS VEGETAIS

	Ácidos graxos saturados (%)	Ácido Oléico (%)	Ácido Linoléico (%)	Ácido Linolênico (%)
Soja	15 (13,1-20,7)	24 (17,7-28,5)	54 (49,8-57,1)	7 (5,5-9,5)
Milho	13 (9,5-22)	25 (20-42,2)	61 (39,4-65,6)	1 (0,5-1,5)
Canola	6 (4,6-10,5)	58 (52-67)	26 (16-26)	10 (6-14)
Girassol	11 (8,2-17,5)	20 (13-40)	69 (48-74)	0 (0-0,3)

FONTE: Firestone [4] e Moretto [9]

¹ Universidade Estadual de Ponta Grossa. Av.: Carlos Cavalcanti, 4748. CEP:84030-900. mtolentino10@yahoo.com.br

² Universidade Estadual de Ponta Grossa. pibc@uepg.br

³ Universidade Estadual de Ponta Grossa. noeminagata@uepg.br

⁴ Universidade Estadual de Ponta Grossa. ebeleski@uol.com.br

Os produtos primários da oxidação lipídica são os hidroperóxidos ou peróxidos e por este motivo, o índice de peróxidos é a análise mais comumente utilizada para avaliar o grau dessa oxidação. No entanto, seu uso deve ser limitado somente ao estágio inicial da oxidação por serem produtos intermediários na formação de compostos carbonilados e hidroxilados [6]. Baixos valores de índice de peróxidos podem representar o estágio inicial ou avançado da oxidação.

Por outro lado, a formação de dienos conjugados durante a oxidação de ácidos graxos insaturados [13] torna possível o seu monitoramento através da análise por espectroscopia de ultravioleta, uma vez que estes apresentam uma absorção máxima em comprimentos de onda específicos [12]. Portanto, quando um óleo sofre qualquer tipo de alteração como a oxidação, o espectro gerado mostra um deslocamento de banda e aumento da intensidade de absorção, acusando que o óleo não está em seu estado mais puro [11].

Vieira e Regitano d'Arce [14] e Wanasundara e Shahidi [15] encontraram uma boa correlação entre índice de peróxidos e absorção em 232 nm durante o *oven test* para o óleo de canola adicionado de diferentes antioxidantes. O estudo envolvendo a adição de antioxidantes em óleos vegetais refinados torna-se necessário para simular a situação real da oxidação de óleos vegetais, uma vez que remoção dos antioxidantes naturais durante o refino, aumenta sua susceptibilidade a autooxidação e oxidação enzimática [8].

Os testes de estocagem como o *oven test* podem ser usados para indicar o efeito de antioxidantes no estudo da estabilidade oxidativa de óleos vegetais [14]. Estudos relatam que 1 dia de estocagem em estufa a 65°C é equivalente a 1 mês de estocagem à temperatura ambiente de 25°C [1].

Em função da relevância do assunto, o objetivo deste trabalho visa a análise exploratória dos dados de espectroscopia UV-VIS de óleos vegetais submetidos a termoxidação com posterior verificação da sua estabilidade oxidativa.

2 – MATERIAL E MÉTODOS

2.1 – Materiais

Os óleos vegetais foram cedidos pela Cargill Agrícola S/A. Para a obtenção de níveis diferentes de termoxidação foram utilizados os antioxidantes butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG) da Eastman e ácido cítrico (Merck).

2.2 – Métodos

2.2.1 – Oxidação acelerada em estufa (*Oven test*)

Amostras de 50 mL de óleos vegetais sem antioxidantes (controles) e com antioxidante em concentração variável (0,4 mM.L⁻¹, 0,8 mM.L⁻¹ e 1,2 mM.L⁻¹) foram estressadas termicamente em estufa a 63± 2°C durante 25 dias. A estabilidade térmica dos óleos durante a termoxidação foi avaliada por índice de peróxidos e espectroscopia de ultravioleta-visível.

2.2.2 – Espectroscopia de ultravioleta-visível (UV-VIS)

Foram utilizadas soluções 1:1000 dos óleos vegetais em isopropanol. Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu modelo Multispec 1501, operando na região de 200-800 nm, utilizando-se cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico.

2.2.1 – Índice de peróxidos

O índice de peróxidos foi determinado pelo método oficial da American Oil Chemists' Society Cd 8-53 [2], o qual foi expresso em mM de peróxidos/kg óleo.

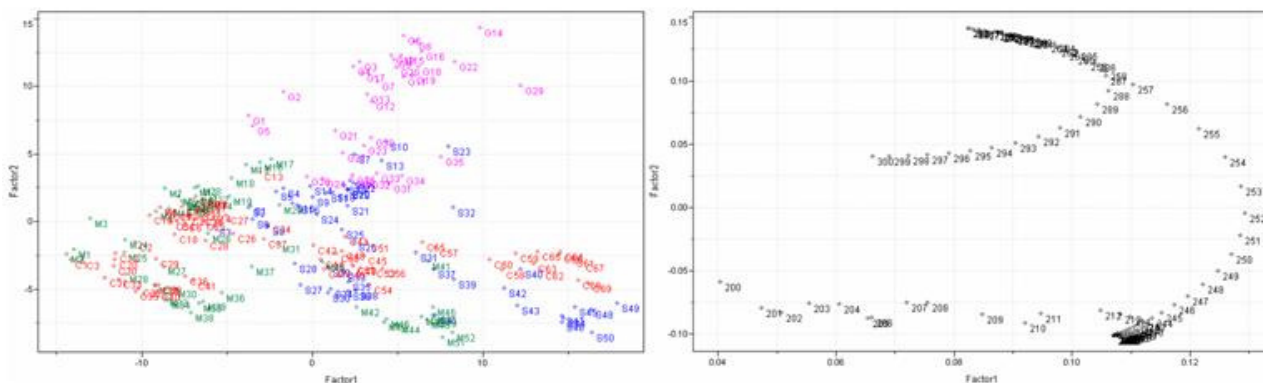
2.2.3 – Análise por Componentes Principais (PCA)

Os espectros de UV-VIS das amostras de óleos vegetais foram analisados através da Análise de Componentes Principais (PCA) com o objetivo de identificar as regiões espectrais de melhor correlação com os dados obtidos via índice de peróxidos. Somente espectros das amostras com absorbâncias situadas entre 0 e 2 u.a. foram utilizados.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

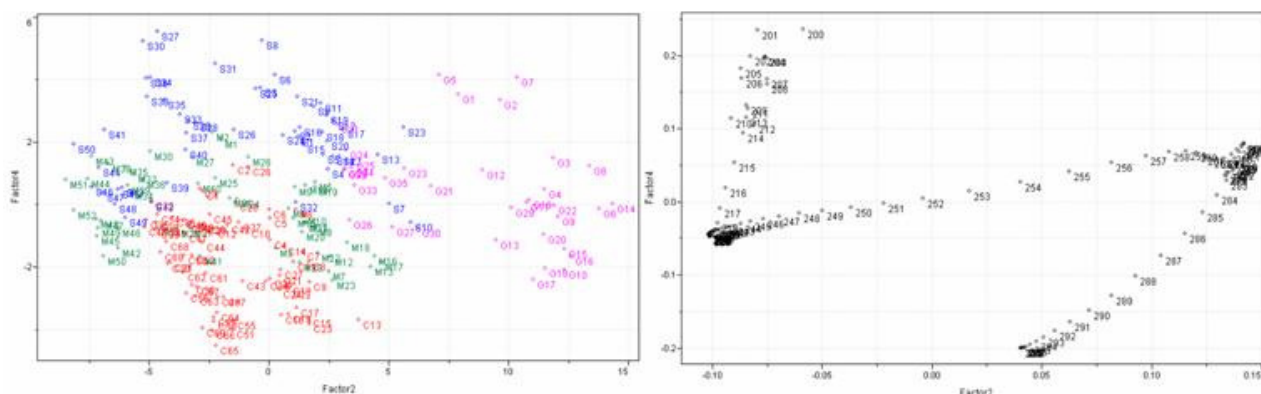
Foi realizada a análise exploratória dos dados espectrais via Análise de Componentes Principais (ACP). Observou-se que 4 componentes principais foram necessárias para explicar cerca de 98,4% da variância dos dados. Uma interpretação dos dados de *scores* (Figura 1) mostra uma tendência das amostras de óleos com índice de peróxidos mais elevados se deslocarem para valores positivos de CP1 e valores negativos de CP2. Os *loadings* destas componentes principais indicam que a faixa de comprimento de onda que propicia esta discriminação localiza-se entre 220-240 nm, região correspondente à absorção dos dienos conjugados formados durante a termoxidação.

FIGURA 1 – *SCORES* E *LOADINGS* DA ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS (CP1XCP2) (ÓLEO DE SOJA – AZUL, MILHO – VERDE, CANOLA – VERMELHO E GIRASSOL – MAGENTA)



Além disso, as Figuras 1 e 2 evidenciam que a CP2 discrimina as amostras de óleo de girassol, fazendo com que estas se localizem em valores positivos desta componente principal. Este óleo tem o maior teor de ácido linolêico (70%) e o menor teor de ácido oleico (20%) quando comparado aos outros óleos vegetais, o que o torna altamente susceptível à oxidação. O gráfico de *loadings* confirma que esta discriminação é possível em função do aumento da absorção na região de 260-280 nm que corresponde aos produtos da oxidação (trienos conjugados, dicetonas etilênicas e cetodienos conjugados) [16].

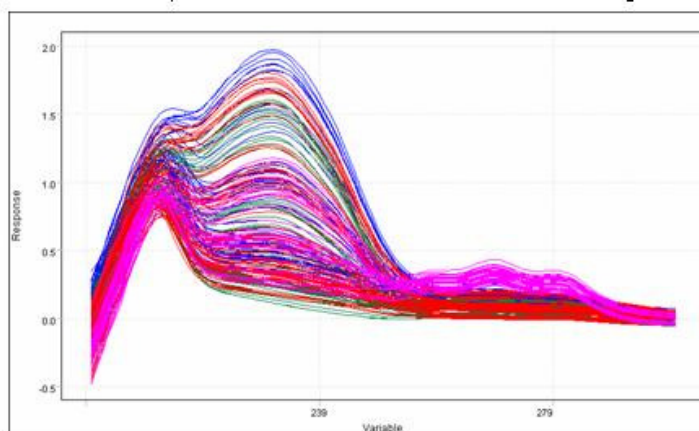
FIGURA 2 – SCORES E LOADINGS DA ANÁLISE POR COMPONENTES PRINCIPAIS (CP2XCP4)



A Figura 2 evidencia que a CP4 apresenta outra tendência relacionada às amostras de óleo de soja, milho e canola. As amostras de óleo de canola estão mais deslocadas para valores negativos de CP4, enquanto as amostras de óleo de milho estão em valores intermediários e as amostras de óleo de soja estão em valores mais positivos desta componente. Observando-se o gráfico de *loadings* esta discriminação acontece em função das diferenças de absorção de cada um dos óleos no início do espectro (Figura 3).

O aumento da absorção em 232 nm para todos os óleos e em 270 nm para óleo de girassol pode ser claramente observado na Figura 3.

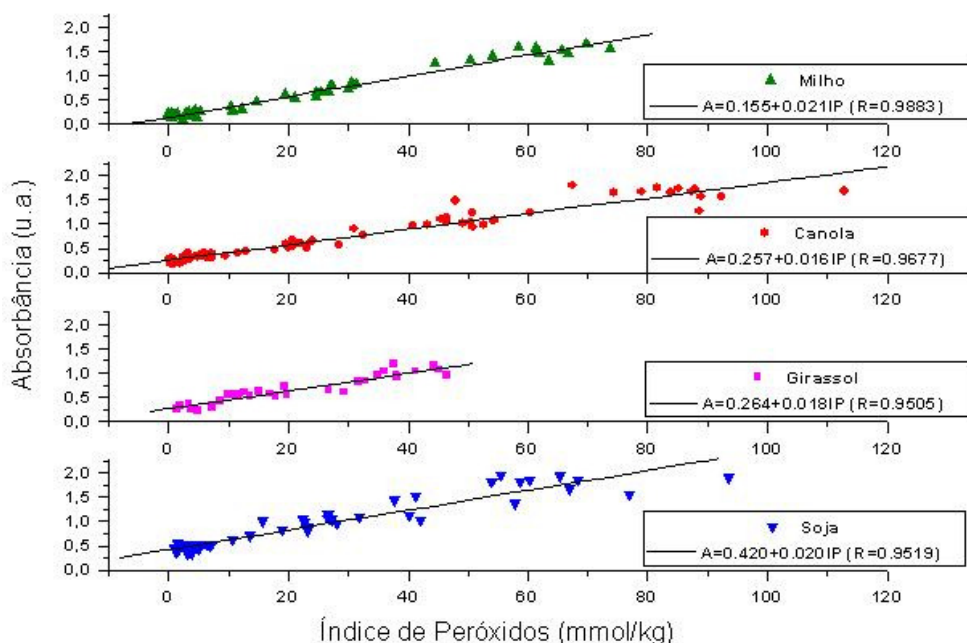
FIGURA 3 – ESPECTRO DE UV DAS AMOSTRAS DE ÓLEOS VEGETAIS



A partir dos resultados obtidos por PCA que mostraram alta correlação entre o aumento do índice de peróxidos e o aumento da absorção em 232 nm, fez-se a correlação entre os valores de absorbância nessa região e os valores de índice de peróxidos para cada um dos óleos estudados.

Todas as amostras apresentaram aumento do índice de peróxidos e da absorbância a 232nm. A Figura 4 apresenta a correlação entre esses índices. Pode-se notar pela linearidade das curvas que estão altamente correlacionados (soja: $r = 0,9519$; milho: $r = 0,9883$; canola: $r = 0,9677$ e girassol: $r = 0,9505$).

FIGURA 4 – CURVA DE CALIBRAÇÃO E COEFICIENTE DE REGRESSÃO LINEAR DAS AMOSTRAS DE ÓLEOS VEGETAIS.



Vieira e Regitano d'Arce [14] encontraram uma correlação de 0,991 para o óleo de canola adicionado de BHA/BHT e ácido cítrico durante o *oven test* (63°C por 6 dias). Em nosso estudo foram utilizados BHA, BHT, TBHQ, PG e ácido cítrico, o que pode ter ocasionado uma maior variabilidade dos resultados.

Outro fator relevante a ser considerado está relacionado com a quantidade de amostras do óleo de canola, como pode ser observado pela Figura 4. Este óleo apresenta uma resistência maior à oxidação (apresenta maior número de amostras com absorbâncias no intervalo de 0 a 2 u. a.), uma vez que a quantidade de ácido oléico (ácido graxo monoinsaturado) é maior (60%).

4 – CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que o óleo de canola é o mais estável à termoxidação dentre os óleos estudados, seguido pelo óleo de milho, soja e girassol. Pode-se observar que quanto maior o teor de ácido oléico no óleo vegetal e menor o teor de ácido graxos poliinsaturados, maior sua estabilidade à termoxidação.

Uma boa correlação entre índice de peróxidos e absorbância a 232 nm foi obtida para todos os óleos estudados, indicando que a espectroscopia de ultravioleta pode ser utilizada no controle de qualidade de óleos vegetais.

5 – REFERÊNCIAS

- [1]ABOU-GHARBIA, H. A. et al. Oxidative stability of extracted sesame oil from raw and processed seeds. *Journal of Food Lipids*, v.3, p.59-72, 1996.
- [2]AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. *Official methods and Recommended Practices*. 4 ed. Champaign. 1990.
- [3]ESKIN, N. A. M.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidantes and shelf life of foods. In: ESKIN, N. A. M.; ROBINSON, D. S. *Food Shelf Life Stability: Chemical, Biochemical and Microbiological Changes*. New York: CRC, 2001. Cap.6, p.175-209.

- [4] FIRESTONE, D. Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and Waxes. Canuto, Washington D. C., 1999.
- [5] GORDON, M. H. The development of oxidative rancidity in foods. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. Antioxidants in foods. England: Woodhead publishing, 2001. Cap. 2
- [6] GRAY, J. I. Measurement of lipid oxidation: a review. Journal of the American Oil Chemists' Society, v.55, p.539-546, 1978.
- [7] JELÉN, H. H. et al. Headspace solid-phase microextraction use for the characterization of volatile compounds in vegetable oils of different sensory quality. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.48, p.2360-2367, 2000.
- [8] MALECKA, M. Antioxidant properties of the unsaponifiable matter isolated from tomato seeds, oat grains and wheat germ oil. Food Chemistry, v.79, p.327-330, 2002.
- [9] MORETTO, E.; FETT, R. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais. São Paulo: Varela, 1998. 150p.
- [10] OLIVEIRA, J. T. G. de Sá B. de, REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Determining economical TBHQ doses for corn oil stability. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.24, n.3, p.413-418, 2004.
- [11] REDA, S. Y. Estudo comparativo de óleos vegetais submetidos a estresse térmico. Ponta Grossa, 2004. 153p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa (UEPG).
- [12] ROVELLINI, P.; CORTESI, N.; FEDELI, E. Ossidazione dei lipid. La Revista Italiana delle Sostanze Grasse, v.74, n.5, p.181-189, 1997.
- [13] SMITH, S. A.; KING, R. E.; MIN, D. B. Oxidative and thermal stabilities of genetically modified high oleic sunflower oil. Food Chemistry, v.102, p.1208-1213, 2007.
- [14] VIEIRA, T. M. F. S.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Canola Oil Thermal Oxidation During Oven Test and Microwave Heating. Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie, v.34, n.4, p.215-221, 2001.
- [15] WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Canola extract as a alternative natural antioxidant for canola oil. Journal of the American Oil Chemists' Society, v.71, p.817-822, 1994.
- [16] WARNER, K.; ESKIN, N. A. M. Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods. Champaign, USA: AOCS Press, 1995.

Carica papaya* L. (PAPAYA) SEED OIL ¹H NMR STUDIES*Gabriela de Oliveira Feitosa¹, Eliane Iensen¹, Marina Caldeira Tolentino¹; Eliana Beleski Borba Carneiro¹; Paulo Irajara Borba Carneiro*¹**¹Universidade Estadual de Ponta Grossa, CP 992, Brazil, E-mail: pibc@uepg.br**Keywords:** ¹H NMR; Papaya seed oil; characterization

Papaya is a tropical native fruit belonging to *Caricaceae* family, that contain more than 20 species of the *Carica* class being the most cultivated *Carica Papaya* L. The principal varieties are Formosa and papaya. Brazil is de major papaya world producer with 36.9% of world production (Fagundes and Yamanishi, 2001). When mature, papaya is consumed *in nature*, being excellent food with a rich pulp in nutrients, and higher quantities of mineral salts (calcium, phosphor, iron, sodium and potassium), vitamins A and C. Its culture represents important economic activities. Nevertheless the principal neck is the phytosanitary problems, production technologies, higher loss after harvest time and a lack of agricultural industries (Martin et al., 1989).

The fruit is constituted by pulp (80%), peel (5%) and seeds (15%), but only the pulp is consumed. Their seeds usually are discarded besides to contain approximately 28-32% of proteins and 25-35% of edible oil that also can be used to pharmaceutical applications (Martin et al., 1989). A better noble destiny should be given to this source of reddish yellow oil with quality similar to olive oil.

The aim of this work was to study the papaya seed oil by ¹H NMR spectroscopy.

Seed oils were obtained by Soxhlet extraction using hexane as solvent, during 8 hours under reflux followed by solvent removal that yield 25.5% of oil. According with the official methods [AOCS, 1990], saponification index (AOCS-Cd 3-25), iodine (AOCS-Cd 1b-87) and acidity values (AOCS-Ca 5a-40) were determined. Spectra data were recorded on a Varian Mercury-300 spectrometer, operating at 300 MHz at room temperature. The samples concentration for the ¹H NMR analysis was about 10% of oil in 0.7 mL of CDCl₃ containing a very small amount of TMS as internal reference in a 5 mm NMR tube. The spectrum was acquired using 16K data point, spectral width 14 ppm, acquisition time 3.6s, relaxation delay 1.3s, pulse width 45µs and 16 scans, total time about 90s.

¹H NMR chemical shifts of vegetable oils are well established in the literature [Nathan, 1982; Guillén and Ruiz, 2001; Mannina *et al.*, 2003; Vigli *et al.*, 2003]. Making use of ¹H NMR spectra data of aliphatic and olefinic hydrogens, several structural parameters of papaya oil were determined. According procedures previously described by Carneiro (2006) several quality indicators were calculated. This includes average molecular weight, iodine, acidity and saponification index. The saturated fatty acid amount, degree of unsaturation (DU) and unsaturated fatty acid contents (UFA), as well the ratio of olefinic to aliphatic values (Roa) that indicate, in a more precise manner, the vegetable oil oxidation state were also determined. The results are presents in Table 1.

Table 1. Quality indicators derived from ^1H NMR spectroscopy of Papaya seed oil.

indicators	H-1 NMR*	Papaya seed oil**	Olive oil*
Triacylglycerol average molecular weight	857.84	856-884	864.24
Saponification index	196.14	154-162	194.63
Acidity values (%)	1.03	<1.0	0.48
Iodine values (%)	64.87	66-69	80.10
Saturated fatty acid	0.26	0.18-0.25	0.15
Degree of unsaturation	0.74	0.75-0.82	0.85
Linolenic acid [Ln, C18:3 ^{9,12,15} ω -3]	0.00	<0.01	0.00
Linoleic acid [L, 18:2 ^{9,12} ω -6]	0.01	<0.03	0.06
Oleic acid [O, C18:1 ⁹ ω -9]	0.73	0.72-0.78	0.79
Palmitoleic acid [PL, C16:1 ⁹ ω -9]	---	<0.01	---
Ratio of olefinic to aliphatic protons	0.47	---	0.67

(*): values calculated from ^1H NMR data of integrated spectra, according Carneiro *et al.*, (2006).

(**): According Puangsri *et al.*, (2005).

In Table 1, ^1H NMR spectra data of olive oil were included for comparison. The analysis shows that both oils are similar. The fatty acids contents, linolenic acid (0%), linoleic acid (1%) and oleic acid (73%), are similar to olive oil data find by Puangsri (2004): linolenic acid <1%, linoleic acid <3%, oleic acid 72-78%. This profile as well their acidity values (1.03%), and high degree of unsaturation (74%) qualify the papaya seed oil to human consume.

All data suggest that only one analysis of ^1H NMR allows the determination of a large number of parameters without manipulation of the oil samples. NMR spectroscopy is very useful in food analysis, allowing that a large number of samples can be studied in a very short period of time, providing a great deal of information and yield similar or superior performance to those obtained by classical procedures.

REFERENCES

- Agrianual*. Anuário da agricultura brasileira. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio. **2001**. p. 386-379.
- American Oil Chemistry Society*. Official methods and recommended practices. 4th ed. Champaign **1990**.
- Carneiro, P. I. B.; Reda, S. Y.; Beleski-Carneiro, E. B.; *Ann. Magn. Res.*; **2006**.
- Fagundes, G. R.; Yamanishi, O. K.; *Rev. Bras. Frutic.* **2001**, 23(3), p. 1-7.
- Guillén, M. D.; Ruiz, A.; *Trends in Food Sci. & Technol.*; **2001**, 12, 328-338.
- Mannina, L.; Sobolev, A. P.; Segre, A.; *Spectr. Europe*, **2003**, 15(3):6-14.
- Martin, A. J., Nisida, A. L. A. C., Medina, J. C., Baldini, V. L. S. Processamento: produtos, características e utilização. In: ITAL - Instituto de Tecnologia de Alimentos. Mamão: cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos. 2^a ed. Campinas: ITAL, **1989**. p. 255-334.
- Nathan, P. J. In *Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogeno-1 y de Carbono-13*; México, **1982**.
- Puangsri, T.; Abdulkarim, S.,M; Ghazali, H. M., *J. Food Lipids*, **2005**, 12(1):62-76.
- Vigli, G.; Philippidis, A.; Spyros, A.; Dais, P. ; *J. Agric. Food Chem*; **2003**, 57, 5715-5722.

VII Simpósio Latino-Americano de Ciência e Tecnologia de Alimentos (SLACA), 2007, Campinas, Brasil.

MONITORAMENTO DA TERMOXIDAÇÃO DE ÓLEO DE CANOLA POR RMN DE ^1H

TOLENTINO, M.C.; CAMLOFSKI, A.M.O.; CARNEIRO, P.I.B.

Universidade Estadual de Ponta Grossa - Caixa Postal 992, Cep 84030-900, Ponta Grossa, PR, Brasil. E-mail: mtolentino10@yahoo.com.br

A oxidação de lipídeos é um processo deteriorativo que leva os alimentos a apresentarem propriedades inaceitáveis para o consumidor, com perda do valor nutricional (KOLEVA et al., 2003; PIZZALE et al., 2002). Por isso é importante que seja realizado um controle rigoroso da qualidade dos óleos vegetais destinados ao consumo. Atualmente há um interesse para que se aplique novas técnicas analíticas com pouca manipulação da amostra e com resultados similares aos obtidos por técnicas clássicas. As técnicas espectroscópicas como a espectroscopia de infravermelho, ultravioleta e ressonância magnética nuclear aparecem como excelentes ferramentas. (HIDALGO; ZAMORA, 2003; GUILLÉN; RUIZ, 2001). O objetivo desse trabalho foi monitorar a termoxidação do óleo de canola por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de ^1H). O estresse térmico foi realizado em estufa a 63°C durante 30 dias. Analisando-se os sinais integrados dos espectros de RMN de ^1H foram determinados alguns parâmetros indicadores da qualidade do óleo, como o teor de ácidos graxos insaturados e a razão entre hidrogênios olefínicos e alifáticos (R_{oa}), que podem ser utilizados para a avaliação do grau de oxidação do óleo. Analisando-se as concentrações dos ácidos poliinsaturados, antes e após a termoxidação, observa-se que o ácido oléico (69,5% e 68,5%) é mais resistente à termoxidação que os ácidos linoléico (6,2% e 0,8%) e linolênico (13,6% e 4,8%). O índice R_{oa} é um bom indicador do estado de oxidação do óleo ($R_{oa\text{ inicial}} = 0,838$; $R_{oa\text{ final}} = 0,563$), indicando que o óleo de canola sofreu uma degradação de 30%. R_{oa} é um índice preciso, mais confiável que aqueles obtidos pelas técnicas clássicas, como o índice de peróxidos, pois se aplica a qualquer estágio da oxidação e não somente ao estágio inicial. Esses resultados mostram que a RMN de ^1H é uma ferramenta poderosa para avaliar alterações oxidativas em óleos vegetais.

Palavras-chave: RMN de ^1H , óleo de canola, termoxidação.