

Estudo da termo-oxidação de óleos vegetais por espectroscopia no ultravioleta-visível¹

Thermal oxidization study of vegetable oils by ultraviolet-visible spectroscopy

Seme Youssef Reda^{2*} e Paulo Borba Carneiro³

Resumo - O uso comum de se reutilizar óleos vegetais após aquecimentos sucessivos necessita de investigação adequada em testes de qualidade, visto que o óleo utilizado na fritura causa perda da qualidade inicial e é prejudicial à saúde. Nesse trabalho foi estudado se alguns óleos vegetais utilizados no preparo de alimentos permanecem apropriados quando submetidos à oxidação térmica, por meio de análise por espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-vis). Os índices de iodo, de saponificação e a acidez de cada amostra *in natura*, inicialmente foram determinados por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMH-H¹). Em seguida, as amostras foram submetidas a um sistema distinto de aquecimento em duas fases (Fases 1 e 2), em que na Fase 1, 200 mL de cada amostra *in natura* foi aquecida a 180 °C 4 h/dia, durante 7 dias e na Fase 2 a mesma quantidade de cada amostra *in natura* foi aquecida a 180 °C 8 h/dia, durante 10 dias, sendo analisadas a cada término de aquecimento diário por espectroscopia UV-vis. Os resultados dos cálculos do índice de iodo, de saponificação e da acidez por RMN-H¹, para as amostras *in natura* estavam dentro de valores preconizados pela ANVISA para óleos comestíveis, bem como as análises por UV-vis demonstraram que os óleos vegetais termo-oxidados, deterioram rapidamente, conforme observado no deslocamento batocrômico das amostras aquecidas e no aumento da intensidade de sua absorção na região de λ 230 nm.

Palavras-chave - Termo-oxidação de óleos vegetais. RMN-H¹. Análise de óleos por UV-vis.

Abstract - The reuse of vegetable oils after successive heating requires research of quality tests, because the oil used in frying causes loss of initial quality and is harmful to health. In this work was studied whether some vegetable oils used in the preparation food are appropriate when subjected to thermal oxidization, by ultraviolet-visible spectroscopy analysis (UV-vis). The iodine value, saponification index and acidity value of each sample *in natura* originally were determined by hydrogen nuclear magnetic resonance (1H-NMR). Then, the samples were subjected to a separate system of heating in two phases (Phases 1 and 2): in Phase 1, 200 mL of each sample *in natura* was heated to 180 °C 4h/day for seven days and in Phase 2 the same amount of each sample *in natura* was heated to 180 °C 8h/day for ten days. The samples were reviewed daily, at each end of heating, by UV-vis spectroscopy. The results of the iodine value, saponification index and acidity value by 1H-NMR calculations for the samples *in nature* were within the values set up by ANVISA for edible oils, as well as the analyses by UV-vis demonstrated that vegetable oils thermal oxidized deteriorate rapidly as seen in the batocromic displacement of the samples heated and increasing the absorption intensity in the λ 230 nm place.

Key words - Thermal oxidization. Vegetable oils. 1H-NMR.

* Autor para correspondência

¹Recebido para publicação em 10/09/2007; aprovado em 17/12/2008

Trabalho derivado de Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos – Universidade Estadual de Ponta Grossa

²Farmacêutico Bioquímico, M. Sc., Prof. do Dep. de Nutrição, Faculdade Campo Real, Rua: Prof. Becker, 3392 Guarapuava, PR, sreda@bol.com.br

³Farmacêutico Bioquímico, D. Sc., pesquisador Prof. do Dep. de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, pibe@uol.com.br

Introdução

Todos os métodos espectroscópicos baseiam-se nos efeitos da radiação sobre a matéria. Na espectroscopia de ultravioleta (UV) se utiliza radiação de baixo comprimento de onda (λ 200 – 400 nm) e alta energia, onde a resposta é analisada por espectrofotômetros.

A amostra – para ser observável – deve apresentar estrutura molecular adequada, ou seja, presença de ligações insaturadas, ligações π (ligações duplas ou triplas) (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998). A radiação na frequência do UV, ao incidir sobre a amostra, excita os elétrons das ligações π , fazendo com que estes elétrons saltem de um orbital de menor energia para outro de maior energia, levando-os com isso, a um estado ativado (GLAZER, 1990). O retorno dos elétrons ao estado fundamental libera a energia absorvida sob a forma de radiação, detectada pelo espectrofotômetro que gera um gráfico (o espectro) da quantidade de radiação absorvida (absorbância) pelo comprimento de onda em nanômetros (nm).

Assim, quando uma amostra de óleo vegetal possui ligações π , o aparelho gera um gráfico cujo pico máximo de absorbância pelo comprimento de onda, é característico da amostra em estudo (OWEN et al., 2003). Isto é possível porque os óleos vegetais possuem intrinsecamente uma constituição molecular homogênea, de triacilgliceróis e ácidos graxos insaturados. Assim, quando o óleo sofre qualquer tipo de alteração, como oxidação, por exemplo, o espectro gerado mostra um deslocamento de banda (efeito batocrômico) e aumento da intensidade da absorção (Abs), acusando de imediato que o óleo não está no seu estado mais puro (ADHVARYU et al., 1998).

Os óleos vegetais de soja, milho, canola e o azeite de oliva têm grande importância na alimentação humana, pois os ácidos graxos monoinsaturados encontrados nesses alimentos são mais resistentes ao estresse oxidativo e uma dieta rica desses ácidos graxos faz com que as concentrações de colesterol total sejam reduzidas. (KRIS-ETHERTON et al, 2001).

No entanto, geralmente são comumente reutilizados em processos de fritura e quando consumidos podem proporcionar a formação de produtos inaceitáveis pelo sabor residual de ranço, sensação excessivamente gordurosa ao paladar e alteração da textura, além de aumentarem o risco de doenças cardiovasculares (PINTO et al., 2003).

Diante da importância dos óleos e do azeite de oliva na alimentação humana e das conseqüências da reutilização para a saúde esta pesquisa teve o objetivo de avaliar o grau de transformações desses óleos vegetais frente a um aquecimento constante, em ar atmosférico, por espectroscopia por UV-Vis.

Material e métodos

Nos experimentos foram utilizados os óleos refinados de soja (*Glycine max*), milho (*Zea mays*) e canola (*Brassica campestris*) cedidos pela empresa CARGILL do Brasil® e azeite de oliva (*Olea europea*) extra virgem proveniente da primeira prensagem a frio, 0,75% de acidez e acondicionado em embalagem de vidro adquirido no mercado local. Os demais reagentes e solventes eram PA e foram utilizados sem qualquer purificação.

Termo-oxidação dos óleos

Os óleos e o azeite, em volumes de 200 mL de cada amostra, foram termo-oxidados a 180 °C (temperatura normal de fritura) em frasco de vidro refratário (PIREX®), aquecido em anel de cerâmica refratária, com resistência exposta, em dois experimentos distintos, denominados: Fase 1 e Fase 2. Na Fase 1 o tempo de aquecimento foi de 4 h/dia pelo período de sete dias (tempo médio de reutilização de óleos vegetais). Na Fase 2 foi empregado o tempo de 8 h/dia, por 10 dias. Os dois experimentos foram conduzidos em triplicata e após o término de cada fase do experimento, os dados foram confrontados.

Análise por espectroscopia ultravioleta

Nas análises foram utilizadas soluções de óleos vegetais em isopropanol, 10^{-4} e 10^{-7} M em ácido oléico, na Fase 1 e na Fase 2, respectivamente. As curvas de absorção foram determinadas na região de λ 200-800 nm em espectrofotômetro Shimadzu, modelo MultiSpec 1501.

Ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1

Cerca de 10 a 20 mg de amostra dos óleos e do azeite, foram dissolvidas em 0,7 mL de CDCl_3 (clorofórmio deuterado) e seus espectros de RMN foram registrados em espectrômetro Varian, modelo Mercury-300 MHz, operando no modo FT à temperatura ambiente.

Na ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN-H^1) para os núcleos de Hidrogênio-1 foram utilizados os seguintes parâmetros: pulso de 45°; tempo de relaxação de 1.359 s; tempo de aquisição de 3,64 s; largura de varredura de 4.120 Hz, largura de linha de 0.3 Hz. Foram acumuladas 16 repetições para cada decaimento induzido livre (FID).

Os índices de iodo, de saponificação e a acidez das amostras de óleos vegetais (sem aquecimento) foram calculados segundo os espectros integrados de RMN-H^1 , conforme as seguintes equações:

O índice de iodo por RMN-H^1 foi calculado segundo Reda (2006) pela seguinte equação:

$$I.I = \frac{126,96 \times V}{PM} \times 100 \quad (1)$$

Em que:

I.I = índice de iodo; V= número de hidrogênios vinílicos;
PM = peso molecular médio dos triacilgliceróis;

O peso molecular médio dos triacilgliceróis foi obtido segundo a Equação 2 (RED, 2006);

$$PM = 119,70 + 7,036 \times T + 5,983 \times V \quad (2)$$

No qual:

T = número total de hidrogênios;

O índice de acidez foi calculado segundo Reda (2006), conforme a equação 3:

$$A = 3,057 \times (R_{o,a})^2 - 6,3181 \times (R_{o,a}) + 3,3381 \quad (3)$$

Em que:

$R_{o,a}$ = relação entre os hidrogênios olefinicos (vinílicos) e alifáticos.

O cálculo da relação hidrogênios olefinicos/alifáticos foi obtido segundo Carneiro (2005), demonstrado na Equação 4:

$$R_{o,a} = \frac{V}{a + b} \quad (4)$$

No qual: V= número de hidrogênios vinílicos; a + b= hidrogênios metílicos;

O índice de saponificação (IS) foi calculado segundo a Equação 5 (CARNEIRO, 2005):

$$IS = (-0,2358) \times PM + 398,42 \quad (5)$$

Resultados e discussão

O índice de iodo, índice de saponificação e a acidez dos óleos *in natura* foram determinados por RMN-H¹ e são apresentados na Tabela 1.

Os valores do índice de iodo e da acidez de todos os óleos (*in natura*) determinados por RMN de hidrogênio estão dentro dos parâmetros preconizados pela ANVISA, assim como o índice de saponificação, com exceção do IS

para o óleo de canola que apresentou valor ligeiramente superior. Sendo o índice de saponificação um valor que está relacionado com a quantidade de ácidos graxos livres em uma amostra de óleo, esse aumento, foi ocasionado pelos processos foto-oxidativos. Assim, o óleo de canola apresentou índice de saponificação superior ao preconizado pela ANVISA (ANVISA, 1999).

Tais determinações foram realizadas conforme o estudo dos diversos deslocamentos dos hidrogênios dos espectros integrados das amostras, conforme demonstrado na Tabela 2.

Análise espectroscópica por ultravioleta – visível (UV-vis) dos óleos vegetais termo-oxidados.

A espectroscopia de ultravioleta é útil para se observar a presença de insaturações em compostos orgânicos. Ligações duplas carbono-carbono, isoladas, absorvem próximo de 200 nm, com freqüente deslocamento batocrômico ou hipsocrômico, dependendo dos grupamentos cromóforos ligados ao sistema de elétrons π (GLAZER, 1990).

Os espectros de ultravioleta dos óleos estudados e termo-oxidados são apresentados nas Figuras 1 a 4 (Fase 1) e 5 a 8 (Fase 2).

Todos os espectros, para todos os óleos estudados e não aquecidos na Fase 1, mostram absorção em 230 nm, devido às ligações duplas carbono-carbono presentes nos ácidos oléico, linoléico e linolênico do triacilglicerol dos óleos e que contribuem para o seu alto grau de insaturação. Estas observações estão de acordo com Owen et al. (2003) para espectros de ultravioleta de compostos insaturados e também mostram o progressivo deslocamento batocrômico do espectro à medida que a termo-oxidação aumenta, com o aumento do tempo de aquecimento.

Nota-se que no estado *in natura* (óleo não aquecido e em cor preta nos gráficos), os óleos apresentam um pico de absorbância abaixo de 1.0 (Abs < 1.0), demonstrando que o principal composto capaz de gerar pico de absorbância nessa região é somente o triacilglicerol, que compõe os óleos. Contudo, com a progressiva termo-oxidação, há um aumento no pico de absorção e do deslocamento no espectro, caracterizando a existência de compostos

Tabela 1 – Resultados das determinações dos índices de iodo, saponificação e acidez determinados por RMN-H¹ em óleos vegetais *in natura* e os limites preconizados pela ANVISA para cada óleo

Determinações	Canola	ANV	Milho	ANV	Soja	ANV	Oliva	ANV
I.I	114,30	110-126	119,47	103-128	136,48	120-143	77,98	75-94
Acidez	0,1	≤ 0,3	0,1	≤ 0,3	0,1	≤ 0,3	0,5	≤ 2,0
IS	193,0	182-193	195,00	187-195	194,51	189-195	190,48	184-196

Tabela 2 – Valores dos deslocamentos dos diversos hidrogênios dos óleos vegetais (*in natura*), obtidos dos espectros integrados de RMN de hidrogênio

	Óleo de milho	Azeite de oliva	Óleo de soja	Óleo de canola
Tempo	0	0	0	0
k + j	9,16	6,23	10,29	9,01
i + h	4,30	3,99	4,30	4,26
g	3,09	0,40	4,34	2,51
f	6,41	5,95	6,34	6,13
e	10,42	10,26	10,32	11,02
d	6,03	6,28	7,16	6,23
c	52,65	58,92	49,38	52,78
b	0,07	0,09	0,41	0,85
a	7,87	7,88	7,45	7,21
a + b	7,94	7,97	7,87	8,06
$\Sigma =$	100,0	100,0	100,0	100,0
Área/H	1,075	0,997	1,075	1,065
Vinil	8,085	5,232	9,215	7,46
PM	833,51	856,44	839,34	835,06

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

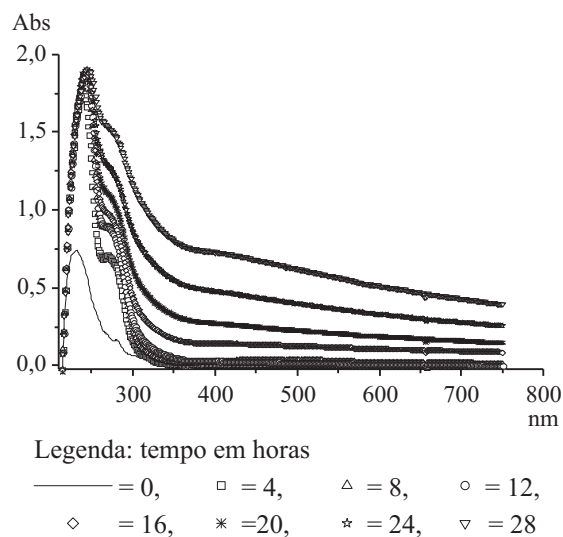


Figura 1 - Espectro UV-vis do óleo de canola termo-oxidado

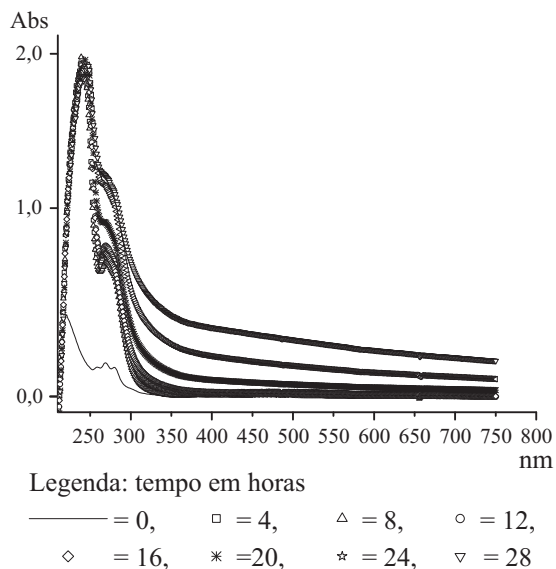


Figura 2 - Espectro UV-vis do óleo de milho termo-oxidado

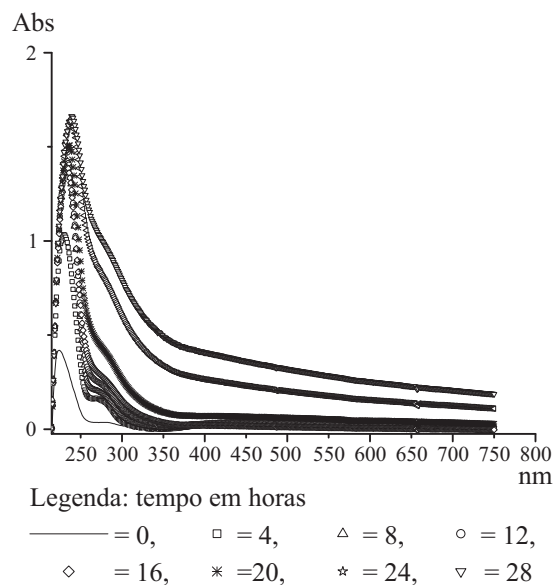


Figura 3 - Espectro UV-vis do azeite de oliva termo-oxidado

formados a partir do triacilglicerol, sob a ação de radicais livres, advindos do processo termo-oxidativo.

Tais compostos são constituídos de ligações duplas capazes de absorver na região do ultravioleta, em que possivelmente os ácidos graxos insaturados dos óleos sofrem reações do tipo Diers-Alder para a formação de compostos insaturados, como os monômeros cíclicos e que também servem de base para a formação de polímeros, potencialmente tóxicos (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998).

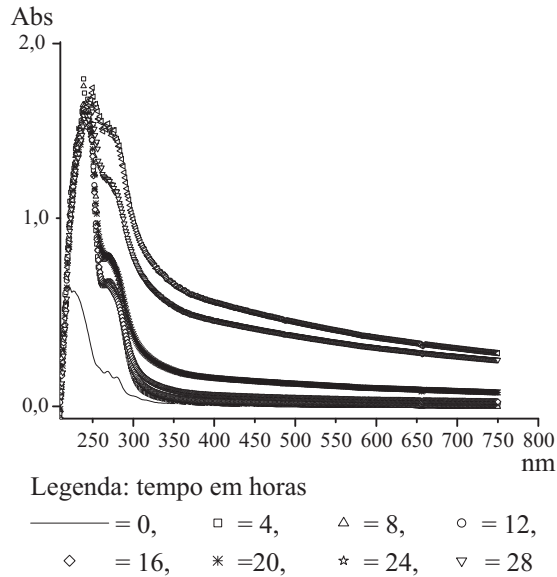


Figura 4 - Espectro UV do óleo de soja termo-oxidado

Essa evidência pode ser melhor observada na Fase 2 do estudo. Nas Figuras 5 a 8, são apresentados os espectros sobrepostos dos óleos de canola, milho, oliva e soja, onde se observam o forte aumento da intensidade da absorção e do deslocamento batocrômico de todos os óleos estudados, mesmo os óleos nessa Fase terem 1/1000 da diluição da Fase 1 (10^{-7} M).

Todos os espectros da Fase 2 mostram um pronunciado efeito batocrômico inerente a progressiva

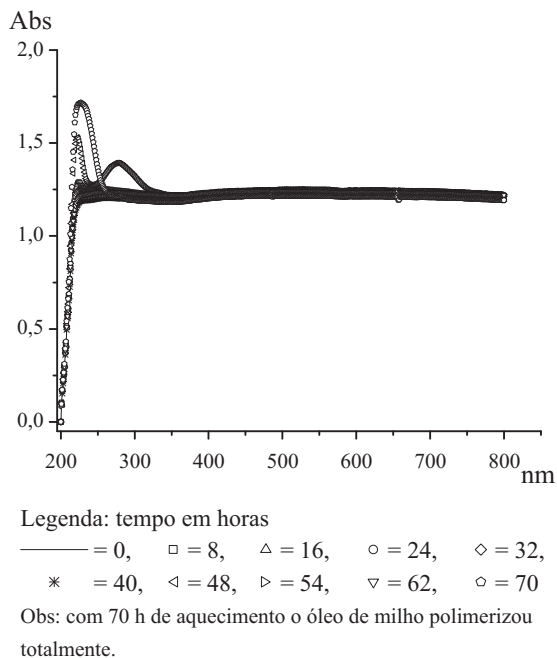


Figura 5 - Espectro UV-vis do óleo de canola termo-oxidado

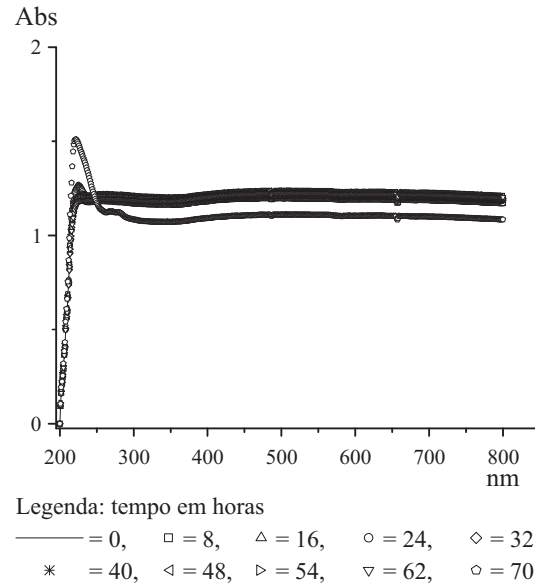


Figura 6 - Espectro UV-vis do óleo de milho termo-oxidado

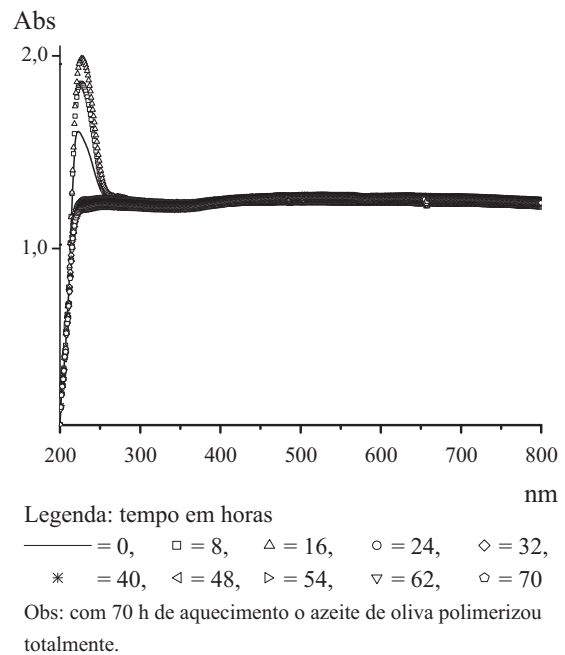
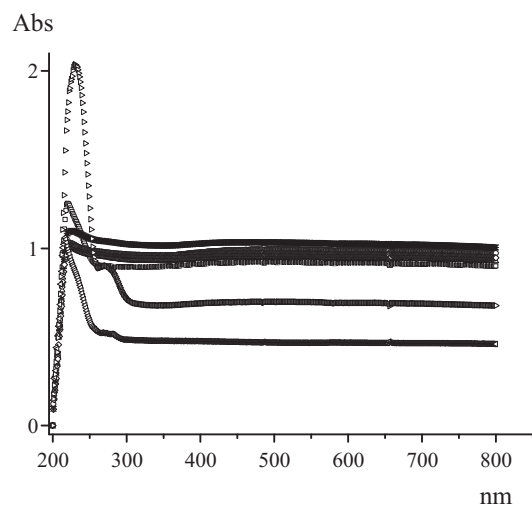


Figura 7 - Espectro UV do azeite de oliva termo-oxidado

termo-oxidação, processo que leva a formação de peróxidos e formação de isômeros *trans*, conjugados, o que necessariamente aumenta a intensidade e posição da banda de absorção para comprimentos de onda maiores (*o efeito batocrômico*). Estas observações são compatíveis com as alterações estruturais que ocorrem nos ácidos graxos insaturados livres ou esterificados em triacilgliceróis



Legenda: tempo em horas

— = 0, □ = 8, △ = 16, ○ = 24, ◇ = 32,
* = 40, ◁ = 48, ▷ = 54,

Obs: com 54 h de aquecimento o óleo de soja polimerizou totalmente.

Figura 8 - Espectro UV do óleo de soja termo-oxidado

durante o processo termo-oxidativo, devido às reações de isomerização, com a conseqüente formação de sistemas conjugados, ou seja, reações de epoxidação e peroxidação. Isso ficou evidenciado ao se observar que nenhum óleo vegetal estudado nessa fase chegou até o tempo final, previamente estipulado na metodologia, sofrendo total polimerização com 70 horas de aquecimento. E dentre eles, o óleo de soja se mostrou menos resistente ainda ao processo termo-oxidativo (Figura 8), polimerizando totalmente com 54 horas de aquecimento.

Portanto, por meio dos espectros de UV-vis foi possível monitorar a qualidade dos óleos em estudo, sendo que os óleos não aquecidos (*in natura*) apresentam $A \leq 0,7$ em $\lambda = 230$ nm, numa diluição de 10^{-4} M (1:1000) em contraste com óleos deteriorados que apresentam $A > 0,7$ e $\lambda > 230$ nm, como demonstrado em todos os espectros dos óleos aquecidos.

Assim é possível fazer uma análise qualitativa de qualquer óleo vegetal, em que óleos próprios para o consumo devem apresentar absorbância (Abs) até 0,7 e $\lambda = 230$ nm, numa diluição de 10^{-4} M em isopropanol.

Conclusões

Os óleos vegetais de canola, milho e soja e o azeite de oliva, sob estresse térmico, nas condições adotadas de tempo e temperatura de aquecimento, deterioraram rapidamente, conforme observado no deslocamento

batocrômico das amostras aquecidas e no aumento da intensidade de sua absorção na região de λ 230 nm. Os resultados dos cálculos do índice de iodo, de saponificação e da acidez por RMN de hidrogênio, para as amostras *in natura* estavam dentro de valores preconizados pela ANVISA para óleos comestíveis.

A espectroscopia por UV-vis mostrou-se eficaz no controle de qualidade de óleos vegetais estudados, sendo seu uso recomendado na monitorização do estado físico de óleos e azeites. Foi possível determinar o alto grau de deterioração dos óleos aquecidos, principalmente nos tempos finais de aquecimento, contra-indicando sua reutilização, pois após aquecimentos sucessivos, sofrem perda de sua qualidade inicial conforme demonstrado pela espectroscopia por UV-vis.

Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Resolução n. 482, de 23 de Setembro de 1999. Regulamento técnico sobre óleos e gorduras vegetais. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm >. Acesso em: 10 ago. 2007.
- ADHVARYU, A. et al. Spectroscopic studies of oxidative degradation of base oils. **Energy & Fuels**, v. 12, p. 1369-1374, 1998.
- CARNEIRO, P. I. B.; REDA, S. Y.; CARNEIRO, E. B. B. H-1 NMR Characterization of Seed Oils from Rangpur Lime (Citrus limonia) and Sicilian Lemon (Citrus limon). **Annals of Magnetic Resonance**, v. 04, n. 03, p. 64-68, 2005.
- GLAZER, A. N. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. **Methods in Enzymology**, v.186, p. 161-168, 1990.
- KRIS-ETHERTON, P. et al. **AHA conference proceedings: Summary of the scientific conference on dietary fatty acids and cardiovascular health: conference summary from the nutrition committee of The American Heart Association**. Circulation, v. 103, n. 07, p. 1034-1039, 2001.
- OWEN, R. W. et al. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, p.703-717, 2003.
- PINTO, E. P. et al. Características de batata frita em óleos com diferentes graus de insaturação. **Boletim do CEPPA**, v. 21, n. 02, p. 293-302, 2003.
- REDA, S. Y.; CARNEIRO, P. I. B. Physicochemical parameters of maize oil in natura and after heating calculated by means of the PROTEUS RMN H1 program. Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra, **Ciências Agrárias e Engenharias**, v. 02, n. 02, p. 31-36, 2006.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 6. ed. New York: John Wiley, 1998.