

FOODÔMICA POR RMN DE ¹H PARA MONITORAMENTO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE MARGARINAS SUBMETIDAS AO TRATAMENTO TÉRMICOVinícius S. Pinto^{a,*}, Anna K. Nery^a e Luciano M. Lião^a^aInstituto de Química, Universidade Federal de Goiás, 74001-970 Goiânia – GO, Brasil

Recebido em 08/04/2019; aceito em 15/07/2019; publicado na web em 20/08/2019

FOODMICS BY ¹H NMR FOR MONITORING OF OXIDATIVE STABILITY OF MARGARINES SUBMETED OF HEAT TREATMENT. Foods with high lipid contents are susceptible to deterioration by oxidative processes that lead to the formation of food rancid. Determining the chemical nature of lipid oxidation products presents a nutritional and health interest due to the possibility of formation of compounds related to the development of degenerative diseases such as Parkinson's and Alzheimer's. In this context, the present study describes the use of nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and principal component analysis (PCA) to monitor the formation of oxidation products in Brazilian table margarines subjected to the heat treatment at 80, 100, 120, 140, 160 and 180 ° C. Lipid profiles were characterized by ¹H NMR experiments. Changes due to heat treatment were identified by NMR-PCA models, which indicated triacylglycerol (TAG) as the main descriptor from 160 ° C. At this temperature, were identified signals evolution in ¹H NMR spectra whose chemical shifts (δ) indicated the formation of aldehydes and dienes. The results were useful to highlight the need for efficient methods to maintain the oxidative stability of this type of food widely used in industrial and home cooking.

Keywords: lipid oxidation; oxidation products; ¹H NMR; PCA.**INTRODUÇÃO**

As margarinas são matrizes alimentares ricas em lipídios em emulsão estável, destinadas à alimentação humana. De acordo com a portaria n° 372 de 04 de setembro de 1997 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), as margarinas comercializadas no Brasil devem apresentar teor de lipídios totais entre 80-90% (m/m), sendo o teor de gorduras lácteas, quando presente, inferior a 3% (m/m) do teor de lipídios totais.¹ Comparada a manteiga, a margarina apresenta benefícios relacionados aos menores teores de lipoproteínas de baixa densidade (“*low density lipoprotein*”-LDL) além da maior concentração de vitamina A, cuja adição é obrigatória, e de vitamina E, presente naturalmente nos óleos vegetais usados em sua fabricação. Também estão presentes na margarina lipídios ricos em graxos poliinsaturados (AGPIs), essenciais à saúde humana.²

Embora úteis ao organismo, os AGPIs são extremamente sensíveis a reações de oxidação, que levam à rápida diminuição da qualidade funcional e nutricional do alimento, devido à formação de substâncias que conferem sabores e odores desagradáveis. A oxidação lipídica é descrita por mecanismos radiculares, que levam a formação de produtos característicos durante cada etapa (iniciação, propagação e terminação).³ Os hidroperóxidos e os dienos conjugados são as primeiras substâncias estáveis produzidas. Em reações subsequentes, essas espécies originam radicais que atuam como precursores na oxidação de outros componentes insaturados (ex: AGPIs e colesterol), ocorrendo a formação de cetonas, aldeídos, éteres, alcanos, époxis etc., que são responsáveis pela depreciação do alimento.^{4,5}

Além da diminuição da palatabilidade, a oxidação lipídica pode representar risco à saúde do consumidor. Dentre os produtos secundários de oxidação, pode ocorrer a formação de aldeídos α , β -insaturados, como o 4-hidroxinonal, originado pela oxidação do ácido linoleico. Essas substâncias apresentam atividades genotóxicas, citotóxicas, e são relacionadas com desenvolvimento de doenças degenerativas como Parkinson e Alzheimer.⁶ Os radicais hidroperóxidos

originados a partir dos AGPIs podem, ainda, promover a oxidação do colesterol, originando produtos de oxidação do colesterol (POCs), substâncias de grande interesse químico, nutricional e toxicológico. As formas detectadas mais comuns de POCs são a 7-cetocolesterol, o β -epoxicolesterol e o α -epoxicolesterol; todos diretamente ligados ao desenvolvimento de aterosclerose e doença coronariana.⁷

A estabilidade oxidativa da margarina, em geral, é influenciada por fatores como o contato com oxigênio, a luminosidade, a integridade das embalagens, as condições de sanidade e as temperaturas de processamento e armazenamento.⁶ Para aumentar a estabilidade oxidativa das margarinas, substâncias com propriedades conservantes e/ou antioxidantes são adicionadas à formulação. Os aditivos antioxidantes mais usados no Brasil, presentes na portaria MAPA n° 372 são: as vitaminas A, C, E, o cálcio dissódico-EDTA, EDTA, hidroxitolueno butilado (BHT), 2-*tert*-butil-4-hidroxianisol (BHA), *tert*-butil hidroquinona (TBHQ), cúrcuma, propilgalato (PG), Trolox C, tocoferóis, betacaroteno sintético e ácido fosfórico.¹

A margarina é utilizada na indústria alimentícia e na culinária caseira em procedimentos que ocorrem sob condições de estresse térmico, como em assados e frituras. O aquecimento intermitente até temperaturas próximas a 200 °C pode comprometer a integridade das estruturas lipídicas, levando à formação de radicais, precursores das reações de oxidação.⁸ No tocante à sanidade alimentar e nutricional que envolve os diversos usos da margarina, é de grande importância o estudo holístico de sua estabilidade oxidativa frente a condições de estresse térmico, bem como a determinação da natureza química dos possíveis produtos oriundos da oxidação.

No ano de 2009, foi definido o termo foodômica para as abordagens analíticas voltadas a uma compreensão holística dos componentes químicos alimentares conectados a saúde do indivíduo.⁹ O desenvolvimento desse campo de pesquisa está relacionado ao avanço científico e tecnológico sofrido pela instrumentação analítica. Os experimentos realizados com ferramentas espectroscópicas, espectrométricas e cromatográficas, trouxeram a possibilidade da aquisição de verdadeiros *fingerprints* moleculares dos alimentos. Logo, em tais propostas de pesquisas, a escolha da ferramenta analítica é uma

*e-mail: vspufg@gmail.com

etapa essencial, visto que será a partir das informações sobre os perfis químicos alimentares e suas alterações que serão propostas ideias para a melhoria da nutrição humana. Os principais métodos instrumentais usados em foodômica são as técnicas cromatográficas,^{9,10} a espectrometria de massas,¹¹ a espectroscopia no infravermelho¹² e a ressonância magnética nuclear (RMN).¹³⁻¹⁵

Dentre as técnicas supracitadas, a RMN apresenta grande aplicação em estudos de determinação da composição química alimentar e na identificação de produtos de degradação. Desde seu primeiro registro em 1938, feito por Rabi *et al.*, a técnica de RMN sofreu grande avanço teórico-metodológico impulsionado pelo progresso tecnológico. Hoje é a principal ferramenta de elucidação estrutural de moléculas orgânicas em solução e, devido ao seu caráter analítico não seletivo, permite a coleta de informações de um grande número de substâncias químicas em matrizes complexas, sem a necessidade de pré-tratamentos amostrais laboriosos e em curto período de tempo.^{15,16} Dentre as aplicações da RMN no campo da foodômica, destacam-se trabalhos sobre a oxidação lipídica em matrizes alimentares.^{2,6,17,18}

Ibargoitia *et al.* utilizaram a RMN de ^1H para caracterizar os perfis lipídicos de margarinas de diferentes composições. Com a finalidade de monitorar a estabilidade oxidativa, as amostras foram aquecidas a temperatura de 180 °C, em intervalos de 120 e 240 minutos. Foi identificado nos perfis lipídicos representados pelos espectros de RMN de ^1H que o aquecimento provocou a oxidação dos ácidos graxos insaturados, observados em maior extensão em moléculas de AGPIs. Os autores também puderam identificar nos espectros de RMN de ^1H das amostras de margarinas com maiores teores de AGPIs, a evolução de sinais de diferentes tipos de aldeídos e époxis.⁶ Em um estudo semelhante, Sopolana *et al.* utilizaram a RMN de ^1H para avaliar a influência de diferentes teores de fitoesteróis e gorduras em margarinas, frente ao tratamento térmico, também a temperatura de 180 °C. Os autores concluíram que margarinas formuladas com maiores teores de fitoesteróis, apresentaram maior estabilidade frente a oxidação durante o tratamento térmico, ressaltando o efeito antioxidante dos fitoesteróis.²

Shahidi *et al.* estudaram a estabilidade oxidativa de óleos de foga, utilizados como matéria-prima na fabricação de produtos alimentares como margarinas. As matrizes lipídicas foram submetidas ao tratamento térmico a temperaturas de 65 °C em intervalos de 16 dias e seguidas de análises de RMN de ^1H . Foram caracterizados os sinais do triacilglicerol (TAG) em aproximadamente δ 5,25; 4,30; 4,15, referente aos hidrogênios da porção glicerol $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}_2$, respectivamente. As variações ocorridas no TAG foram associadas a reações de oxidação devido à formação de dienos e trienos conjugados, confirmados por reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS).¹⁷

Nieva-Echevarría *et al.* usaram a RMN de ^1H para acompanhar as alterações que ocorreram nos perfis lipídicos de peixes e de óleos, durante processos de fritura. Os autores compararam os perfis lipídicos de filés de robalo e dourado; além de óleos de oliva extra-virgem com óleos de girassol. Em todos os sistemas foram identificados, ao final dos processos, a formação do *trans*-2-alcenal, *cis*, *trans*-2,4-alcadienal, *trans*, *trans*-2,4-alcadienal, *trans*-9,10-epoxiestearato e 1,2-diacilglicerolaldeído. Com base sobre as integrações das áreas dos sinais, os autores quantificaram as variações ocorridas nos teores dos ácidos ω -3, DHA, EPA, ω -6, oleico, ω -1, além dos componentes provenientes da oxidação lipídica. Os resultados indicaram que dentre as quatro matrizes alimentares utilizadas no estudo, o óleo de oliva extra-virgem foi a que apresentou menor potencial para a formação de aldeídos, sendo o mais seguro para o processo de fritura, quando comparado ao óleo de girassol.¹⁸

O uso da RMN no estudo da composição química dos alimentos origina grande quantidade de informação em curto período de tempo que podem não ser prontamente interpretáveis devido à semelhança

e/ou à complexidade e sobreposição de sinais. Tendências de agrupamentos ou separação entre as amostras, ocasionados por determinado processamento ou rota de degradação, podem não ser reconhecidas pelo simples método do “olhar e comparar”. Para tanto, o uso de protocolos quimiométricos no tratamento dos dados da RMN em foodômica pode auxiliar no reconhecimento de determinados padrões. No caso especial da oxidação lipídica em alimentos processados, a quimiometria pode ser útil na identificação de biomarcadores responsáveis pelas alterações nos perfis químicos.¹⁹

A análise de componentes principais (“Principal Components Analysis” – PCA) figura como o principal método quimiométrico aplicado a RMN-foodômica. Em PCA, o conjunto de dados multivariados é projetado em um novo espaço com dimensão estatística reduzida, com mínimo de prejuízo nas relações entre as amostras. A nova dimensão tem por finalidade exaltar tendências de agrupamentos ou separações antes não identificadas. A PCA reduz a variância amostral e expressa a nova informação em um número reduzido de variáveis denominadas componentes principais (*principal components*, PCs). Elas são formadas pela combinação linear entre as variáveis originais (sinais de RMN) com a informação relevante, na forma de variância explicada. As PCs são perpendiculares e sucessivas, logo, a maior parte da variância explicada fica restrita às primeiras PCs, reduzindo a dimensionalidade da análise.²⁰

No contexto apresentado, o presente estudo descreve o uso de um método analítico baseado na sinergia entre a espectroscopia de RMN aliada a PCA, aplicado ao monitoramento e caracterização da estabilidade oxidativa de margarinas brasileiras de mesa, submetidas ao estresse térmico nas temperaturas de 80, 100, 120, 140, 160 e 180 °C. Para tanto, foram avaliadas diferentes amostras de margarinas brasileiras de mesas, comercializadas na região de Goiânia, Goiás. Os perfis lipídicos foram caracterizados através dos espectros de RMN de ^1H . O modelo RMN de ^1H – PCA foi útil na identificação de biomarcadores de deterioração.

PARTE EXPERIMENTAL

Amostragem e tratamento térmico

Foram adquiridas 6 amostras de margarinas de uma mesma marca em diferentes comércios locais da cidade de Goiânia, Goiás. As amostras foram transportadas e armazenadas sob resfriamento até a análise. Para a caracterização do perfil lipídico, uma amostra de margarina foi reservada e não submetida ao tratamento térmico, sendo submetida apenas a análise por RMN. As 5 amostras remanescentes foram submetidas ao tratamento térmico, realizado com alíquotas de 50,0 mg de margarina, transferidas para frascos opacos e vedados, levados à estufa estabilizada nas temperaturas de 80, 100, 120, 140, 160 e 180 °C, por período de 1,0 h. O tratamento térmico foi realizado na forma de quintuplicata para cada temperatura. Após decorrido o período de resfriamento, as amostras foram solubilizadas em 1.000,0 μL de clorofórmio deuterado (CDCl_3), sendo transferidos 600,0 μL do homogeneizado para os tubos de análise de RMN, sendo realizado um total de 30 experimentos (5 para cada temperatura).

Experimentos de RMN de ^1H

Os experimentos de RMN foram realizados em espectrômetro Bruker Avance III 11,75 Tesla, equipado com sonda de detecção direta (BBO), no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás. Os experimentos de RMN de ^1H foram adquiridos com 32 promediações; 4,0 *dummy scans*; 65.536 pontos de digitalização durante a aquisição e processamento; sem giro da amostra; tempo total de aquisição

para cada promediação igual a 18,0 segundos; janela espectral de 20,00 ppm; ganho do receptor fixo em 7,12 e temperatura controlada a 25 °C durante a aquisição. Foi utilizada a sequência de pulso *zg* (Bruker), com calibração automática de pulso e da homogeneidade do campo magnético (*shimming*). Foi aplicado fator de correção exponencial para ampliação da linha espectral de 0,3 Hz. As linhas de base e fase foram corrigidas automaticamente. O tetrametilsilano (TMS) foi usado como referência interna de deslocamento químico para o ^1H .

Análise exploratória por PCA

A análise dos dados por PCA foi realizada no software AMIX 3.9.15 (Bruker). A matriz de dados foi obtida a partir do procedimento de *bucketing* dos dados das áreas dos sinais de RMN de ^1H das margarinas. Foi utilizado o formato retangular de *buckets*, com largura otimizada em 0,50 ppm. As regiões espectrais referentes aos sinais dos solventes em δ 7,5-7,0 (CHCl_3) e δ 0,3-0,0 (TMS) foram excluídas da matriz de dados. A PCA foi realizada com matriz de dados não escalada, modo de integração por soma das intensidades, centrada na média e intervalo de confiança de 95,0%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização dos perfis lipídicos por RMN de ^1H

A Figura 1 apresenta o espectro de RMN de ^1H obtido de uma amostra de margarina não submetida ao tratamento térmico. Foram acrescentados os principais fragmentos alquílicos pertinentes aos diferentes tipos de hidrogênios caracterizados no espectro. A atribuição foi baseada em informações presentes em bancos de dados e literatura.^{2,21}

Foi identificado em δ 0,68 um simpleto largo de baixa intensidade, atribuído ao colesterol. Na região espectral entre δ 0,85 - 0,92, o sinal de média intensidade foi atribuído ao conjunto de hidrogênios metílicos terminais, presentes nas estruturas de ácidos graxos saturados

(AGS) e dos ácidos graxos insaturados oleico (ω -9) e linoleico (ω -6), presentes nas moléculas de TAG. O tripleto identificado em δ 1,0 - 0,96 foi atribuído aos hidrogênios metílicos do ácido alfa-linolênico (ω -3), um ácido graxo essencial ao homem, precursor dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPI-CL). O sinal de grande intensidade na região espectral de δ 1,40 - 1,20 foi atribuído às ressonâncias dos hidrogênios metilênicos de AGS, AGMI e AGPI. Os hidrogênios presentes nos fragmentos acila $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OCO}-$ do TAG, diglicerídeos (DAG) e de monoglicerídeos (MAG) foram caracterizados pelo sinal de baixa resolução na faixa de δ 1,60-1,55.

O multipeto identificado na faixa entre δ 2,20 - 1,95 caracterizou as ressonâncias dos hidrogênios alílicos, encontrados em fragmentos $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ dos ácidos graxos insaturados, exceto em moléculas do ácido docosaenoico (DHA). Em δ 2,35-2,25, foi identificado um multipeto referente aos hidrogênios dos fragmentos acila $-\text{CH}_2-\text{OCO}-$, encontrados nas moléculas do TAG. Entre δ 2,50-2,43, um multipeto de baixa intensidade caracterizou os hidrogênios α -carbonílicos presentes nos fragmentos $-\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ do DHA, em sua forma esterificada. Os hidrogênios *bis*-alílicos encontrados nos fragmentos $=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ dos AGPIs ω -3 e 6, originaram os sinais presentes na faixa espectral entre δ 2,85-2,70.

Foram identificados grupos de sinais com baixas intensidades na faixa espectral entre δ 4,0-3,75, atribuídos aos hidrogênios de moléculas de DAG e MAG. Os quatro hidrogênios metilênicos, encontrados nos fragmentos $-\text{CH}_2-\text{OCOR}-$ da porção glicerol do TAG, foram caracterizados pelos dois duplos dupletos com ressonâncias centradas em δ 4,25 e 4,15. Importante ressaltar a capacidade da técnica de RMN em discriminar a existência de diferentes grupos R esterificados ao TAG, verificada pela presença dos dois grupos de sinais, pois se o contrário fosse verdadeiro, seria observado apenas um duplete, para os quatro hidrogênios metilênicos. O hidrogênio metínico do fragmento $-\text{CHOCOR}$, remanescente da porção glicerol do TAG, foi caracterizado pelo quintupeto com ressonância centrada em δ 5,25. Próximo ao quintupeto supracitado, na faixa espectral em δ 5,42-5,30, foi identificado um sinal de grande intensidade, atribuído

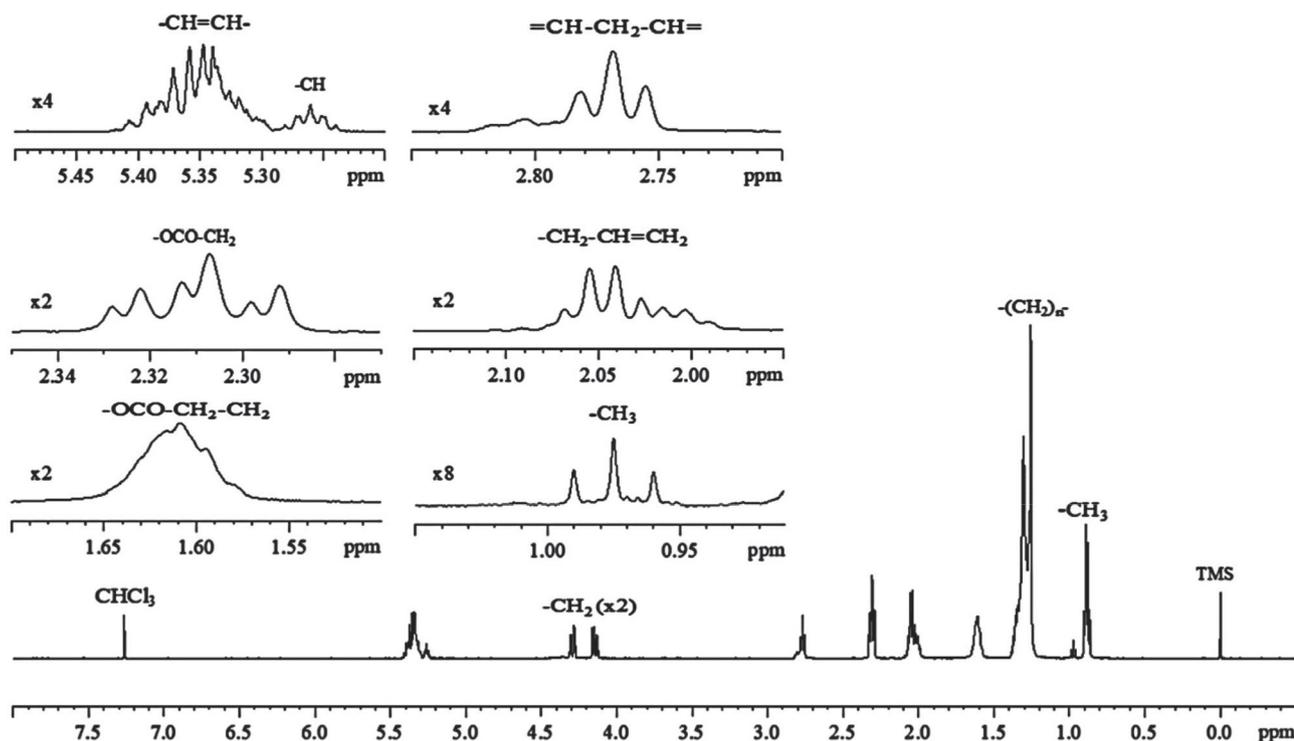


Figura 1. Espectro de RMN de ^1H de uma margarina brasileira de mesa solubilizada em CHCl_3 .

aos hidrogênios dos fragmentos $-\text{CH}=\text{CH}-$, característicos de todos AGIs esterificados ao TAG.

Análise exploratória dos dados e identificação de produtos de oxidação

O conjunto amostral, representado pelos 30 espectros de RMN de ^1H , foi submetido à análise exploratória por PCA, a partir da qual foi identificada, no gráfico de escores de PC1 x PC2, a existência de tendências de discriminação entre as amostras de margarinas submetidas a diferentes temperaturas durante o tratamento térmico (Figura 2). A variância acumulada explicada pelas duas primeiras componentes foi de 98,3 %.

Em escores positivos de PC1, ocorreu forte tendência na discriminação das margarinas submetidas as temperaturas entre 80 a 140 °C, com clara formação de dois grupos, compostos pelas amostras

submetidas a 80 e 100 °C e 120 e 140 °C. Esses grupos foram discriminados ao longo de PC2, com as amostras submetidas a 80 e 100 °C em escores negativos, enquanto as margarinas submetidas a 120 e 140 °C em escores positivos. No sentido negativo de PC1, foram discriminadas as margarinas aquecidas as temperaturas de 160 e 180 °C.

A análise do gráfico de pesos (Figura 3) permitiu a identificação das variáveis de maior relevância para a separação das margarinas. Os escores negativos de PC1, região estatística onde foram discriminadas as amostras aquecidas até 160 e 180 °C, foram fortemente influenciados pelos sinais de hidrogênios com valores de deslocamentos químicos entre δ 6,25-5,75 e 3,75. Já a tendência de separação entre as amostras de margarinas aquecidas a 160 e 180 °C, observada ao longo de PC2, foi influenciada, de forma preponderante, pela variável com δ 4,25.

As variáveis indicadas no gráfico de pesos com δ 4,25, foram previamente atribuídas aos hidrogênios metilênicos dos fragmentos

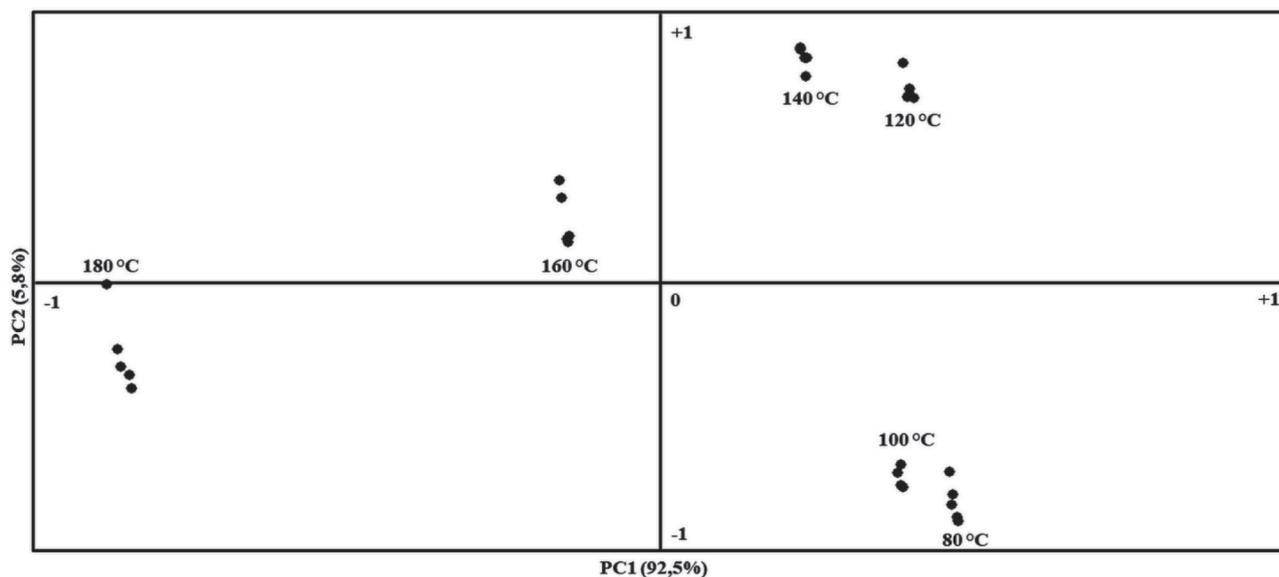


Figura 2. Gráfico de escores de PC1 (eixo horizontal) versus PC2 (eixo vertical). PCA realizada com dados espectrais das margarinas submetidas ao tratamento térmico

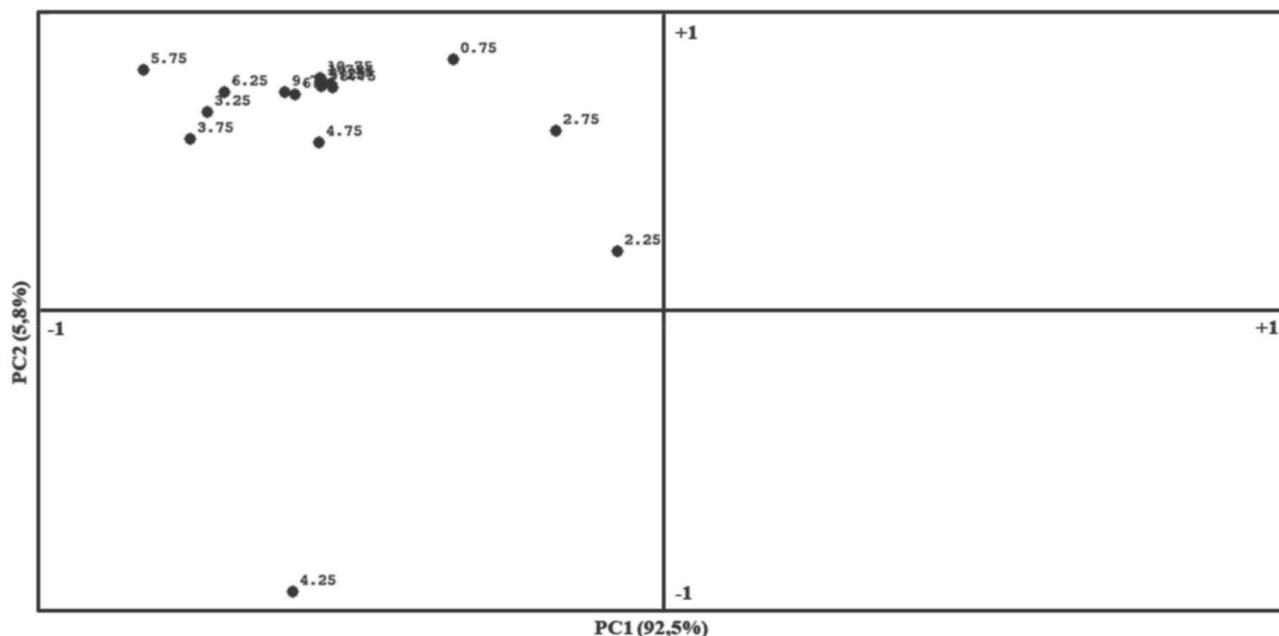


Figura 3. Gráfico de pesos de PC1 versus PC2 para os dados de RMN de ^1H dos extratos lipofílicos das amostras de margarinas submetidas ao tratamento térmico

–CH₂–OCOR– das moléculas de TAG. As áreas dos sinais do TAG, apresentaram uma proporção inversa ao aumento da temperatura (Figura 4). Como a integral da área de um sinal de RMN é proporcional ao número de átomos responsáveis por aquele sinal,²² foi inferido que os decréscimos observados nas áreas dos sinais do TAG foram ocasionados por diminuições nas concentrações desses lipídios, refletindo na diminuição de aproximadamente $70,0 \pm 0,30\%$ do teor de TAG nas margarinas aquecidas a 180 °C, quando comparadas às análogas aquecidas a 80 °C. O resultado reforçou a hipótese inicial relacionada ao favorecimento do mecanismo oxidativo em lipídios, pelo aumento da temperatura.

Além da degradação observada no TAG, também foram identificadas diminuições nas intensidades dos sinais dos diacilglicerídeos (DAG) e monoacilglicerídeos (MAG), indicados no gráfico de pesos pelas variáveis com deslocamentos químicos próximos a δ 3,75 (Figura 5).

As variáveis apontadas no gráfico de pesos de PC1 x PC2 presentes na faixa espectral entre δ 6,40-5,45, foram atribuídas aos sinais de RMN de hidrogênios presentes nos sistemas de *spins* de dienos conjugados.^{2,14} Essas substâncias foram identificadas nas margarinas aquecidas a partir de 160 °C, sendo sua presença determinante para a discriminação das amostras submetidas a 160 e 180 °C ao longo de PC1 negativo (Figura 6). Os valores relativos à integração das áreas atribuídas aos dienos (δ 6.40-5.45) indicaram aumentos de $26,0 \pm 0,44\%$ e $42,3 \pm 0,27\%$ nas amostras aquecidas a 160 °C e 180 °C, respectivamente, quando comparadas as margarinas aquecidas a 80 °C.

O aumento expressivo de dienos conjugados em decorrência do aquecimento nas temperaturas de 160 e 180 °C, durante o período estabelecido de 1,0 hora, é um importante resultado que indica a grande susceptibilidade desse tipo de alimento frente à oxidação,

durante procedimentos culinários que demandem condições similares ao tratamento térmico aplicado. Também foram identificados nos espectros das amostras de margarinas aquecidas a 180 °C, sinais de baixas intensidade e resolução em δ 8,0, atribuídos a possíveis ocorrências de hidroperóxidos, substâncias que assim como os dienos conjugados, são formados nas etapas iniciais da oxidação dos AGPIs.^{4,5,14}

Ao ampliar a análise exploratória por PCA dos dados de RMN de ¹H para PC2 x PC3, cuja variância acumulada foi de 8,5%, foi corroborada a tendência na discriminação das amostras de margarinas submetidas ao aquecimento em diferentes temperaturas (Figura 7). No gráfico de escores de PC2 x PC3, foi identificada forte tendência na separação das amostras aquecidas a temperaturas de 140, 160 e 180 °C ao longo do sentido dos escores positivos de PC2, porém, com maior proximidade entre as amostras 140 e 160 °C, quando comparado ao gráfico de PC1 x PC2 (Figura 2). Ao longo dos escores negativos de PC2, foram discriminadas as margarinas que foram aquecidas as temperaturas de 80, 100 e 120 °C.

A análise do gráfico de pesos (Figura 8) permitiu a identificação das variáveis de maior relevância para a separação das margarinas, ao longo de PC2 x PC3. Os escores positivos de PC2, região estatística onde foram discriminadas as amostras aquecidas a 180 °C, foram influenciados, dentre outros sinais (dienos, δ 5,40-6,80; MAG, δ 3,6-3,20), por hidrogênios observados em δ 9,60, deslocamentos característicos que indicaram a formação de aldeídos.^{4,5}

Na análise dos espectros de RMN de ¹H, foi confirmada a existência de padrões de sinais correspondentes aldeídos insaturados na faixa entre δ 9,80-9,40, sendo proeminente a formação nas margarinas aquecidas a 160 e 180 °C (Figura 9). Resultados similares aos observados no presente estudo foram obtidos por Ibargoitia *et al.*⁶ O padrão de sinais de RMN de ¹H identificado pelos autores foi um duplete

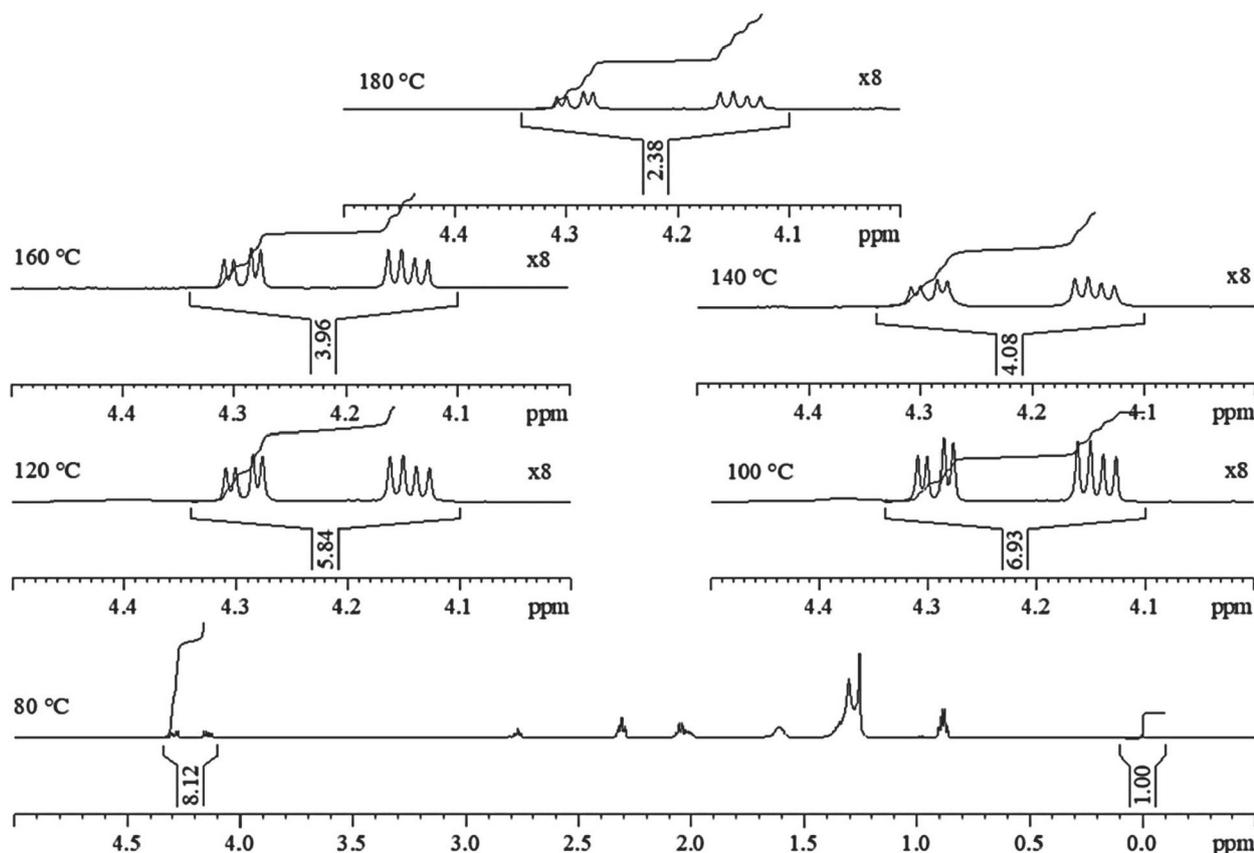


Figura 4. Expansões dos espectros de RMN de ¹H das amostras de margarinas submetidas ao tratamento térmico. Em destaque, são apresentadas para efeitos comparativos, as integrações das áreas dos sinais dos hidrogênios metilênicos das moléculas de TAG (δ 4,45-4,20), relativos ao sinal do TMS (δ 0,00)

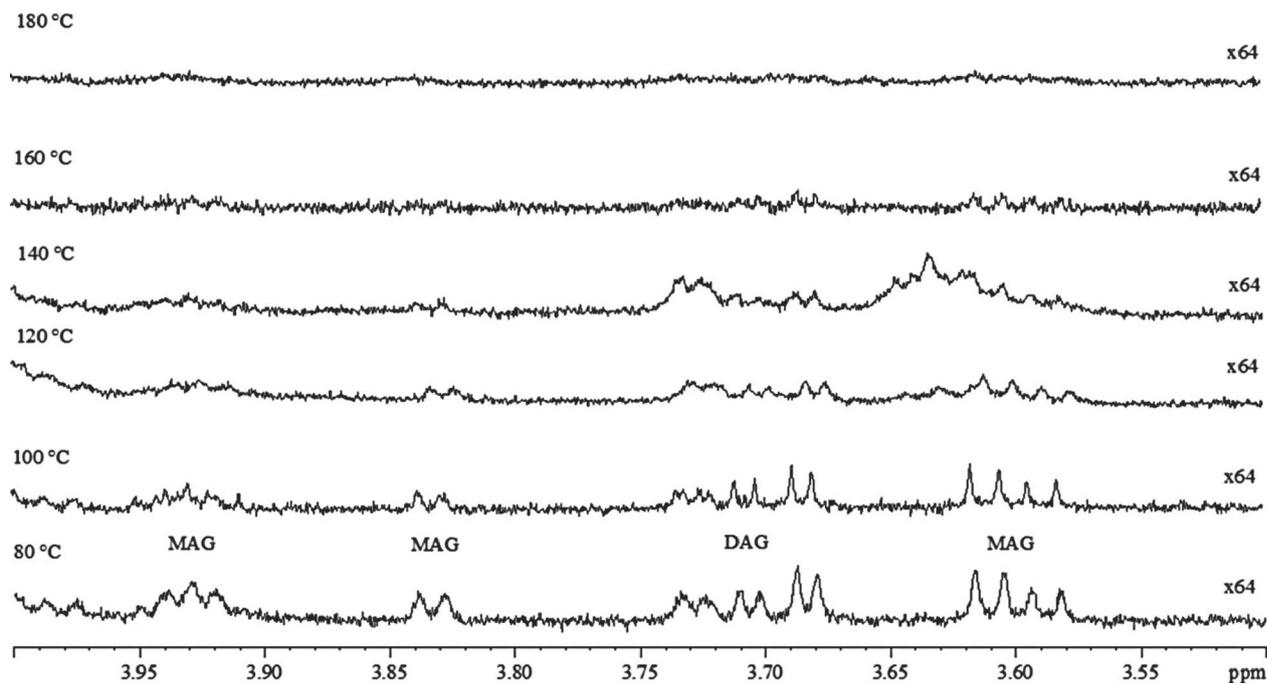


Figura 5. Expansões dos espectros de RMN de ^1H das amostras de margarinas submetidas ao tratamento térmico. Em destaque, são apresentadas as alterações nos sinais dos hidrogênios do MAG e DAG, ocasionadas pelo tratamento térmico

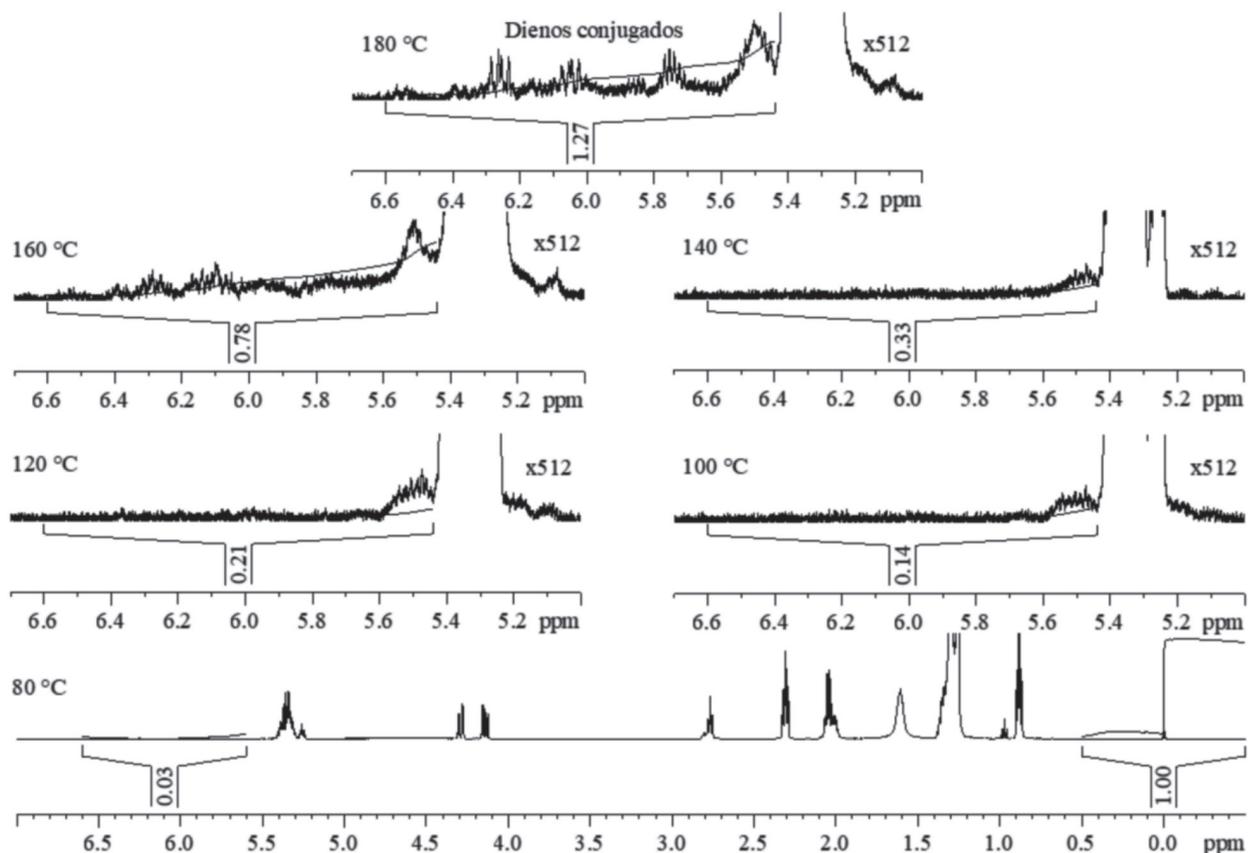


Figura 6. Expansões dos espectros de RMN de ^1H das amostras de margarinas submetidas ao tratamento térmico. Em destaque, são apresentadas as regiões que evidenciaram a formação de dienos conjugados (δ 6,6 - 5,45)

em δ 9,5, atribuído a hidrogênios dos grupos $-\text{CHO}$, encontrados em E -2-alcenais; um duplete em δ 9,53, atribuído aos hidrogênios dos grupos $-\text{CHO}$ presentes em moléculas de E,E -2,4-alcadienais; dois dupletos, também pertencentes a grupos dos grupos $-\text{CHO}$, identificados em δ 9,56 e 9,58 e atribuídos ao epoxi-2-alcenais e ao

hidroxi-2-alcenais, respectivamente. O multiplete identificado em δ 9,76 foi atribuído às ressonâncias dos hidrogênios encontrados em fragmentos $-\text{CHO}$ de aldeídos saturados.

A integração da área dos sinais dos aldeídos em δ 9,80-9,40 indicou grande incremento nas margarinas aquecidas a 160 °C e

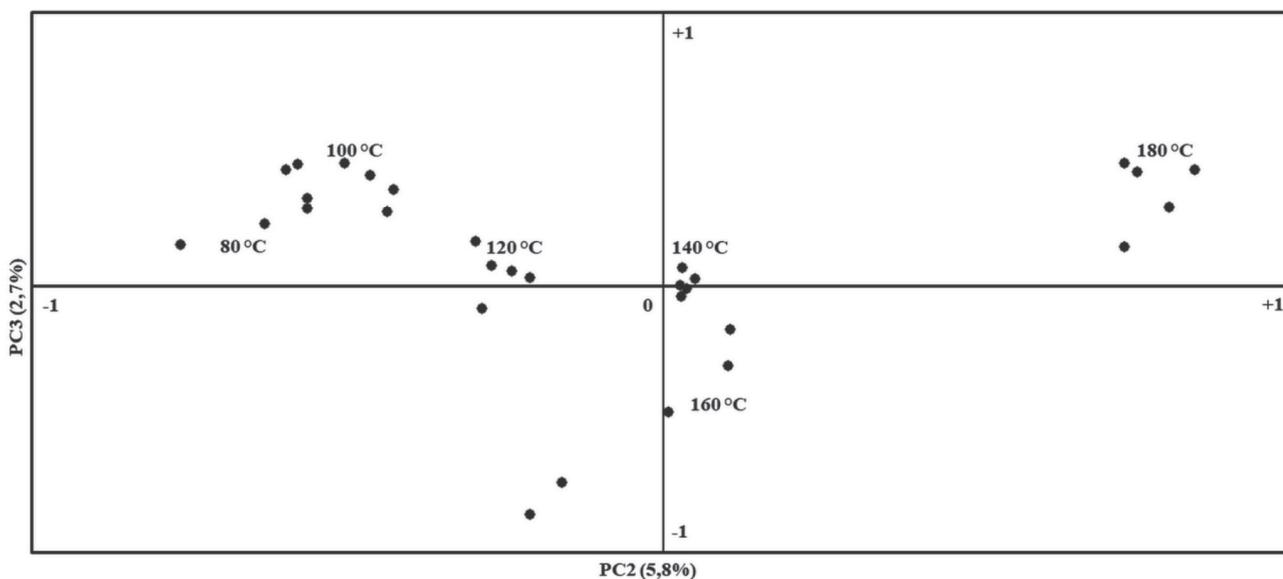


Figura 7. Gráfico de escores de PC2 (eixo horizontal) versus PC3 (eixo vertical). PCA realizada com dados espectrais das margarinas submetidas ao tratamento térmico

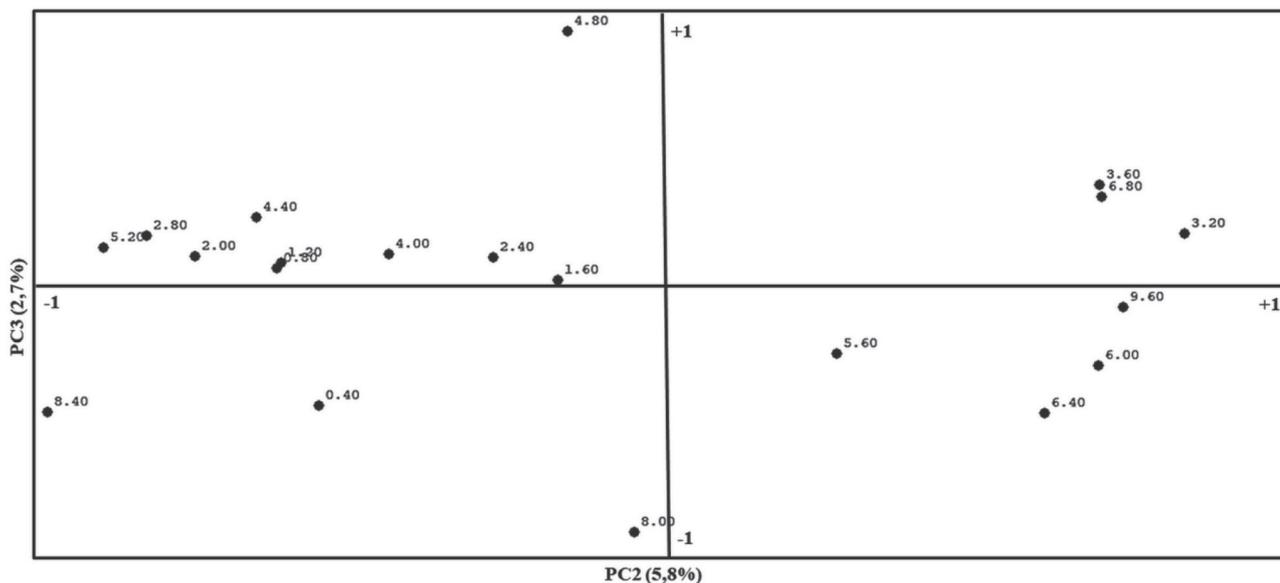


Figura 8. Gráfico de pesos de PC2 versus PC3 para os dados de RMN de ^1H dos extratos lipofílicos das amostras de margarinas submetidas ao tratamento térmico

180 °C, quando comparadas às demais amostras. A formação dessas substâncias, atribuída a reações entre as espécies radiculares de hidroperóxidos e dienos conjugados com os componentes insaturados (ex: AGPIs) presentes nas moléculas de TAG,^{4,5} é um indicio da não compatibilidade desse tipo de alimento em procedimentos culinários sob condições similares as estudadas, visto que os aldeídos são considerados componentes que convergem para a depreciação do alimento, além de representar risco a saúde do consumidor.⁶

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi descrito o uso da de RMN de ^1H aliada ao tratamento quimiométrico por PCA no monitoramento rápido e inequívoco de alterações ocorridas em extratos lipídicos de margarinas brasileiras de mesa, submetidas ao tratamento térmico, durante o período de 1,0 h. A tendência observada na discriminação das amostras de margarinas na análise exploratória por PCA refletiu o grande decréscimo no teor de TAG, a partir da qual foram

registrados, aproximadamente, 70% nas amostras aquecidas a 180 °C. Esse comportamento durante o tratamento térmico ressaltou a grande susceptibilidade dos lipídios frente à termodegradação por oxidação. O protocolo analítico baseado em análises de RMN aliada à PCA, permitiu a identificação da temperatura crítica em que ocorreu a perda da estabilidade oxidativa, cujo valor foi de 160 °C. Nas margarinas aquecidas a 160 e 180 °C durante o período de 1,0 hora, foram registrados sinais de RMN de ^1H característicos de dienos e aldeídos. Esses resultados indicaram a inviabilidade desse tipo de matriz lipídica em procedimentos culinários que requerem condições de estresse térmico a temperaturas superiores a 160 °C durante intervalos iguais ou superiores a 1,0 hora, pois os produtos de oxidação apontados pelo modelo RMN-PCA são relatados como substâncias citotóxicas e genotóxicas, relacionadas ao desenvolvimento de doenças degenerativas como Parkinson e Alzheimer.⁶ O bom desempenho do protocolo adotado corroborou a perspectiva do uso da RMN aliada à quimiometria em abordagem aplicada ao estudo da oxidação lipídica em matrizes alimentares.

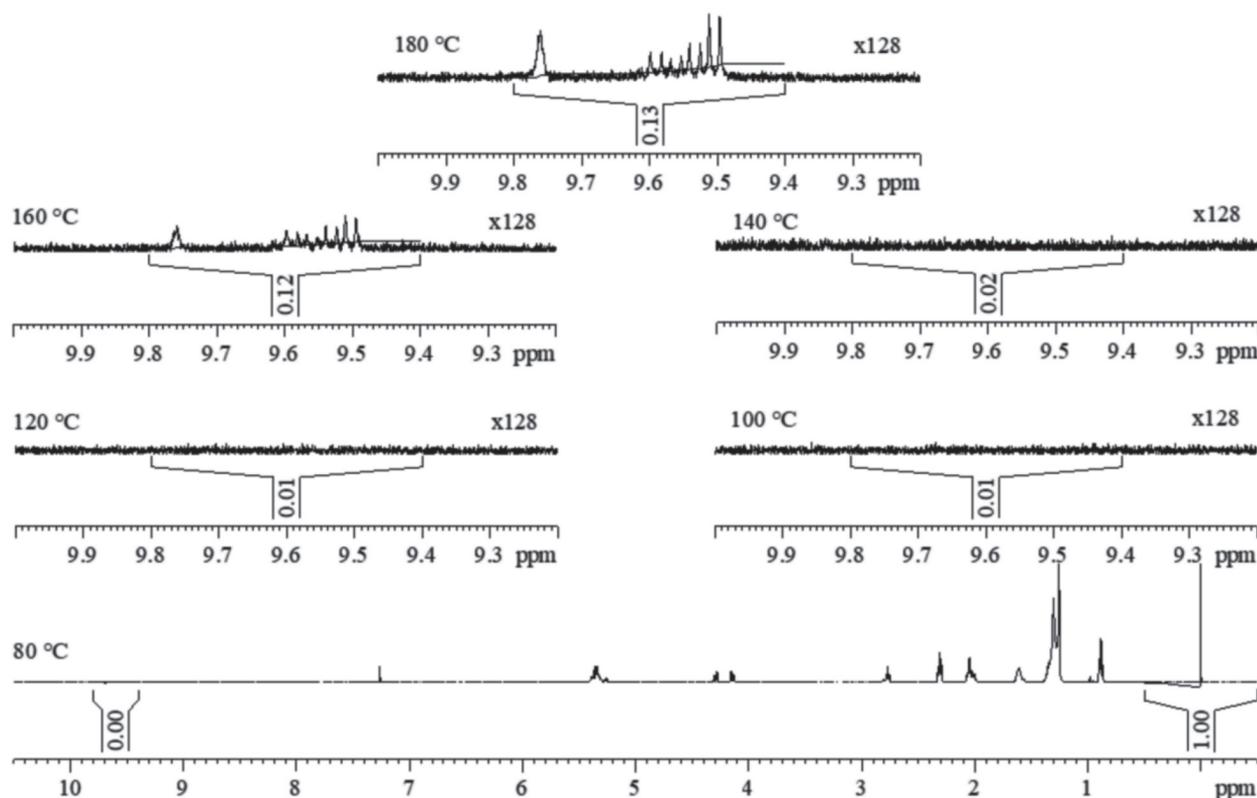


Figura 9. Expansões dos espectros de RMN de ^1H das amostras de margarinas submetidas ao tratamento térmico. Em destaque, são apresentadas as regiões que evidenciaram a formação de aldeídos (δ 10,0 - 9,20)

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (RMN-UFG) pela infraestrutura disponibilizada para a realização dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- Portaria MAPA nº 372/1997, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, disponível em <http://www.agricultura.gov.br>, acessada em agosto 2019.
- Sopelana, P.; Ibargoitia M. L.; Guillén M. D.; *Food Chem.* **2016**, *197*, 1256.
- Checa A.; Bedia C.; Jaumot J.; *Anal. Chim. Acta* **2015**, *885*, 1.
- Schaich K. M. In *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats*; Hu, M., Jacobsen, C., eds.; Elsevier: Amsterdam, 2016, p. 1.
- Zhou, X.; Zhou, D.-Y.; Liu, Z.-Y.; Yin, F.-W.; Liu, Z.-Q.; Li, D.-Y.; Shahidi, F.; *Food Chem.* **2019**, *272*, 109.
- Ibargoitia, M. L.; Sopelana, P.; Guillén, M. D.; *Food Chem.* **2014**, *165*, 119.
- Hur, S. J.; Park, G. B.; Joo, S. T.; *Food Control* **2007**, *18*, 939.
- Brenes, M.; García, A.; Dobarganes, M. C.; Velasco, J.; Romero, C.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 5962.
- Cifuentes, A.; *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7109.
- Pazzoti, G.; Souza, C.; Veronezi, C.; Luzia, D.; Jorge, N.; *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2018**, *61*, 1.
- Fuchs B.; Bresler, K.; Schiller, J.; *Chem. Phys. Lipids* **2011**, *164*, 782.
- Vaskova, H.; Buckova, M.; *Procedia Eng.* **2015**, *100*, 630.
- Castejón, D.; Segura-García, J. M.; Escudero, R.; Herrera, A.; Cambero, M. I.; *Anal. Chim. Acta* **2015**, *901*, 1.
- Colzato, M.; Scramin, A. J.; Forato, A. L.; Colnago, L. A.; Assis, O. B. G.; *J. Food Process. Preserv.* **2011**, *35*, 790.
- Corsaro, C.; Cicero, N.; Mallamace, D.; Vasi, S.; Naccari, C.; Salvo, A.; Giofrè, S. V.; Dugo, G.; *Food Res. Int.* **2016**, *89*, 1085.
- Claridge, T. D. W.; *Tetrahedron Org. Chem. Ser.* **2006**, *27*, 1.
- Shahidi, F.; Wanasundara, U.; Brunet, N.; *Food Res. Int.* **1994**, *27*, 555.
- Nieva-Echevarría, B.; Goicoechea, E.; Manzanos, M. J.; Guillén, M. D.; *Food Res. Int.* **2016**, *84*, 150.
- Bevilacqua, M.; Bro, R.; Marini, F.; Rinnan, Å.; Rasmussen, M. A.; Skov, T.; *TrAc – Trends Anal. Chem.* **2017**, *96*, 42.
- Ferreira, M. M. C.; *Quimiometria – Conceitos, Métodos e Aplicações*, Editora da Unicamp: Campinas, 2015, Cap. 3.
- HMDB 4.0, disponível em <http://www.hmdb.ca>, acessada em agosto 2019.
- Bharti, S. K.; Roy, R.; *TrAc – Trends Anal. Chem.* **2012**, *35*, 5.