

**PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO ÓLEO DE MILHO *in natura*
E SOB AQUECIMENTO CALCULADO PELO
PROGRAMA PROTEUS RMN H1**

**PHYSICOCHEMICAL PARAMETERS OF MAIZE OIL *in natura*
AND AFTER HEATING CALCULATED BY MEANS OF THE
PROTEUS RMN H1 PROGRAM**

Seme Youssef Reda¹, Paulo Irajara Borba Carneiro²

¹ Autor para contato: Universidade Federal do Paraná - UFPR, Programa de Doutorado em Processos Biotecnológicos, Curitiba, PR, Brasil; e-mail: sreda@bol.com.br

² Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG, Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - CIPP, Campus em Uvaranas, Ponta Grossa, PR

Recebido para publicação em 08/09/2005

Aceito para publicação em 06/06/2006

RESUMO

A análise de óleos vegetais pelos métodos físico-químicos tradicionais pode apresentar erros, muitas vezes devido às deficiências inerentes à metodologia empregada. A ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 (¹H RMN) resolve essa deficiência com grande vantagem. Neste estudo, foram calculados o índice de iodo, o peso molecular médio e o índice de saponificação do óleo de milho *in natura* e sob aquecimento, por meio do programa PROTEUS RMN H1, escrito especialmente para esse fim. O programa tornou os cálculos mais rápidos e mostrou ser útil em determinações físico-químicas de óleos vegetais.

Palavras-chave: ¹H RMN, programa proteus, óleo de milho

ABSTRACT

The analysis of vegetal oils by traditional physicochemical methods can present errors due to deficiencies inherent to the methodology employed. The nuclear magnetic resonance of hydrogen-1 (¹H RMN) overcomes these deficiencies with great advantage. In this study, we determined the iodine value, the molecular weight and the saponification index of maize oil *in natura* and after heating, by means of the program PROTEUS RMN H1, especially written for this purpose. The program allowed for faster calculations and showed to be useful in determining the physico-chemical properties of vegetal oils.

Key words: ¹H NMR, proteus program, maize oil

Introdução

Os óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água, de origem animal ou vegetal, formados predominantemente por ésteres de triacilgliceróis, produtos resultantes da esterificação entre o glicerol e ácidos graxos (Moretto; Fett, 1998). Os triacilgliceróis são compostos insolúveis em água, e à temperatura ambiente possuem uma consistência de líquido para sólido. Quando estão sob forma sólida são chamados de gorduras e quando estão sob forma líquida são chamados de óleos (Giese, 1996; Faria *et al.*, 2002).

Alimentos contendo óleos e gorduras deterioram durante o armazenamento em atmosfera de oxigênio, devido à auto-oxidação. Mas quando são aquecidos a altas temperaturas, o processo da oxidação é acelerado, ocorrendo reações de oxipolimerização e decomposição termo-oxidativa, onde o controle de qualidade é de grande interesse (Dobarganes, 1989; Kowalski, 2003).

O método convencional usado para determinar o grau de insaturação de óleos vegetais é o índice de iodo, que mede o número de ligações duplas existentes no óleo, por meio de métodos volumétricos. O índice de iodo não é uma medida quantitativa, é um número empírico que é útil na definição do grau de insaturação, porém sujeito a erros, principalmente em óleos termo-estressados (Joseph-Nathan, 1982).

De outro lado, utilizando-se métodos instrumentais mais precisos como a ressonância magnética nuclear (RMN) é possível, no uso do espectro de RMN de ^1H integrado, obter a medida direta do grau de insaturação e também o peso molecular médio do triacilglicerol e o índice de saponificação de qualquer óleo vegetal.

Neste trabalho foi descrita uma metodologia alternativa para calcular, entre outros parâmetros, o índice de iodo do óleo de milho *in natura* e sob aquecimento, utilizando-se um programa especialmente desenvolvido para este fim chamado PROTEUS, onde os campos de entrada de dados do programa foram alimentados com os dados experimentais obtidos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio-1 integrado, no estudo do óleo de milho.

Material e Método

Óleo vegetal

Foi utilizado óleo refinado de milho (*Zea mays*) cedido pela empresa CARGILL.

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

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

RMN de ^1H : para os núcleos de hidrogênio-1 foram utilizados os seguintes parâmetros de aquisição: pulso: 45° , tempo de relaxação: 1,359 s; tempo de aquisição: 3,64 s; largura de varredura: 4,120 Hz, largura de linha 0,3 Hz. Foram acumuladas 16 repetições para cada decaimento induzido livre (FID).

Estresse térmico do óleo milho

Foi termo-estressado 200 ml de óleo de milho, em frasco de vidro refratário (PIREX[®]), aquecido em anel de cerâmica refratária, com resistência exposta, 4h/dia, durante 7 dias.

Programa PROTEUS RMN ^1H

PROTEUS (Figura 2) é um programa que foi desenvolvido para agilizar os cálculos do índice de iodo, peso molecular médio e índice de saponificação do óleo de milho por meio dos dados obtidos dos espectros integrados de RMN de ^1H . O programa foi escrito em Visual Basic 5.0, onde os campos de entrada dos dados de (i + h), (k + j), e T (Total de prótons) correspondem às curvas integrais dos espectros de RMN de ^1H (Figura 1). Os campos prótons olefínicos e total de prótons correspondem as Equações II e III. O peso molecular médio (PM, Equação IV) foi então calculado automaticamente, assim como o índice de iodo (I.I, Equação V) e o índice de saponificação (IS), que corresponde a Equação VI.

Resultados e discussão

Do espectro de RMN de ^1H integrado (Figura 1), obtém-se a medida direta do grau de insaturação de modo preciso. Todos os hidrogênios olefínicos mostram deslocamento químico (δ) entre 5,40-5,26 ppm

(k). Todos os hidrogênios metílicos – parte saturada da molécula – mostram deslocamento químico entre (δ) 0,80 e 1,00 ppm (a + b). Portanto, o número total de insaturação, em número de ligações duplas/mol, é a medida direta da área dos picos normalizados e integrados dos hidrogênios que geraram aqueles sinais, naquelas regiões do espectro de RMN de H1 (Mannina *et al.*, 2003). A RMN de H1 é uma técnica extremamente sensível à densidade eletrônica e à população de hidrogênios que gerou o sinal. Hidrogênios em ambientes eletrônicos diversos mostram diferentes deslocamentos químicos e a intensidade do sinal é estritamente proporcional à quantidade de hidrogênios.

Como o espectro de RMN de H1 dos triacilgliceróis é bem resolvido, observando-se sinais distintos e característicos para os prótons olefínicos, do glicerol e alquílicos, que mostram absorção em regiões

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

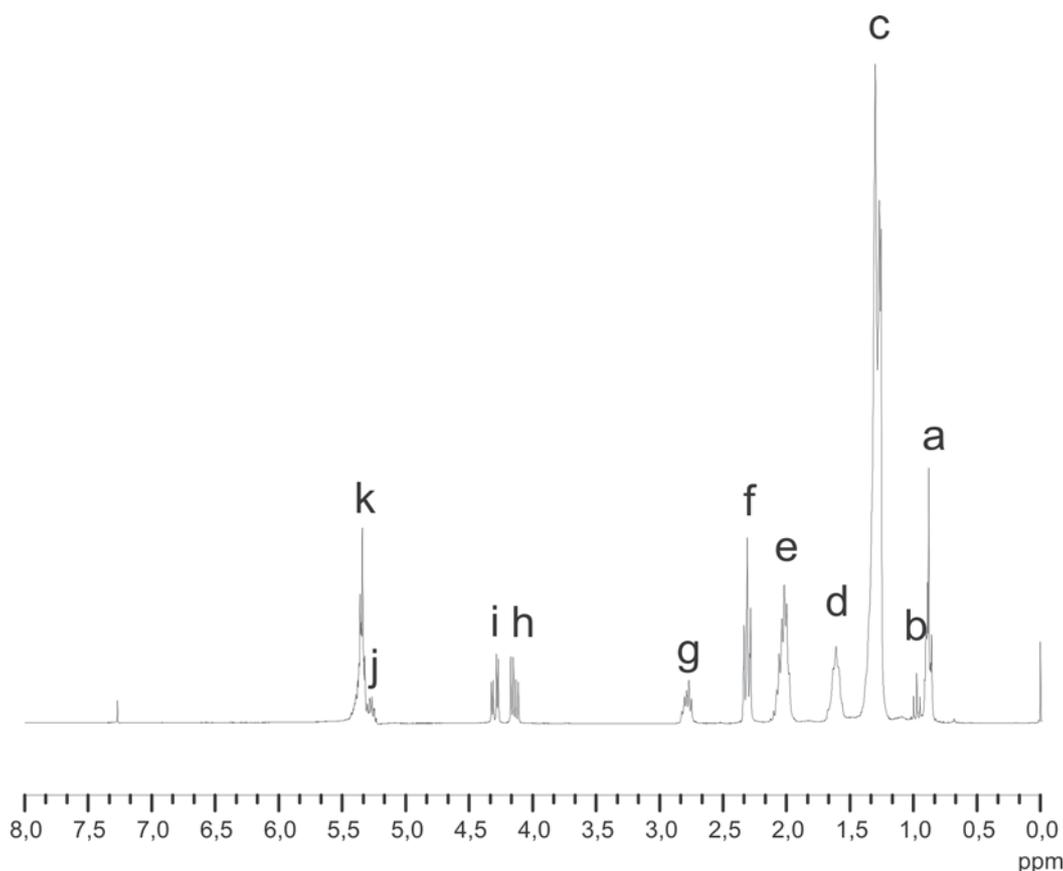


Figura 1 - Espectro de RMN de H¹ genérico de óleo vegetal.

Legenda: a = prótons metílicos; b = prótons metílicos do ácido linolênico; c = prótons metilênicos dos ácidos graxos do triacilglicerol; d = prótons β -carboxílicos; e = prótons alílicos externos; f = prótons α -carboxílicos; g = prótons alílicos internos; h + i = prótons metilênicos do glicerol; j = próton H-2 metilênico do glicerol; k = prótons olefínicos. A inserção mostra os sinais dos prótons H¹ da metila do ácido linolênico em 0,98 ppm [sinal em b].

Contudo, a curva de integração dos prótons olefínicos inclui o próton metílico do glicerol em C-2 e que deve ser considerado nas equações obtidas a partir do contido nas curvas de integração, e que permitam o cálculo correto do índice de iodo por RMN de H^1 , segundo as equações:

Cálculo da área de um próton (A_p) (Equação I):

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

Cálculo de prótons olefínicos (Equação II):

$$V = \frac{[k+j] - A_p}{A_p} \quad \text{(II)}$$

onde:

(k + j) = representa a área correspondente aos prótons vinílicos, obtidos por leitura direta do espectro integrado;

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

Cálculo do total de prótons (T) (Equação III):

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

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

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

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

Cálculo do índice de iodo por RMN H^1 (Equação V):

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

onde:

I.I = índice de iodo

V = número de prótons vinílicos (olefínicos)

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

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

O índice de iodo é a medida do grau de insaturação de um óleo, definido pela quantidade de halogênio absorvido em 100 g de amostra. Está relacionado com a quantidade de ligações duplas presentes no óleo vegetal e a redução observada neste índice se deve à quebra de ligações duplas resultantes de reações de polimerização, ciclização e oxidação, o que aumenta o grau de saturação do óleo, tornando-o por fim, impróprio para o consumo humano. Sob determinadas condições, o iodo pode ser introduzido quantitativamente nas ligações duplas dos ácidos graxos insaturados dos triacilgliceróis e proporciona uma medida do grau de insaturação da amostra. Quanto maior for o índice, maior será a insaturação do óleo vegetal. Ao se utilizar iodo (halogênio) para reagir especificamente com as ligações duplas, esbarra-se em algumas dificuldades: uma é que o iodo sempre vai sofrer alguma interferência da luz, reduzindo sua participação na reação de halogenação. Outra é que a adição devido a ligações duplas isoladas, ou conjugadas podem resultar em algumas ligações duplas intactas sem a adição do iodo devido à adição 1,2 e 1,4, resultando em valores menores do que o normal (Joseph-Nathan, 1982). Por isso, valores mais consistentes podem ser obtidos por RMN de H^1 , exemplificado neste trabalho pelo programa PROTEUS RMN H^1 (Figura 2).

O cálculo do índice de saponificação (IS) pode ser obtido pela Equação VI:

$$\text{IS} = (PM \times -0,2358) + 398,42 \quad \text{(VI)}$$

onde:

IS = índice de saponificação

PM = peso molecular médio dos triacilgliceróis

A Tabela 1 apresenta os valores da integração dos sinais dos hidrogênios, obtidos por meio das curvas de integração dos espectros de RMN de H^1 do óleo de milho *in natura* e com 28 horas de aquecimento (180-200°C).

Tabela 1 - Valores de integração dos sinais dos hidrogênios dos triacilgliceróis obtidos da curva de integração do espectro de RMN de H^1 do óleo de milho.

t(h)	k+j	i+h	g	f	e	d	c	b	a	a+b		vinil	$\Sigma=H$	I.I	PM (g.mol ⁻¹)
0h	9,16	4,3	3,09	6,41	10,42	6,03	52,64	0,34	7,60	7,94	1,075	7,52	90,13	119,47	798,9
28h	5,58	4,2	1,38	6,73	7,72	9,33	56,19	0	8,87	8,87	1,050	4,31	95,23	49,63	697,3

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

Na Tabela 1, é possível observar uma nítida diminuição do índice de iodo e do peso molecular dos triacilgliceróis que compõem o óleo de milho, com 28 horas de aquecimento, devido à quebra de ligações duplas resultantes de reações de polimerização, ciclização e oxidação, tornando-o menos impróprio para o consumo.

Observa-se uma forte variação da intensidade dos sinais dos hidrogênios do triacilglicerol com o aquecimento progressivo. Fica evidente o contínuo decréscimo do teor de ácido linolênico (ω -3, b), cuja concentração vai a zero após 28 horas de aquecimento. Outro efeito importante da termo-oxidação pode ser observada nas regiões dos prótons alílicos internos (g)

e externos (e). Estes prótons que correspondem aos ácidos linoléico e linolênico, que sob prolongado aquecimento mostram redução das intensidades. Observa-se que o grau de insaturação do óleo é sensivelmente afetado, pelo aquecimento, pois diminui a intensidade dos hidrogênios olefínicos. Logo, pela análise do espectro integrado de RMN de H^1 de qualquer óleo vegetal, é possível fazer uma estimativa rápida, da qualidade do óleo; igualmente as intensidades dos sinais dos hidrogênios olefínicos (d; f) aumentam com a deterioração do óleo. Foi possível calcular o peso molecular médio (PM) do óleo *in natura* e sob aquecimento por RMN, condição que é limitante para os métodos tradicionais aos óleos termo-oxidados.

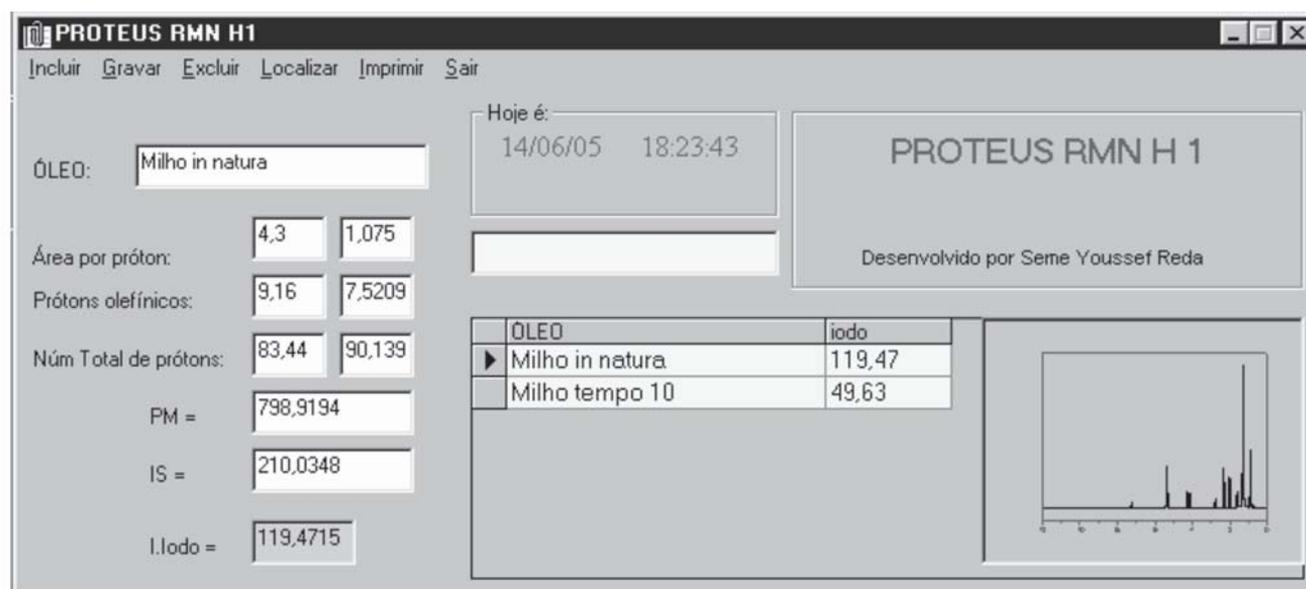


Figura 2 - Característica do programa PROTEUS RMN H1.

Conclusões

O programa PROTEUS RMN H¹ mostrou-se muito útil nos cálculos dos parâmetros físico-químicos do óleo de milho (índice de iodo, peso molecular médio e índice de saponificação), em qualquer condição, facilitando os cálculos e agilizando a análise dos dados, por meio do espectro de RMN integrado de hidrogênios.

REFERÊNCIAS

1. DOBARGANES, M. C.; PÉREZ-CAMINO, M. C.; MÁRQUEZ-RIZ, G. Determinación de compuestos polares en aceites y grasas de fritura, **Grasas y Aceites**, v.1, p.35 – 38, 1989.
2. FARIA, A. A.; LELES, M. I. G.; IONASHIRO, M. Estudo da Estabilidade Térmica de Óleos e Gorduras Vegetais por TG/DTG e DTA, **Ecl. Quím.**, São Paulo, v. 27, p. 111-119, 2002.
3. GIESE, J. Fats, Oils, and Fat Replaces. **Food Technology - Especial Repot**, 1996.
4. JOSEPH-NATHAN, P. **Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogenio-1 y de Carbono-13**. Intituto Politécnico Nacional: México, 1982.
5. KOWALSKI, B. Evaluation of the Stability of Some Antioxidants for Fat-Based Foods, **Thermochemica Acta**, Warsaw, v.177, p. 9-14, 1990.
6. MANNINA, L.; SOBOLEV, A. P.; SEGRE, A. Olive oil as seen by NMR and chemometrics, **Spectroscopy Europe**, 2003.
7. MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais**. São Paulo: Varela, 1998. 150p.
8. VIGLI, G.; PHILIPDIS, A.; SPYROS, A. Classification of Edible Oils by Employing ³¹P and ¹H NMR Spectroscopy in Combination with Multivariate Statistical Analysis. A Proposal for the Detection of Seed Oil Adulteration in Virgin Olive Oils, **J. Agric. Food Chem.**, v.52, n. 19, p. 5715 - 5722. 2003