



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

AROLDO SALVIATO

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE RADICAIS LIVRES EM
ÓLEOS VEGETAIS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA**

Londrina
2016

AROLDI SALVIATO

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE RADICAIS LIVRES EM
ÓLEOS VEGETAIS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA**

Tese de Doutorado submetida à Universidade Estadual de Londrina, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Física.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Di Mauro.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Salviato, Aroldo.

ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE RADICAIS LIVRES EM ÓLEOS VEGETAIS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA / Aroldo Salviato. - Londrina, 2016.
83 f. : il.

Orientador: EDUARDO DI MAURO.

Tese (Doutorado em Física) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Física, 2016.
Inclui bibliografia.

1. Ressonância Paramagnética Eletrônica - Tese. 2. Ressonância Magnética Nuclear - Tese. 3. Oxidação - Tese. 4. Óleos Vegetais - Tese. I. DI MAURO, EDUARDO. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Física. III. Título.

AROLDO SALVIATO

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE RADICAIS LIVRES EM ÓLEOS
VEGETAIS POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA**

Tese de Doutorado submetida à Universidade Estadual de Londrina, como parte integrante dos requisitos para a obtenção do Grau de Doutor em Física.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Di Mauro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Dionisio Borsato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a. Marilene Turini Piccinato
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Prof. Dr. Fernando César de Macedo Júnior
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Bruno Luiz Santana Vicentin
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 13 de dezembro de 2016.

Dedico este trabalho à minha amada esposa, aos meus abençoados filhos e aos meus queridos pais.

AGRADECIMENTO

Agradeço ao meu orientador Eduardo Di Mauro pela oportunidade e ajuda durante este tempo de trabalho.

A Carlos B. Yenes, pelo incentivo e pelos bons conselhos.

Ao amigo Daniel F. Valezi, pelas ajudas e sugestões.

Aos professores que sempre me atenderam com muita gentileza e atenção.

Aos colegas do Laflurpe que compartilharam os bons momentos deste tempo de trabalho.

Ao pessoal do laboratório de espectroscopia Raman

Aos pesquisadores da Universidade Federal de São Carlos, Prof. Dr. Eduardo Ribeiro de Azevedo e Jefferson Gonçalves Filgueiras.

À Univesidade Estadual de Londrina

Ao Cnpq pelo apoio financeiro

SALVIATO, Aroldo. **Estudo do comportamento de radicais livres em óleos vegetais por ressonância magnética**. 2016. 83 f. Tese (Doutorado em Física) – Universidade Estadual de Londrina, 2016.

RESUMO

Neste trabalho estudou-se a geração de radicais livres e o seu comportamento dinâmico nos óleos de Soja refinado, de Linhaça, de semente de Uva, no Azeite de Oliva Extravirgem e em Óleo de Soja refinado preparado sem a adição de antioxidantes. A geração de radicais livres foi acompanhada em temperatura ambiente e sob a influência do aumento da temperatura. Em virtude do curto tempo de vida dos radicais livres gerados, utilizou-se a técnica de *spin trapping* para estabilizar esses radicais. Como agente trapeador utilizou-se o spin trap α -fenil-N-tert-butilnitrona (PBN) a fim de aprisionar as espécies paramagnéticas. Através da técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) detectou-se e quantificou-se as espécies paramagnéticas, de forma indireta. Entre os óleos estudados, sob o mesmo período de avaliação, o Azeite de Oliva é o que apresentou maior concentração de radicais livres, seguido dos Óleos de Soja, de Linhaça e do Óleo de Semente de Uva. Isto aponta uma relação direta entre a quantidade de monoinsaturações presentes em cada óleo e a geração de radicais livres. Além disto, determinou-se que a mudança na viscosidade do óleo está relacionada com a detecção do desdobramento hiperfino, resultado da interação entre o radical hidroxila (OH•) e o PBN. Além disso, por meio dos tempos de relaxação encontrados pela técnica de RMN, calculou-se a viscosidade de cada óleo. Os resultados indicam que ao atingirem uma viscosidade mínima de 2,6 cP, o regime dinâmico dos óleos é alterado. Esta mudança no meio reacional propicia uma alta mobilidade molecular, que torna a interação com o hidrogênio da molécula do PBN intensa o bastante para ser observada por RPE.

Palavras-chave: RPE. RMN. Spin Trap. Viscosidade. Oxidação.

SALVIATO, Aroldo. **Study of free radicals in vegetable oils using magnetic resonance**. 2016. 83 p. Thesis (Doctoral degree in Physics) – Universidade Estadual de Londrina, 2016.

ABSTRACT

This work was dedicated to study the production of free radicals and its dynamical behavior in the refined Soybean oils, in Linseed Oil, in Grape Seed Oil, in Extra Virgin Olive Oil and in a refined Soybean Oil prepared without the addition of antioxidants. The generation of free radicals was monitored in room temperature and under the influence of temperature. Due to the short lifetime of the generated free radicals, the spin trapping technique was used to stabilize those radicals. To confine the paramagnetic species the spin trap α -Phenyl-*N*-*tert*-butylnitrona (PBN) was used. Through Electron Paramagnetic Resonance's (EPR) technique, paramagnetic species were, in an indirect form, detected and quantified. Among the oils studied, under the same evaluation period, the Olive Oil is the one that most produced free radicals, followed by Soybean Oil, Linseed Oil and Grape Seed Oil, pointing a direct relation between the amount of monounsaturated present in each oil and the generation of free radicals. Besides that, was determined that the variation of the oil's viscosity is the necessary condition to experimentally detect the hyperfine splitting, result of the interaction between the hydroxyl radical and the PBN's molecule. Through the relaxation periods found by the NMR, the viscosity of each oil was calculated. The results indicate that upon reaching at least 2,66 cP of viscosity the oil's dynamics is changed. These changes in the reaction medium provide a high molecular mobility, which makes the interaction with the PBN's hydrogen intense enough to be noticed by the RPE.

Keywords: EPR. NMR. Spin Trap. Viscosity. Oxidation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Níveis de energia possíveis para um elétron $S=\pm\frac{1}{2}$ em um Campo Magnético H , e a energia necessária $h\nu$ para ocorrer a transição.....	18
Figura 2	– Principais sítios reativos.....	29
Figura 3	– Mecanismo de auto-oxidação dos óleos comestíveis.....	29
Figura 4	– Exemplos de estruturas mais usados como spin trap. (a) Nitrona e (b).....	31
Figura 5	– Nitronas mais utilizadas como spin trap.....	32
Figura 6	– Esquema de captura e formação do radical nitróxido pelo PBN.	32
Figura 7	– Esquema de interações ocorridas entre o radical livre e a molécula do PBN, e os seis níveis de transições possíveis....	33
Figura 8	– Formas de linhas de acordo com a velocidade de difusão.....	40
Figura 9	– Espectros de RPE do azeite de oliva extravirgem em temperatura ambiente em função do número de dias incubado.....	42
Figura 10	– Concentração do número de radicais livres no azeite de oliva, incubados com o PBN em função dos dias de incubação.....	44
Figura 11	– Espectros de RPE do óleo de soja comercial, em temperatura ambiente em função do número de dias de incubação.....	45
Figura 12	– Concentração do número de radicais livres no óleo de soja comercial em função do número de dias de incubação.....	46
Figura 13	– Espectros de RPE do óleo de soja não comercial, em temperatura ambiente, em função do número de dias de incubação.....	47
Figura 14	– Concentração do número de radicais livres no óleo de soja sem antioxidante em função do número de dias de incubação.....	48
Figura 15	– Espectros de RPE do óleo de linhaça (OL), em temperatura ambiente em função do número de dias de incubação.....	49
Figura 16	– Concentração do número de radicais livres no óleo de linhaça, em função do número de dias de incubação.....	50
Figura 17	– Espectros de RPE do óleo de semente de uva (OU), em temperatura ambiente em função do número de dias de incubação.....	51

Figura 18 – Concentração do número de radicais livres no óleo de semente de uva OU, em função do número de dias de incubação.....	52
Figura 19 – Relação entre a quantidade de radicais gerados em óleos vegetais e o número de monoinsaturações em cada óleo	54
Figura 20 – Espectros de RPE do azeite de oliva extravirgem, com 90 dias de incubação em função da temperatura de aquecimento.....	56
Figura 21 – Desdobramento hiperfino encontrado em função do aumento da temperatura no azeite de oliva extravirgem.....	57
Figura 22 – Espectro do óleo de soja comercial submetido ao aumento da temperatura de 25°C a 60°C, para uma amostra com 120 dias de incubação	58
Figura 23 – Espectro do óleo de soja comercial submetido ao aumento da temperatura de 70°C aos 110°C, amostra com 120 dias de incubação	59
Figura 24 – Espectro do óleo de soja comercial submetido ao aumento da temperatura de 120°C a 170°C, para uma amostra com 120 dias de incubação	60
Figura 25 – Espectro do óleo de soja sem antioxidante, com aumento da temperatura de 25°C a 70°C, para uma amostra com 90 dias de incubação.....	61
Figura 26 – Espectro do óleo de soja sem antioxidante, com aumento da temperatura de 80°C a 130°C, para uma amostra com 90 dias de incubação	62
Figura 27 – Espectro do óleo de soja sem antioxidante, com aumento da temperatura de 140°C a 180°C, para uma amostra com 90 dias de incubação	63
Figura 28 – Espectro do óleo de Linhaça submetido ao aumento da temperatura de 25°C a 50°C, para uma amostra com 90 dias de incubação	64
Figura 29 – Espectro do óleo de Linhaça submetido ao aumento da temperatura de 60°C a 90°C, para uma amostra com 90 dias de incubação.....	65
Figura 30 – Espectro do óleo de Linhaça submetido ao aumento da temperatura de 110°C a 160°C, para uma amostra com 90 dias	

de incubação	66
Figura 31 – Espectro do óleo de semente de uva submetido ao aumento de temperatura de 25°C a 70°C, para uma amostra com 30 dias de incubação	67
Figura 32 – Espectro do óleo de semente de uva submetido ao aumento de temperatura de 80°C a 130°C, para uma amostra com 30 dias de incubação	68
Figura 33 – Espectro do óleo de semente de uva submetido ao aumento de temperatura de 140°C a 180°C, para uma amostra com 30 dias de incubação	69
Figura 34 – Média logarítmica dos óleos estudados em função da temperatura	71
Figura 35 – Comportamento da viscosidade em função da temperatura. O traço delimita a viscosidade mínima para que se possa detectar o desdobramento hiperfino nos espectro de RPE	73
Figura 36 – Viscosidade Cinemática dos óleos de analisados	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais ácidos graxos em óleos e gorduras	24
Tabela 2 – Principais ácidos e suas quantidades encontradas no Óleo de Oliva	25
Tabela 3 – Principais ácidos e suas quantidades encontradas no Óleo de soja	26
Tabela 4 – Principais ácidos e suas quantidades encontradas no óleo de linhaça	27
Tabela 5 – Composição dos ácidos graxos presentes em algumas variedades de semente de uva	28
Tabela 6 – Comparação entre as características dos óleos e a produção de radicais livres	53
Tabela 7 – Temperaturas encontradas no RPE nas quais se visualiza o desdobramento hiperfino. Viscosidade mínima, calculada a partir das médias logarítmicas fornecidas por RMN dos óleos vegetais	72

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	13
CAPÍTULO 2 – FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE).....	16
2.2 RMN E VISCOSIDADE	21
2.3 ÓLEOS VEGETAIS.....	23
2.3.1 Azeite de Oliva Extravirgem (AO).....	25
2.3.2 Óleo de soja (OS)	25
2.3.3 Óleo de Linhaça (OL)	26
2.3.4 Óleo de Semente de Uva (OU).....	27
2.4 DETERIORAÇÃO DE LIPÍDEOS.....	28
2.5 CAPTURA DE RADICAIS LIVRES	30
2.6 OBJETIVOS	34
CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1 ÓLEOS UTILIZADOS	35
3.2 SPIN TRAP.....	35
3.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E MEDIDAS DE RESSONÂNCIA	35
3.4 FATOR ESPECTROSCÓPICO G E QUANTIFICAÇÃO DOS RADICAIS	37
3.5 ESPECTROSCOPIA DE RMN	38
3.6 VISCOSIDADE CINEMÁTICA	38
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 ANÁLISES EM TEMPERATURA AMBIENTE	39
4.1.1 Espectros dos Óleos Vegetais.....	39
4.1.2 Espectros de RPE com spin trap.....	41
4.2 RPE DO AZEITE DE OLIVA EXTRAVIRGEM (AO).....	42
4.3 RPE DO ÓLEO DE SOJA COMERCIAL (SC)	45
4.4 RPE DO ÓLEO DE SOJA SEM ANTIOXIDANTES (SA).....	47
4.5 RPE DO ÓLEO DE LINHAÇA (OL).....	49
4.6 RPE DO ÓLEO DE SEMENTE DE UVA (OU).....	50

4.7	ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS ÓLEOS	52
4.8	ANÁLISES COM VARIAÇÃO DA TEMPERATURA.....	54
4.8.1	Espectros de RPE	54
4.8.2	RPE do Azeite de oliva extravirgem (AO).....	55
4.8.3	RPE do óleo de soja comercial (SC)	57
4.8.4	RPE do óleo de soja sem antioxidante (SA).....	60
4.8.5	RPE do óleo de linhaça (OL)	63
4.8.6	RPE do óleo de semente de uva (OU)	66
4.9	VISCOSIDADE DINÂMICA (RMN) E O COMPLETO DESDOBRAMENTO HIPERFINO NO RPE.....	69
4.10	VISCOSIDADE CINEMÁTICA	73
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÃO		75
REFERÊNCIAS.....		77

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Os lipídeos são um grupo diversificado de compostos biológicos, cuja característica comum é a insolubilidade em água, além disso, também formam um dos principais constituintes de alimentos e outros sistemas biológicos (DAVID e COX, 2011). Este grupo de biomoléculas orgânicas são classificados segundo Jadhav et al. (1996) em três grupos: lipídeos simples, lipídeos compostos e lipídeos derivados cuja uma de suas funções biológicas é a de acumular energia em organismos, cuja principal fonte deste armazenamento são os óleos e as gorduras, que por sua vez são derivados dos ácidos graxos.

Gorduras e óleos constituem uma das três maiores classes de produtos alimentares, os outros dois são proteínas e carboidratos (WEISS, 1983), além disso, óleos e gorduras são nutrientes essenciais para a dieta humana, são fontes concentradas de energia (LAWSON, 1994) e estão presentes naturalmente em muitos alimentos, tais como carnes, peixes, óleos vegetais, entre outros. Todos os óleos e gorduras são predominantemente compostos por três ésteres de ácidos graxos de glicerol, comumente chamado de triglicerídeo.

Óleos comestíveis são constituídos principalmente de triglicerídeos, estes, após o processo de refino, estão presentes em níveis superiores a 95% (URBACH; GORDON, 1994). Após o refino, estes óleos são insípidos, mas a oxidação e a hidrólise de seus componentes podem levar ao desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis (RAMALHO; JORGE, 2006). Diversos estudos, segundo Melton et al. (1994), concluem que alterações nas características dos óleos dependem dos antioxidantes presentes nestes óleos. Estas mudanças, também dependem da temperatura e do ciclo de aquecimento, entre outros fatores. Tais modificações podem reduzir a quantidade de antioxidantes naturais presentes no óleo, diminuir a sua estabilidade e produzir novos produtos o que indica que são responsáveis pela perda do valor nutricional e de sua qualidade (QUILES et al., 2002; GIUFFRIDA et al., 2007).

A oxidação dos alimentos ocorre quando o oxigênio presente se une a outros elementos químicos ou grupos de elementos para formar óxidos que causem,

segundo Pintauro (1974) e Perkins (1996), a quebra dos ácidos graxos ou de carboidratos presentes nos alimentos, por isso, consiste numa das principais causas da deterioração da qualidade dos óleos. Este é um fenômeno espontâneo e inevitável (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999), que resulta na deterioração final de matéria proteica, implicando problemas tanto na indústria alimentícia como na de biocombustíveis.

A oxidação lipídica é essencialmente uma reação radicalar que envolve as etapas de iniciação, propagação e terminação (O'CONNOR; O'BRIEN, 1995). Neste processo os ácidos graxos insaturados são oxidados e formam hidroperóxidos. Em sistemas biológicos, os radicais livres são gerados através do próprio metabolismo, além disso, vários outros agentes externos, tais como: poluição, radiação ionizante e luz natural (DESHPANDE; DESHPANDE; SALUNKHE, 1995), aumento da temperatura, exposição ao oxigênio e o contato com outros materiais classificados como pró-oxidantes. (LAWSON, 1994).

Deste modo, tais eventos comprovam a relevância de se acompanhar o processo de formação dos radicais livres nos óleos vegetais, sua taxa de crescimento e o seu comportamento tanto em temperatura ambiente quanto sob aquecimento, pois estes são largamente utilizados no preparo de alimentos de consumo imediato como saladas, em processos de frituras e também na indústria de combustíveis.

Por conseguinte, neste trabalho foi estudado o crescimento no número de radicais livres e as alterações causadas pelo aumento da temperatura no óleo de Soja refinado, no óleo de Linhaça, no óleo de semente de Uva, no Azeite de Oliva Extravirgem e em um Óleo de Soja refinado preparado sem a adição de antioxidantes. Estes óleos foram investigados em temperatura ambiente e posteriormente submetidos a um aumento de temperatura. Como técnicas analíticas, foram utilizadas as espectroscopias de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A técnica de RPE propicia analisar as alterações causadas nos óleos, ocasionadas pelo tempo de armazenamento. Deste modo, se buscará verificar o aumento do número de radicais livres em função do número de dias de contato entre o spin trap PBN e o óleo vegetal. Além disso, com a elevação da temperatura pode-se avaliar e constatar as mudanças ocorridas no meio reacional. Através da Ressonância Magnética Nuclear, será analisada as alterações

na viscosidade dos óleos estudados, buscando relacionar estas alterações à mudança do regime dinâmico dos óleos.

CAPÍTULO 2

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (RPE)

As primeiras observações da técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica foram realizadas por Zavoisky (1945) (ORTON, 1968) e estão baseadas na absorção da energia de micro-ondas por um elétron desemparelhado na presença de um campo magnético. A técnica de RPE, conhecida também pelas siglas EPR (*Electron Paramagnetic Resonance*) e ESR (*Electron Spin Resonance*), é utilizada para o estudo de diversos sistemas, devido em grande parte à sua versatilidade e ao seu caráter não destrutivo. Atualmente vem sendo aplicada a uma grande variedade de problemas da física da matéria condensada e da química.

Sistemas que possuem elétrons desemparelhados, podendo ser átomos com número ímpar de elétrons, íons com camadas eletrônicas parcialmente cheias, radicais livres, centros de cor, estruturas de cristais, complexos moleculares compostos de centros paramagnéticos, entre outros. Ou seja, compostos nos quais seus elétrons encontram-se livres para se ligarem a outros elétrons (ROHN; KROH, 2005; BIKTAGIROV et al., 2014). Especificamente em metais de transições e estruturas de cristais, os elétrons desemparelhados são relativamente estáveis e conseqüentemente mais fáceis de serem detectados. Entretanto, muitos radicais livres, devido à sua alta reatividade e à sua baixa concentração, não podem ser detectados diretamente por RPE, necessitando da ajuda de armadilhas de spins para serem observados.

O fenômeno da ressonância paramagnética eletrônica é conseqüência da existência da propriedade intrínseca do elétron de possuir momento angular S , conhecido por spin (DONOSO; BARBERIS, 1997), cujo momento magnético associado é diretamente proporcional a esse momento angular (IKEYA, 1993),

$$\mu_e = -g\beta S. \quad (1)$$

O sinal negativo é resultado do momento magnético ser antiparalelo ao momento angular de spin. Para o elétron livre, o fator de Landé é conhecido como

g e tem valor aproximado de 2,0023 e β , é conhecido como magnéton de Bohr (IKEYA, 1993).

Apesar de ser de natureza quântica, a compreensão básica do fenômeno de RPE não necessita de vastos conhecimentos, mas de algumas informações importantes, tais como: projeções possíveis para o spin de um elétron, conceito de meia vida, entre outros (OLIVEIRA, 1980). Ao se aplicar um campo magnético externo H orientado na direção Z , sobre um elétron, a interação deste campo com o momento magnético do elétron é descrita por uma Hamiltoniana de spin (RIEGER, 2007).

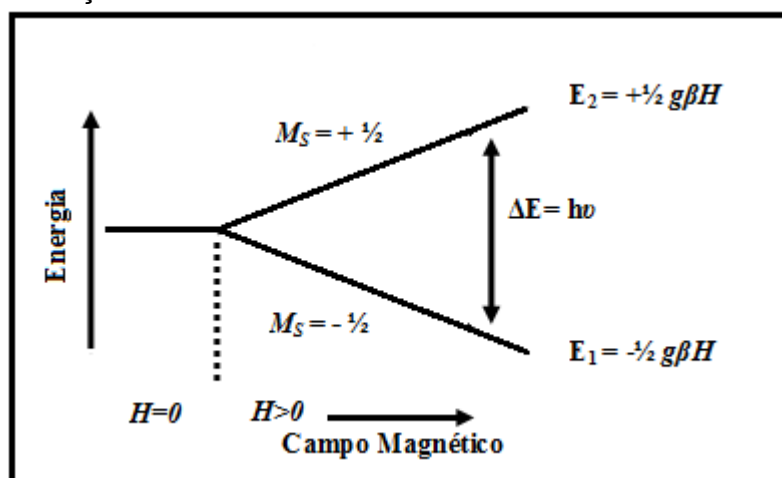
$$\mathbf{H} = -\mu_e \cdot \mathbf{H} = g \beta H S_z. \quad (2)$$

Como S_z possui apenas duas orientações permitidas, $M_S = \pm 1/2$, para o elétron, têm-se apenas a energia de interação entre o momento magnético μ_e e o campo magnético externo H , de forma que os níveis de energia para os possíveis valores de M_S são dados por:

$$E = g \beta H M_S. \quad (3)$$

Neste caso, têm-se dois estados de energia degenerados na ausência de campo magnético externo. Com a introdução de um campo externo, ocorre a separação entre os dois estados de energia e este efeito é conhecido como “Efeito Zeeman”. A Figura 1 apresenta os níveis de energia de um elétron $S = \pm 1/2$ na ausência e na presença de um campo magnético externo.

Figura 1 – Níveis de energia possíveis para um elétron $S=\pm\frac{1}{2}$ em um Campo Magnético H , e a energia necessária $h\nu$ para ocorrer a transição



Fonte: Adaptado de Weil e Bolton (2007).

Para que ocorra a transição entre os dois estados de spin, é necessária a aplicação de uma quantidade de energia $h\nu$, que seja exatamente igual à diferença de energia ΔE entre os dois níveis de energia. Ou seja, a condição de ressonância é satisfeita quando um fóton, de energia $h\nu$, onde ν é a frequência de um campo magnético oscilante, alcança esta diferença de energia,

$$\Delta E = h\nu = g\beta H. \quad (4)$$

Além disso, as transições entre os níveis de energia só são possíveis obedecendo a regra de seleção

$$\Delta M_S = \pm 1. \quad (5)$$

Na equação 4, o fator g , em sistemas isotrópicos, não depende da direção do campo magnético, enquanto que para sistemas anisotrópicos as propriedades de ressonância são descritas em função da orientação deste campo (RIEGER, 2007).

De acordo com Abragam e Pryce e Bleaney e Stevens (apud POOLE, 1967), a Hamiltoniana de spin que descreve a energia de interação de um átomo paramagnético com um campo magnético constante pode ser descrita como:

$$\mathbf{H} = H_{elet} + H_{ef} + H_{LS} + H_{SS} + H_{Ze} + H_{hfs} + H_Q + H_N, \quad (6)$$

onde, H_{elet} = energia eletrônica

H_{ef} = energia do campo cristalino

H_{LS} = interação spin-órbita

H_{SS} = interação spin-spin

H_{Ze} = Energia Zeeman

H_{hfs} = estrutura hiperfina

H_Q = energia de quadrupolo

H_N = energia de spin nuclear

Vale lembrar que, tanto o momento magnético eletrônico S , como o momento magnético nuclear I , interage com o campo magnético, de forma que cada componente contribui para a construção da Hamiltoniana.

Em materiais sólidos, as interações estáticas são até certo ponto interações anisotrópicas. Isto significa que possuem uma parte isotrópica que independe da orientação do campo magnético e outra parte que depende da orientação da molécula com relação à direção do campo magnético (STOLL; SCHWEIGER, 2015). Em alguns sistemas isotrópicos, tais como soluções e membranas, uma de suas propriedades é não depender da orientação do campo magnético (WEIL; BOLTON, 2007), e outra é ignorar as interações do campo magnético aplicado nos spins nucleares (RIEGER, 2007). Assim, a Hamiltoniana do sistema pode ser reduzida à seguinte expressão:

$$H_{hfs} = \mathbf{A}_0 \mathbf{S} \cdot \mathbf{I} = A_0(S_z I_z + S_y I_y + S_x I_x), \quad (7)$$

onde, A_0 é a constante de acoplamento hiperfino e, S_x , S_y , S_z e I_x , I_y , I_z , são as componentes dos momentos magnéticos eletrônicos e nuclear respectivamente (CARRINGTON; MCLACHLAN, 1967).

A Interação hiperfina é o resultado da interação entre o elétron desemparelhado e os núcleos que possuam algum momento nuclear, que possam estar ao redor deste elétron. Estas interações resultam em um desdobramento dos níveis de energia associados ao sistema. Entretanto, para átomos que possuam spin nuclear $I > 1/2$, as interações de quadrupolo H_Q , também devem ser levadas em conta de acordo com a Hamiltoniana de spin, mesmo para sistemas isotrópicos (LUND; LIU, 2003).

O número de linhas hiperfinas depende do número de spin eletrônico S , e do número de spin nuclear I , que podem assumir valores inteiros e semi-inteiros, de modo que o número dos níveis de energia é dado por

$$(2S + 1) \times (2I + 1), \quad (8)$$

e as transições possíveis entre eles, obedecem ainda à regra de seleção,

$$\Delta M_s = \pm 1 \text{ e } \Delta M_I = 0, \quad (9)$$

onde, as transições entres os estados de energia $\Delta M_s = \pm 1$, correspondem aos possíveis níveis energéticos ocupados pelos spin eletrônico, enquanto que os $\Delta M_I = 0$, correspondem às possíveis transições entre os estados de energia dos spins nucleares.

Outro fator determinante para que ocorra a ressonância, está relacionado à forma como os níveis de energia inferior e superior são ocupados pelos spins desemparelhados. Esta razão populacional de spins é dada segundo a distribuição de Boltzmann,

$$\frac{N_s}{N_i} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (10)$$

onde, N_s = população de spins no estado superior

N_i = população de spins no estado inferior

K = constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{-23} \text{ JK}^{-1}$)

T = temperatura absoluta (K)

Caso não ocorra a diferença populacional entre os níveis de energia, não ocorrerá nenhuma absorção resultante, em virtude de que neste momento o número de spins excitados seria o mesmo número de spins induzidos ao estado inicial, como consequência o sinal de RPE desaparecerá. Deste modo, um intenso campo de radiação que tende a igualar as populações, leva a uma diminuição da absorção líquida que não é instantaneamente restaurada uma vez que a radiação é removida. Esta importante tendência é chamada de saturação e o retorno do sistema de spin ao equilíbrio térmico mostra a importância do mecanismo de relaxação spin-rede (RIEGER, 2007; WEIL; BOLTON, 2007).

Entre os mecanismos de relaxação mais importantes estão o processo direto e o processo Raman. O processo direto é um mecanismo predominante em baixas temperaturas. Por outro lado, o processo Raman torna-se mais relevante conforme a temperatura do sistema aumenta (IKEYA, 1993).

A diferença entre os níveis energéticos, o nível fundamental E_1 e o estado imediatamente excitado E_2 , ajuda a determinar o tempo de relaxação T_1 do spin na rede, sendo as fórmulas típicas para $S=1/2$:

$$T_1 = \frac{10^4(E_2-E_1)^4}{\lambda^2 H^4 T} s \text{ (processo direto);} \quad (11)$$

$$T_1 = \frac{10^4(E_2-E_1)^6}{\lambda^2 H^2 T^7} s \text{ (processo Raman),} \quad (12)$$

onde E_1, E_2 e λ são expressos em cm^{-1} , H em Gauss e T é a temperatura absoluta e s é o tempo em segundos (POOLE; FARACH, 1975).

Em líquidos, a taxa na qual as moléculas se movem é caracterizada pelo tempo de correlação τ_c , que está em função da viscosidade η através da relação de Debye

$$\tau_c = \frac{(4 \pi \eta a^3)}{(3 K T)}, \quad (13)$$

onde a é o raio molecular. Nos líquidos, os tempos de relaxação T_1 são encontrados em termos da frequência angular de ressonância magnética ω_0 ,

$$\frac{1}{T_1} = C \left[\frac{\tau_c}{1+(\omega_0 \tau_c)^2} \right] + \left[\frac{2\tau_c}{1+(2\omega_0 \tau_c)^2} \right], \quad (14)$$

onde C é uma constante.

2.2 RMN E VISCOSIDADE

Fenômenos de RMN são observados quando o núcleo, que contém momento magnético de spin nuclear μ , é submetido a um campo magnético externo B_0 , promovendo uma interação e o consequente alinhamento dos spins nucleares, paralelamente ou antiparalelamente, a esse campo externo (BARBOSA et al., 2015). Existem dois momentos de relaxamento nomeados como: relaxação longitudinal (T_1) e

relaxamento transversal (T_2) que caracterizam o tempo do processo de recuperação do equilíbrio de energia. O relaxamento longitudinal também chamado de relaxação spin-rede corresponde à troca de energia entre o spin nuclear excitado e a rede e se refere à redução total de energia. O relaxamento transversal, também chamado de relaxamento spin-spin, é a interação entre os momentos magnéticos nucleares (spins), refere-se à energia total do sistema nuclear que continua sem alteração (ZHANG; SALEH; SHEN, 2013).

A Ressonância Magnética Nuclear é uma ferramenta eficaz ao avaliar rapidamente e de forma não destrutiva rochas e propriedades dos fluídos. Bloembergen, Purcell e Pound (1948) demonstraram uma íntima relação entre a viscosidade e os tempos de relaxação encontrados pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A RMN foi inicialmente utilizada para a medição da viscosidade de óleos brutos, pois além de ser um parâmetro importante para determinar as características de escoamento dos fluídos através dos poros das rochas, também é uma variável significativa na exploração de petróleo e no seu transporte (DENG et al., 2014).

Diversos autores propuseram equações que estabelecem a relação entre viscosidade e os respectivos tempos de relaxação (ZEGA; HOUSE; KOBAYASHI, 1989; ZHANG; LO; HUANG, 1998; LATORRACA; STONARD; WEBBER, 1999). Nicot, Fleury e Leblond (2006) apontam que numerosas correlações podem ser encontradas para conectar os tempos de relaxação encontrados via RMN à viscosidade. Entretanto, apontam três questões principais para uso destas relações. A detecção de pequenos tempos de relaxação. Neste caso, para óleos viscosos, os pequenos tempos de relaxação são subestimados ou não detectados, resultando numa perda de sinal. A variação do sinal entre a relação T_2 e η e a dependência das características do instrumento de RMN. Finalmente esses autores propõem uma equação que engloba todas estas alternativas. As constantes apresentadas, são referentes a valores empíricos apresentados pelos autores,

$$\eta = KT_{2ml}^{-n_1} \frac{1+CT_{2ml}^{-n_2}}{1+C} \quad (15)$$

onde, $K = 5300$,

$C = 1$,

$n_1 = 1,1,$

$n_2 = 2,$

T_{2ml} = valores encontrado no RMN.

A viscosidade é uma propriedade de grande interesse no processamento e na manipulação de óleos e gorduras (PEREDA, 2005). É tratada como a medida do atrito interno de um fluido, ou seja, é a medida da facilidade com que ele irá fluir quando sujeito à força de cisalhamento (LEWIS; HEPPELL, 2000). Alguns fatores alteram a viscosidade de uma solução, dentre estes, destacam-se a temperatura, a concentração, o peso molecular do soluto, a pressão e a quantidade de matéria suspensa. O aumento da temperatura altera diretamente a viscosidade do fluido proporcionando o seu decréscimo (LEWIS; HEPPELL, 2000; BOURNE, 1982).

Viscosidade dinâmica é frequentemente chamada apenas de viscosidade ou viscosidade absoluta e corresponde a uma fricção interna de um líquido ou à sua tendência a não fluir (BOURNE, 1982), normalmente denotada por η . Ainda segundo Bourne (1982), a viscosidade cinemática ν é definida como a viscosidade absoluta dividida pela densidade do fluido. Esta viscosidade não é comumente usada na indústria alimentícia.

2.3 ÓLEOS VEGETAIS

Óleos e gorduras são praticamente uma mistura de triglicerídeos mistos, pois, os demais constituintes aparecem em proporções menores, via de regra, inferior a 5% (D'ARCE, 2006). O que difere um óleo de uma gordura é que a 20°C, gorduras são sólidas e óleos são líquidos (ERICKSON, 1996). Gorduras e óleos comestíveis apresentam cadeias de carbono com comprimento que variam entre 4 e 24 átomos com uma ou mais duplas ligações. As cadeias de carbono presentes nos óleos e gorduras são chamadas comumente de saturadas e insaturadas (O'BRIEN, 1998). Os ácidos graxos saturados, apresentam apenas ligações simples do tipo (C-C), e os mais comuns são os ácidos Láurico (C-12:0), Mirístico (C-14:0), Palmítico (C-16:0), Esteárico (C-18:0), Araquidônico (C-20:0), Behênico (C-22:0), Lignocérico (C-24:0). Quando ocorre uma ou mais duplas ligações (C=C), os ácidos graxos são denominados como insaturados e são divididos em monoinsaturados e poli-insaturados. Os ácidos graxos monoinsaturados mais importantes são o ácido Oléico (C-18:1) e Erúico (C-22:1). Os ácidos graxos poli-insaturados mais relevantes são o

Linoleico (C-18:2), e o Linolênico (C-18:3) (SOUZA; MATSUSHITA; VISENTAINER, 1998). Do ponto de vista nutricional, óleos e gorduras são as fontes de energia mais concentradas existentes nos alimentos, além disso, são fontes de ácidos graxos essenciais. Esses ácidos graxos não podem ser sintetizados pelo próprio organismo (DAVID; COX, 2011) e, ao mesmo tempo, contribuem para a sensação de saciedade e atuam ainda como veículos das vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) (MANDARINO; ROESSING; BENASSI, 2005).

A Tabela 1 apresenta os principais ácidos graxos presentes em alguns óleos e gorduras, sua nomenclatura comum, o número de carbonos em sua cadeia e o número de duplas ligações existentes em cada uma.

Tabela 1 – Principais ácidos graxos encontrados em óleos e gorduras

	Átomos de Carbono	Duplas Ligações C-C	Ponto de fusão (°C)	Maior Ocorrência em Óleos e Gorduras
Butírico	4	0	-8	Manteiga
Laurico	12	0	44	Óleo de Coco
Mirístico	14	0	54	Manteiga, Óleo de Coco, Óleo de Palma.
Palmítico	16	0	63	Óleo de Palma, Manteiga, Gorduras de carne: Frango, Banha e Sebo
Esteárico	18	0	69	Sebo, Manteiga de Cacau, Manteiga e Toucinho
Oléico	18	1	14	Oliva, Amendoim, Banha, Palma, Milho, Girassol, Canola, Sebo
Linoleico	18	2	-5	Soja, Cártamo, Girassol, Milho, Algodão
Linolênico	18	3	-11	Soja, Canola
Gadoléico	20	1	-	Alguns óleos de peixe
Araquidônico	20	4	-40	Sebo, Banha
Behênico	22	0	80	Amendoim, Canola

Fonte: Lawson (1994)

Dentre as fontes destes ácidos graxos, destacam-se alguns óleos vegetais tais como: azeite de oliva, óleo de soja, óleo de palma, óleo de canola, óleo de girassol, de algodão, óleo de linhaça entre outros como óleo de peixes marinhos (MANDARINO; ROESSING; BENASSI, 2005).

2.3.1 Azeite de Oliva Extravirgem (AO)

Bons óleos de oliva são consumidos diretamente após o processo de extração, sem a necessidade de passar por nenhum tratamento (O' BRIEN, 1998). A alta qualidade do óleo de oliva extravirgem é devido, em parte, aos processos mecânicos de extração a frio. O óleo é utilizado sem qualquer purificação adicional e por isso mantém uma cor e um sabor altamente característico e a presença de certos tocoferóis e esteróis garante uma boa estabilidade oxidativa (PODMORE, 1994).

O óleo de oliva apresenta como principal característica para a manutenção da saúde, alto conteúdo de ácido oléico, sendo considerado, portanto, fonte de ácido graxo monoinsaturado (MANDARINO; ROESSING; BENASSI, 2005, APUD HAUMANN, 1996; LAWSON, 1994).

A tabela 2 apresenta os principais dos ácidos graxos presentes no óleo de oliva e suas respectivas quantidades.

Tabela 2 – Principais ácidos e suas quantidades encontrados no óleo de oliva

Ácidos Graxos		O'BRIEN (1998) g (%)	CARDOSO et al., (2010) g (%)	MELO E PINHEIRO (2012) g (%)
Palmitico	C-16:0	9,0	13,7	19,0
Palmitoléico	C-16:1	0,6	2,7	3,15
Esteárico	C-18:0	2,7	1,2	1,53
Oléico	C-18:1	80,3	68,7	57,10
Linoléico	C-18:2	6,3	0,54	13,60
Linolênico	C-18:3	0,7	0,1	0,57
Araquídico	C-20:0	0,4	-	0,40

Fonte: adaptado pelo autor

2.3.2 Óleo de soja (OS)

O óleo de soja é obtido da soja (*Glucina maxima*). Natural do oeste da Ásia (O'BRIEN, 1998), a soja chegou ao Brasil em 1882 primeiramente na Bahia, chegando depois a São Paulo e posteriormente ao Rio Grande do Sul (MIYASAKA; MEDINA, 1981). Atualmente, o óleo de soja é a principal fonte de matéria prima para a produção de biodiesel no Brasil (ANP, 2008).

O grão de soja possui 21% de óleo e 40% de proteína. Seu óleo é utilizado em saladas e é matéria-prima para a produção de margarinas e maioneses (VAUGHAN, 1970; WEISS, 1983). O consumo da proteína da soja é indicado no auxílio da redução do colesterol e na prevenção de doenças cardiovasculares (D'ARCE; VIEIRA, 2009). A tabela 3 apresenta os principais ácidos graxos presentes no óleo de soja. Nela verifica-se que o ácido graxo predominante neste óleo é o ácido graxo essencial linoléico.

Tabela 3 – Principais ácidos e suas quantidades encontrados no óleo de soja

Ácidos Graxos		MANDARINO (1992) g(%)	D'ARCE; VIEIRA (2009) g(%)	O'BRIEN (1998) g(%)
Mirístico	C-14:0	-	0,2	0,1
Palmítico	C-16:0	11 - 12	8,0 – 13,5	10,6
Palmitoléico	C-16:1	0,5	0,2	0,1
Margárico	C-17:1	-	0,1	0,1
Esteárico	C-18:0	2 - 4,5	2,0 – 5,4	4,0
Oléico	C-18:1	21 - 34	17,0 – 30,0	23,3
Linoléico	C-18:2	49 - 59	48,0 – 59,0	53,7
Linolênico	C-18:3	2 - 8,5	4,5 – 11,0	7,6
Araquídico	C-20:0	-	0,1 – 0,6	0,3
Behênico	C-22:0	-	0,7	0,3

Fonte : Adaptado pelo autor

2.3.3 Óleo de Linhaça (OL)

A semente de linhaça (*Linun usitatissimum* L.) possui, segundo Daun et al., (2003), cerca de 40% de óleo, 30% de fibra dietética, 20% de proteína, 4% de cinzas e 6% de umidade. Estes valores podem variar consideravelmente de acordo com as amostras envolvidas e dependendo da metodologia utilizada para medir cada um dos componentes. A linhaça é uma semente com várias aplicações, entre elas a de servir como matéria-prima para produção de óleo e farelo. Seu óleo é usado pelas indústrias na fabricação de tintas, vernizes e resinas. Já o farelo é vendido para fábricas de rações animais (GALVÃO et al., 2008).

O óleo de semente de linhaça é composto principalmente por ácidos graxos poli-insaturados. Graças a isso é considerado o alimento de origem vegetal mais rico em ácidos graxos ω -3, sendo reconhecido como uma grande fonte de ácido graxo α -linolênico (SIMBALISTA et al., 2012), além dessas características, apresenta também quantidades elevadas de fibras, proteínas e compostos fenólicos.

A linhaça possui também antioxidantes naturais, os quais, segundo Mandarino, Roessing e Benassi (2005) minimizam a ação dos radicais livres e reforçam as defesas do organismo. Além disso também, ela pode ser utilizada no tratamento de distúrbios gástricos, úlceras gástricas e duodenais.

A tabela 4 apresenta os principais ácidos graxos encontrados no óleo de semente de linhaça.

Tabela 4 – Principais ácidos e suas quantidades encontradas no óleo de linhaça

Ácidos Graxos		SIMBALISTA et al. (2012) g(%)	BARROSO et al. (2014) g(%)	DAUN et al. (2003) g(%)
Mirístico	C-14:0	-	0,03	-
Palmítico	C-16:0	6,9	4,9	4,8
Esteárico	C-18:0	5,8	2,61	3,6
Oléico	C-18:1	22,4	20,4	21,0
Linoléico	C-18:2	14,0	13,3	22,8
Linolênico	C-18:3	50,9	58,4	57,4

Fonte: Adaptado pelo autor

2.3.4 Óleo de Semente de Uva (OU)

O óleo de semente de uva é uma fonte valiosa de gordura dietética, além disso, é fonte de ácidos graxos poli-insaturados (ROCKENBACH et al., 2010). As sementes de uva possuem entre 10-20% de óleo, dependendo da variedade, com um elevado teor de vitamina E, que ajuda a reduzir o risco de sofrer de arteriosclerose (PARDO et al., 2009).

Devido à presença dos ácidos graxos insaturados, linoléico e oléico, o óleo de semente de uva oferece muitas vantagens para o consumo humano (SABIR; UNVER; KARA, 2011). Por conseguinte, a indústria farmacêutica, cosmética e alimentar, têm mostrado grande interesse neste óleo, principalmente devido à sua

atividade antioxidante (FERNANDES et al., 2013). A tabela 5 apresenta os principais ácidos graxos encontrados no óleo de semente de uva e as quantidades encontradas.

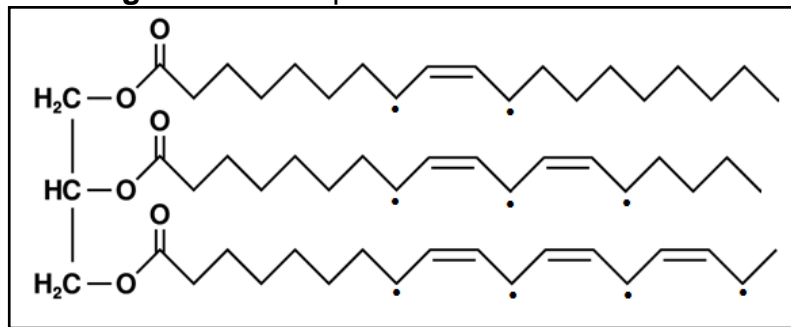
Tabela 5 – Composição dos ácidos graxos presentes em algumas variedades de semente de uva

Ácidos graxos		PARDO et al., (2009) (%)	PORTO; DECORTI; NATOLINO, (2013) (%)	FERNANDES et al., (2013) (%)
		Variedades de Uva		
		Monastrell	Raboso Piave	Periquita
Mirístico	C-14:0	0,05		0,07
Palmítico	C-16:0	8,05	7,22	6,17
Esteárico	C-18:0	5,87	3,07	4,78
Araquídico	C-20:0	0,21	-	0,24
Palmitoléico	C-16:1	-	0,16	0,18
Oléico	C-18:1	18,40	16,79	17,1
Linoléico	C-18:2	66,84	72,35	69,7
Linolênico	C-18:3	0,32	0,39	0,36

Fonte: adaptado pelo autor

2.4 DETERIORAÇÃO DE LIPÍDEOS

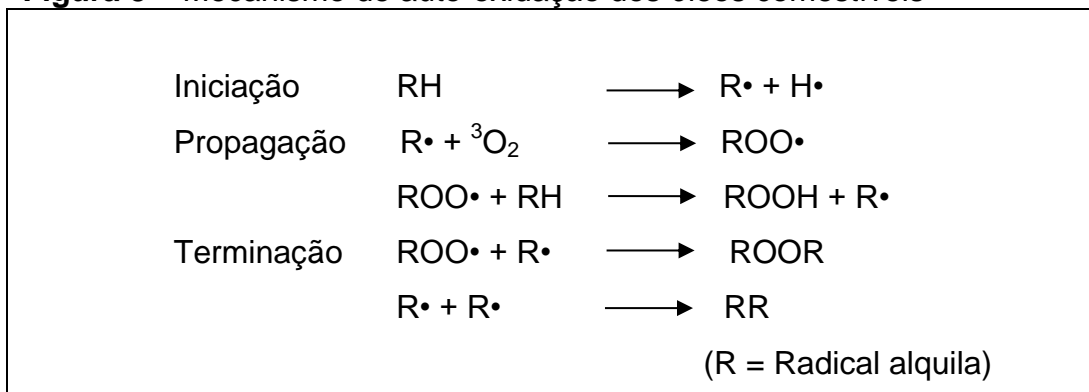
O surgimento de sabores e odores não desejáveis nos alimentos é resultado do processo de rancificação auto-oxidativa. Esta limita o tempo de conservação dos alimentos e normalmente estas alterações ocorrem nos compostos lipídicos, nos quais os grupamentos éster, formado entre a carboxila do ácido graxo e a hidroxila do glicerol ou de outros alcoóis que pertencem à classe de relativa reatividade das moléculas lipídicas, hidrolisando-se a ácidos graxos livres na maioria das vezes. Outros sítios reativos da molécula lipídica são as duplas ligações presentes nas cadeias hidrocarbonadas de um número de ácidos graxos (D'ARCE, 2006; PEREDA et al., 2005), conforme Figura 2.

Figura 2 – Principais sítios reativos

Fonte: Adaptado pelo autor de D'Arce (2006)

Os óleos vegetais são naturalmente mais reativos que as gorduras animais, cujos ácidos graxos são predominantemente saturados (NAZ et al., 2004). Em temperatura ambiente, a oxidação é conhecida como auto-oxidação. Este processo ocorre lentamente necessitando de um tempo para produzir uma quantidade suficiente de peróxidos, que é o produto principal da auto-oxidação (LAWSON, 1994).

Cinco fatores contribuem para a deterioração oxidativa dos óleos e gorduras: oxigênio atmosférico, calor, luz, metais pró-oxidantes e tempo (LIST; ERICKSON, 1980). A auto-oxidação dos óleos é uma reação em cadeia de radicais livres, que apresenta as seguintes fases: iniciação, propagação e terminação (PEREDA et al., 2005) conforme indica a Figura 3.

Figura 3 – Mecanismo de auto-oxidação dos óleos comestíveis

Fonte: Adaptado de Choe e Min (2006)

Nas reações de iniciação, formam-se radicais livres a partir dos ácidos graxos insaturados, que se combinam com o oxigênio produzindo peróxidos lipídicos; nas reações de propagação, acumulam-se os peróxidos, e é nesta etapa que se oxida a maioria dos lipídeos insaturados; nas reações de terminações, os radicais livres

procedentes da decomposição dos peróxidos lipídicos associam-se, formando compostos estáveis (PEREDA et al., 2005).

2.5 CAPTURA DE RADICAIS LIVRES

Um radical livre, por definição é uma espécie que contém elétrons desemparelhados e é conseqüentemente paramagnético (FINKELSTEIN; ROSEN; RAUCKMAN, 1980).

Na Biologia e na Medicina, os radicais livres aparecem envolvidos em muitos aspectos diferentes do metabolismo. Eles são relacionados, por exemplo, à oxidação enzimática de ácidos graxos (YOSHIKAWA; NAITO; KONDO, 1997). Segue abaixo algumas espécies de radicais livres (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

$^1\text{O}_2$ - oxigênio singleto.

O_2^\bullet - radical superóxido.

OH^\bullet - radical hidroxila.

NO^\bullet - óxido nítrico.

ONOO^\bullet - peroxinitrito.

Q^\bullet - radical semiquinona.

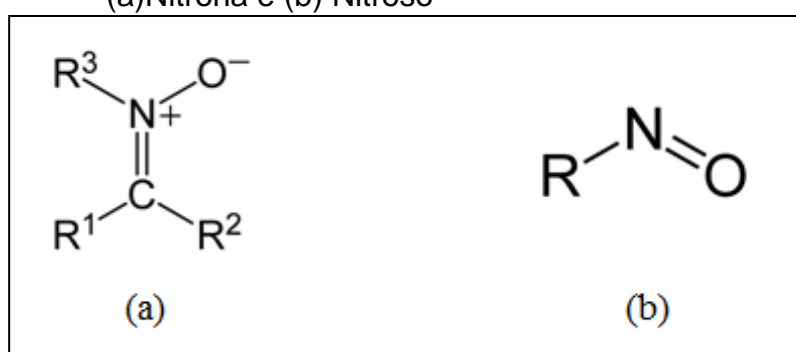
Radicais livres são frequentemente rotulados como radicais do tipo π e do tipo σ , e tendem a ser localizados no orbital s ou no orbital p (WEIL; BOLTON, 2007). São encontrados em sistemas sólidos, líquidos e gasosos. Uma das características dos radicais livres é que o local do ataque do radical não é seletivo, mas aleatório. Por exemplo, o radical hidroxila (OH^\bullet) ataca qualquer molécula aleatoriamente enquanto que o radical superóxido (O_2^\bullet) que é menos reativo, por outro lado, é mais seletivo no ataque molecular (YOSHIKAWA; NAITO; KONDO, 1997). Além disso, radicais (OH^\bullet), especialmente quando estão em soluções, tem a característica de serem muito difíceis de detectar, devido à sua alta mobilidade e à sua grande reatividade. Radicais atacam lipídios, açúcares e proteínas. Além desses compostos, atacam também o DNA, induzindo oxidações as quais podem produzir várias doenças.

Como mencionado, para situações nas quais não existe uma concentração mínima de radicais livres (BUNCE, 1987), com tempos de vida que variam entre nanosegundos e segundos (ROHN; KROH, 2005), para que o RPE

detecte sua presença, faz-se necessário utilizar “armadilhas de spins”, conhecidas como spin trap.

Lagercrantz e Forshult (1969) e Chalfont, Perkins, e Horsfield (1968) desenvolveram a noção de que a adição de compostos nitrosos e compostos nitronas, poderiam ter utilidade analítica para a detecção e identificação de radicais livres, pois ao reagirem com os radicais livres os aprisionam (BASKIN; SALLEM, 1987). A Figura 4 apresenta exemplos destes compostos.

Figura 4 – Exemplos de estruturas mais usadas como spin trap.
(a) Nitrona e (b) Nitroso



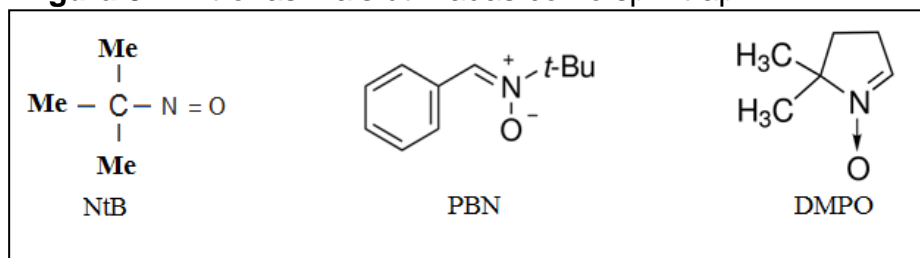
Fonte: Adaptado de Weil e Bolton (2007)

Janzen e colaboradores (JANZEN; KOTAKE; HINTON, 1992) investigaram o uso de compostos nitronas, em particular o α -Phenyl-*N-tert*-butylnitrona (PBN) lançando o nome “spin trapping”. Esta técnica consiste em acrescentar moléculas orgânicas diamagnéticas em substâncias nas quais os radicais reagem rapidamente, sendo estas moléculas capazes de estabilizar o radical aprisionado e formar um “radical adulto” (BUNCE, 1987). Radicais centrados no oxigênio, como é o caso dos compostos nitrosos, são eficientes na captura de radicais e apresentam boas informações sobre os radicais adultos formados. Entretanto, pela sua baixa solubilidade em água e sua grande sensibilidade à luz e aos efeitos térmicos, seu tempo de vida é muito curto, limitando seu uso em sistemas biológicos (CLÉMENT; TORDO, 2007).

Entre as nitronas, Figura 5, destacam-se o, *tert*-nitrosobutano (NtB), 5,5-dimetilpirolina-N-óxido (DMPO) e o α -Phenyl-*N-tert*-butylnitrona (PBN). Nestes compostos, o ataque do radical ocorre diretamente no átomo de nitrogênio. Geralmente isso significa que a elucidação da estrutura do radical aprisionado é mais simples, pois o radical aprisionado fica mais próximo do átomo de nitrogênio,

forneendo uma melhor informação sobre o radical aprisionado e suas estruturas hiperfinas (HARTGERINK, 1971).

Figura 5 – Nitronas mais utilizadas como spin trap

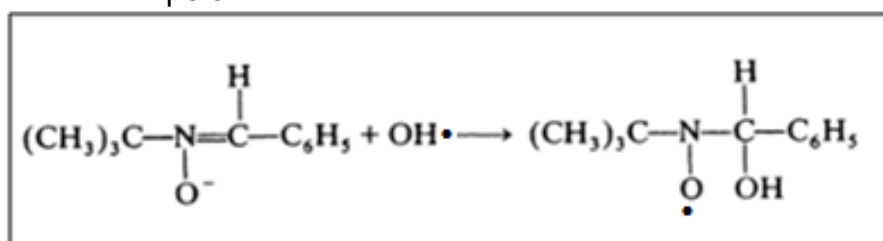


Fonte: Adaptado de Rohn e Kroh (2005)

Com o uso do spin trap, o radical é identificado indiretamente, pois ao adicionar espécies químicas apropriadas, produzem-se radicais estáveis e detectáveis por RPE e, desta forma, é possível identificá-lo pelo padrão de suas linhas hiperfinas.

A Figura 6 representa como um radical hidroxila (OH^\bullet) é aprisionado pelo PBN em uma solução, formando um radical nitróxido.

Figura 6 – Esquema de captura e formação do radical nitróxido pelo PBN



Fonte: Adaptado de Weil e Bolton (2007)

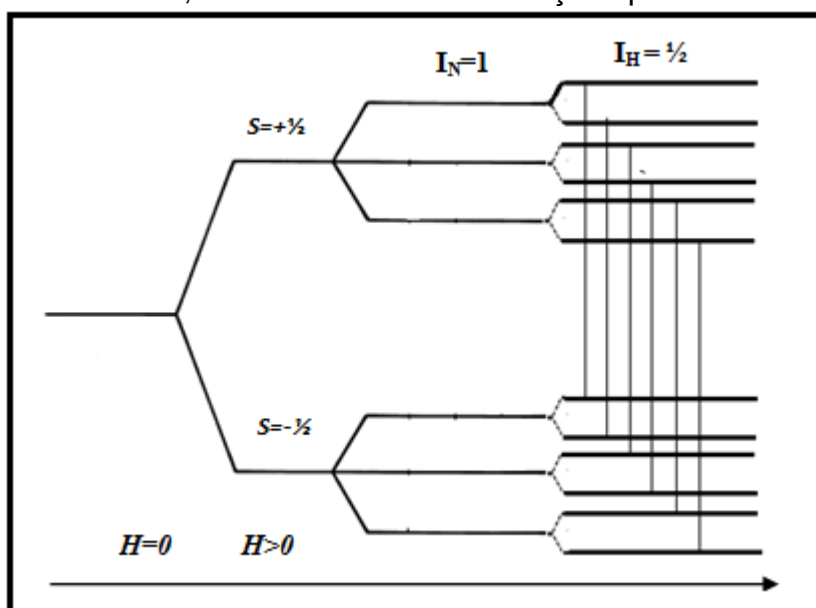
Em uma concentração de 1% de H_2O_2 , para o radical nitróxido formado com o uso do PBN, Harbour, Chow, e Bolton (1974), encontraram um primeiro tripleto com constantes de acoplamento hiperfinas de valor $A_N = 15,30\text{G}$ e $g = 2,0057$ referente à interação do radical livre com o átomo de nitrogênio e os valores encontrados para o acoplamento dos dubletos para o átomo de hidrogênio foram de $A_H = 2,75\text{G}$. Para concentrações de 30% de H_2O_2 , os valores das constantes ficaram em $A_N = 14,80\text{G}$ e $A_H = 2,75\text{G}$ respectivamente. Entretanto, afirmam que esta divisão hiperfina ainda não é bem resolvida para o grupo hidroxila (OH).

Esta configuração de um tripleto ($I_N = 1$) e um dubleto ($I_H = \frac{1}{2}$) representa as interações possíveis entre o radical aprisionado e a molécula do PBN.

Em virtude das regras de seleção $\Delta M_s = \pm 1$ e $\Delta M_I = 0$, só será possível encontrar seis linhas de transição por RPE. O surgimento dessas linhas pode ser visualizado através do diagrama de níveis de energia (Figura 7). Neste, considera-se a interação existente entre o campo magnético H e o radical aprisionado ($S=1/2$), propiciando o conhecido Efeito Zeeman. Os desdobramentos hiperfinos acontecem devido à interação entre o radical e o átomo de nitrogênio ($I_N=1$), e à interação de menor intensidade que ocorre entre o radical e o átomo de hidrogênio ($I_H=1/2$).

A figura 7 apresenta o diagrama dos níveis de energia e as transições possíveis, responsáveis pelo surgimento dos espectros de RPE.

Figura 7 – Esquema de interações ocorridas entre o radical livre e a molécula do PBN, e os seis níveis de transições possíveis



Fonte: o autor.

2.6 OBJETIVOS

- ✓ Acompanhar a formação espontânea de radicais livres em alguns óleos vegetais utilizando a técnica de spin trap.
- ✓ Simular o processo de estocagem e quantificar o número de espécies capturadas neste intervalo de tempo.
- ✓ Relacionar o tipo de óleo com a quantidade de radicais gerados.
- ✓ Analisar a influência da temperatura no meio reacional.
- ✓ Encontrar experimentalmente os desdobramentos hiperfinos esperados entre o radical aprisionado e a molécula do spin trap (PBN).
- ✓ Determinar a influência que a mudança da viscosidade provoca no comportamento molecular.

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ÓLEOS UTILIZADOS

Utilizou-se neste trabalho cinco tipos de óleos vegetais, com características distintas, utilizados tanto para fins industriais como para fins alimentícios. Os óleos utilizados neste trabalho foram: azeite de oliva extravirgem (AO), óleo de soja comercial (SC), óleo de soja sem adição de antioxidantes (SA), óleo de linhaça (OL) e óleo de semente de uva (OU).

O azeite de oliva extravirgem, o óleo de soja comercial e o óleo de linhaça foram adquiridos no mercado local. O óleo de soja sem adição de antioxidantes foi gentilmente cedido por uma indústria de óleos da região de Londrina e as amostras do óleo de semente de uva foram cedidas pelo Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina.

3.2 SPIN TRAP

O spin trap utilizado neste trabalho foi o α -Phenyl-*N*-*tert*-butylnitrone (PBN > 97% purity), adquirido da empresa Sigma-Aldrich.

3.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS E PARÂMETROS DA RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA

Alíquotas de $1,000\text{g} \pm 0,001\text{g}$ de cada tipo de óleo foram preparadas conforme Velasco (2004). Em uma balança Adventurer Shaus modelo AR 2140, 1,000 grama de óleo foi colocado em tubo de ensaio de 25 mL e adicionado $1,0\text{mg} \pm 0,1\text{mg}$ de PBN. Este processo foi denominado “incubação do óleo”.

Após a adição do PBN, as amostras foram colocada em banho ultrassônico *ultracleaner* modelo 1450 A USC, Unique, com aquecimento e frequência de 25 KHz. As amostras foram mantidas no banho de ultrassom em temperatura de 30°C por 15 minutos, a fim de que o PBN se dissolvesse completamente no óleo. Após esse procedimento, as amostras eram armazenadas em local escuro e em

temperatura ambiente.

Para o experimento de RPE, uma alíquota de 40µl de óleo era depositada em um tubo de quartzo de 3 mm de diâmetro e sua massa era medida. Os tubos com as amostras eram inseridos diretamente na cavidade do espectrômetro de RPE. As medidas de RPE ocorreram imediatamente após o banho ultrassônico, denominado tempo 0, e também aconteceram em tempos que variaram em até 120 dias de acordo com a característica de cada óleo.

Os óleos foram analisados em temperatura ambiente e também submetidos a um tratamento térmico. O experimento foi realizado em um espectrômetro JEOL (JES-PE-3X) operando em banda X (~9,5 GHz), no Laboratório de Fluorescência e Ressonância Paramagnética Eletrônica (LAFLURPE) do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Londrina.

Na etapa de aquecimento, utilizou-se um sistema de aquecimento acoplado ao RPE. As alíquotas de óleo foram submetidas a aquecimento entre 25°C e 180°C. A partir dos 30°C, os espectros foram obtidos em intervalos de 10°C.

Os experimentos com variação de temperatura foram realizados com um controlador de temperatura variável (JES-VT-3A), que acoplado ao espectrômetro permite variar a temperatura entre -170°C e 300°C utilizando um fluxo de nitrogênio (N₂) conectado ao RPE.

Na cavidade ressonante, foram colocados dois padrões paramagnéticos cujos parâmetros espectroscópicos são conhecidos. O marcador de campo cromo dopado com óxido de magnésio (Cr³⁺:MgO), do qual é conhecido o número de espécies paramagnéticas e o marcador de campo, magnésio dopado com óxido de manganês (MgO:Mn²⁺), fornecido pelo fabricante do espectrômetro. Desta forma, em medidas realizadas preliminarmente, foram gerados simultaneamente espectros com os sinais das duas espécies simultaneamente: um do padrão de manganês e outro referente ao padrão de cromo. Por comparação entre as áreas obtidas após a integração matemática dos espectros pode-se determinar o número de espécies existentes no padrão de manganês (MgO:Mn²⁺). Após esta determinação, utilizou-se o marcador de campo magnético MgO:Mn²⁺, em todas as medidas juntamente às amostras dos óleos analisados, a fim de proporcionar a padronização necessária para realizar a quantificação das espécies aprisionadas.

Em todos registros dos espectros, a amplitude, a modulação do sinal, o tempo de resposta (0,1s), o tempo da medida (4 minutos), centro de campo

magnético em 3300 G e varredura de ± 100 G foram mantidos inalterados. Entretanto, a frequência e potência de micro-onda eram ajustadas em cada leitura. Como em todas as medidas foi utilizado o marcador MgO:Mn^{2+} , o cálculo do valor do fator espectroscópico g e a quantificação das espécies capturadas não foram afetados com a alteração destes parâmetros.

As condições utilizadas de ajuste do EPR foram as seguintes para as medidas realizadas neste trabalho: Centro do campo magnético: 3300 Gauss; Varredura: ± 100 Gauss; tempo de varredura: 4 minutos; Modulação: 5 G; Tempo de resposta: 0,1s; Frequência de micro-ondas: $\sim 9,5$ GHz.

3.4 FATOR ESPECTROSCÓPICO g E QUANTIFICAÇÃO DOS RADICAIS

O marcador MgO:Mn^{2+} utilizado possui um momento de spin resultante $5/2$, apresentando um espectro de seis linhas de ressonância (IKEYA, 1993), cujo valor g referente à quarta linha do espectro é igual a $1,981$. Os valores conhecidos do g da quarta linha do marcador serviram como referência para o cálculo do fator espectroscópico do radical encontrado, conforme equação 16,

$$g = \frac{g_4(H_4 - H) + H}{H}, \quad (16)$$

onde, g = Fator g do radical

g_4 = Fator g da 4ª linha do manganês

H = Campo magnético do centro da linha do radical

H_4 = Campo magnético do centro 4ª linha do manganês

A área sob a curva de absorção é usualmente proporcional ao número de spins desemparelhados da amostra (POOLE, 1967). Com o auxílio do software Origin8,5, foi possível realizar o processo de integração do espectro de RPE de cada óleo, e assim determinar a quantidade de radicais livres aprisionados pelo PBN. Deste modo, determinaram-se as áreas relativas à quarta linha do padrão de manganês e a área referente a todas as linhas do radical capturado. O número de espécies paramagnéticas foi determinado por comparação entre as áreas da quarta linha do manganês e a área do radical encontrado conforme equação 17,

$$N^{\circ} Esp = \frac{A Rad \times N^{\circ} Mn}{A Mn}, \quad (17)$$

onde, $N^{\circ} Esp$ = Número de espécies do Óleo

$A Rad$ = Área do radical capturado

$N^{\circ} Mn$ = Número de espécies do Padrão de Manganês

$A Mn$ = Área da quarta linha do Padrão de Manganês.

3.5 ESPECTROSCOPIA DE RMN

Todos os experimentos de RMN foram feitos em um aparelho Bruker Minispec MQ20, com um campo magnético estático de 0,5 T e frequência de Larmor $\omega_0 \sim 20$ MHz. A temperatura foi ajustada usando um controlador de temperatura Bruker BVT 3000, com resolução de 1K na amostra. As amostras analisadas por RMN, não continham o PBN.

3.6 VISCOSIDADE CINEMÁTICA

Os experimentos de viscosidade cinemática ocorreram com o auxílio de um banho termostático da marca Láctea modelo Flash. O viscosímetro utilizado era da marca Cannon, de número de série U 558, temperatura de 40 °C à 100 °C e fator de correção de 0,0082216 mm/s² e 0,008198 mm/s².

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISES EM TEMPERATURA AMBIENTE

4.1.1 Espectros dos Óleos Vegetais

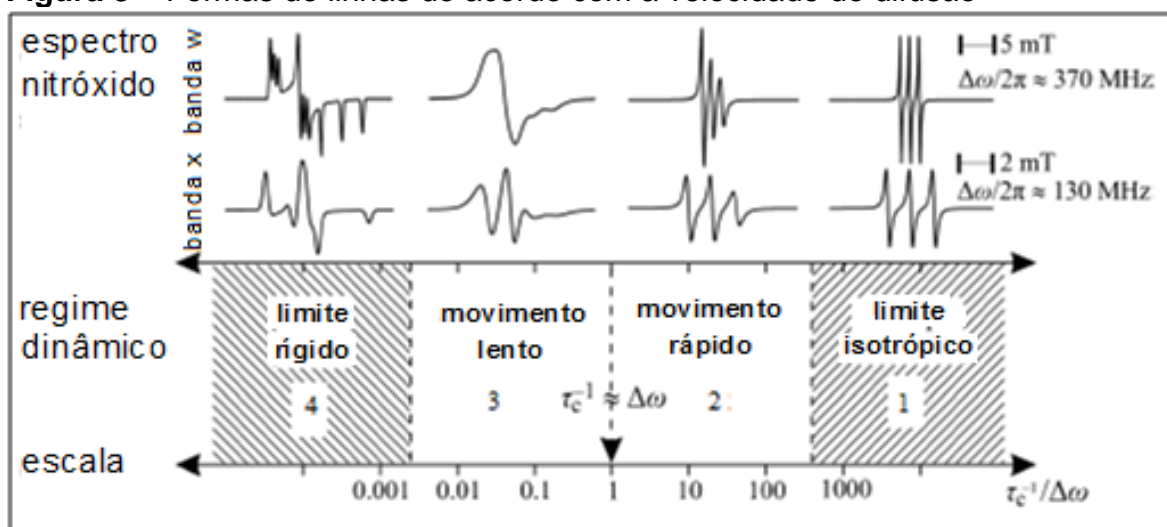
Inicialmente todas as amostras de óleos foram submetidas a medidas de RPE, a fim de averiguar a existência de espécies paramagnéticas. Verificou-se que em temperatura ambiente, não são encontrados sinais de ressonância referente a espécies paramagnéticas. O fato destes sinais não serem encontrados, não quer dizer necessariamente que tais espécies não existam. Como não foram detectados diretamente é possível que o tempo de vida desses radicais seja extremamente curto e que possam estar reagindo entre si, gerando espécies que possuem momento angular intrínseco de spin igual a zero, o que impossibilita a detecção pelo espectrômetro.

Como relatado na literatura (JANZEN; KOTAKE; HINTON, 1992), o PBN possui a função de capturar espécies paramagnéticas que reagem rapidamente, cujos tempos de meia-vida são muito curtos. Desta maneira, os sinais observados são encontrados de forma indireta, isto é, pode-se “enxergar” a presença de radicais livres, que, antes de se acoplarem a outras espécies reativas, são capturados pela molécula do PBN. Todos os óleos foram analisados inicialmente sem a presença do spin trap e não apresentaram nenhum sinal de ressonância, demonstrando que não é possível detectar de forma direta a presença de radicais livres nesses óleos vegetais estudados.

Segundo Stoll e Schweiger (2015), o processo dinâmico mais importante e mais visível observado por RPE em membranas ou soluções, que é o caso dos óleos, é a mudança na mobilidade molecular. A componente rotacional do movimento modula as frequências de ressonância e dá origem às flutuações nos campos magnéticos locais que induzem às transições. O tempo de correlação τ_c , que denota o tempo característico, no qual as moléculas que estavam inicialmente com orientações idênticas perdem o seu alinhamento, podem então ser relacionadas com

o coeficiente de difusão rotacional D_{rot} de cada molécula e a viscosidade η do meio usando a relação de Stokes-Einstein (NICOT; FLEURY; LEBLOND, 2006). Ainda segundo estes mesmos autores, ao comparar-se a velocidade da difusão de rotação τ_c , pode-se, distinguir quatro regimes dinâmicos com tipos distintos de espectros de RPE: (1) limite isotrópico, (2) movimento rápido, (3) lento, e (4) limite rígido. Elas são ilustradas na Figura 8, juntamente com os espectros da amostra de um radical nitróxido em banda X e banda W.

Figura 8 – Formas de linhas de acordo com a velocidade de difusão



Fonte: adaptado pelo autor de Stoll e Schweiger (2015, p.302)

Os espectros de RPE referentes ao Azeite de Oliva Extravirgem, e aos óleos de soja, linhaça e de semente de uva apresentados a partir da Figura 20 exibem comportamento rápido (2) quando em temperatura ambiente, passando para o regime isotrópico (1) quando ocorre o aumento da temperatura do sistema.

Dessa forma, os óleos apresentam comportamentos semelhantes, principalmente em relação às alterações das formas de linhas. Mas há de salientar, que, as temperaturas que propiciam o início destas alterações são temperaturas próprias de cada óleo. Dessa maneira, o conjunto de três linhas encontradas nas análises por RPE em temperatura ambiente são alteradas em determinada temperatura segundo a característica de cada óleo, ocorrendo então o segundo desdobramento hiperfino.

No que tange às alterações nas formas de linhas, a temperatura altera de forma mais tocante o meio reacional, pois, ao alterá-lo, muda-se o coeficiente de

viscosidade do óleo. Observa-se que para líquidos de baixa viscosidade, as moléculas podem ter uma oportunidade de passar por alguns ciclos de rotação, que anteriormente não passavam antes de colidir entre elas (WEIL; BOLTON, 2007).

As intensidades dos sinais de ressonância, por sua vez, são influenciadas pela ação direta da temperatura. Wilson e Kivelson (1966) demonstraram que este efeito alarga todas as linhas igualmente, pois ao fornecer uma quantidade de energia extra ao sistema, altera-se de modo significativo a relação entre os níveis populacionais.

Analisando-se os espectros de RPE de todos os óleos, verifica-se um comportamento semelhante com relação à influência da temperatura no desdobramento hiperfino. Segundo Canciam (2010), a concentração dos ácidos graxos e os parâmetros reológicos estão relacionados. Além disso, o autor confirma diante das análises feitas que óleos vegetais com maior concentração de ácidos graxos monoinsaturados necessitam de maiores energias de ativação. Essa energia indica a sensibilidade da viscosidade devido à mudança de temperatura. Desse modo, óleos com maior concentração de ácidos graxos monoinsaturados necessitarão de maiores temperaturas para se obter uma menor viscosidade.

4.1.2 Espectros de RPE com Spin Trap

Mesmo havendo a introdução do spin trap no óleo, não foi possível detectar a presença de radicais livres diretamente após a incubação, ou seja, verificou-se que é necessário um tempo mínimo e uma quantidade mínima (BUNCE, 1987) de espécies paramagnéticas capturadas pelo spin trap, para que sejam detectados sinais de ressonância paramagnética eletrônica. Desse modo, pode-se inferir que a geração de radicais livres pelos óleos e a consequente captura pelo PBN ocorrem de forma lenta e gradual.

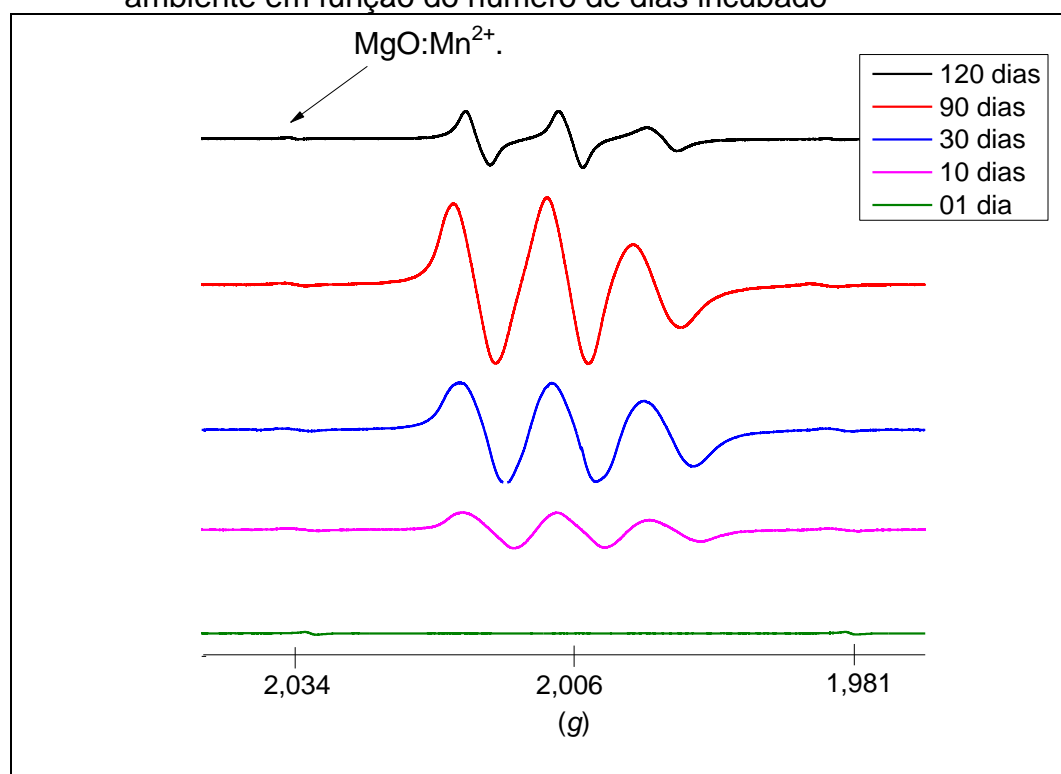
As análises realizadas posteriormente buscaram determinar o tempo mínimo no qual se pode detectar o surgimento de radicais livres em cada óleo vegetal. Verificou-se que quanto maior o tempo de contato entre o spin trap e o óleo, maior é a concentração de radicais capturados. Deste modo foi possível quantificar o número de espécies capturadas pelo spin trap ao longo do tempo de incubação.

A seguir são apresentados os resultados encontrados em todos os óleos vegetais analisados.

4.2 RPE DO AZEITE DE OLIVA EXTRAVIRGEM (AO)

O azeite de oliva extravirgem, contendo PBN, foi analisado nos tempos de 01 dia, 10 dias, 30 dias, 90 dias e 120 dias após a incubação. Inicialmente, foram feitas medidas em temperatura ambiente. A Figura 9 apresenta os espectros encontrados.

Figura 9 – Espectros de RPE do azeite de oliva extravirgem em temperatura ambiente em função do número de dias incubado



Fonte: o autor

Na Figura 9, esperava-se encontrar seis linhas de ressonância em virtude da composição molecular do PBN (PAPADIMITRIOU et al., 2005; HARBOUR; CHOW; BOLTON, 1974). Entretanto, verificou-se somente a partir do décimo dia de incubação, o surgimento de apenas três linhas de ressonância e que a intensidade do sinal cresce em função do tempo de incubação do óleo pelo spin trap até os noventa dias de incubação. Essas três linhas de ressonância encontradas são referentes à interação ocorrida entre o radical capturado e o átomo de nitrogênio que existe na molécula do PBN (VELASCO; ANDERSEN; SKIBSTED, 2005).

Vale ressaltar que, Velasco, Andersen e Skibsted (2005), ao analisar a oxidação nos óleo de canola, girassol e óleo de peixe encontraram também apenas

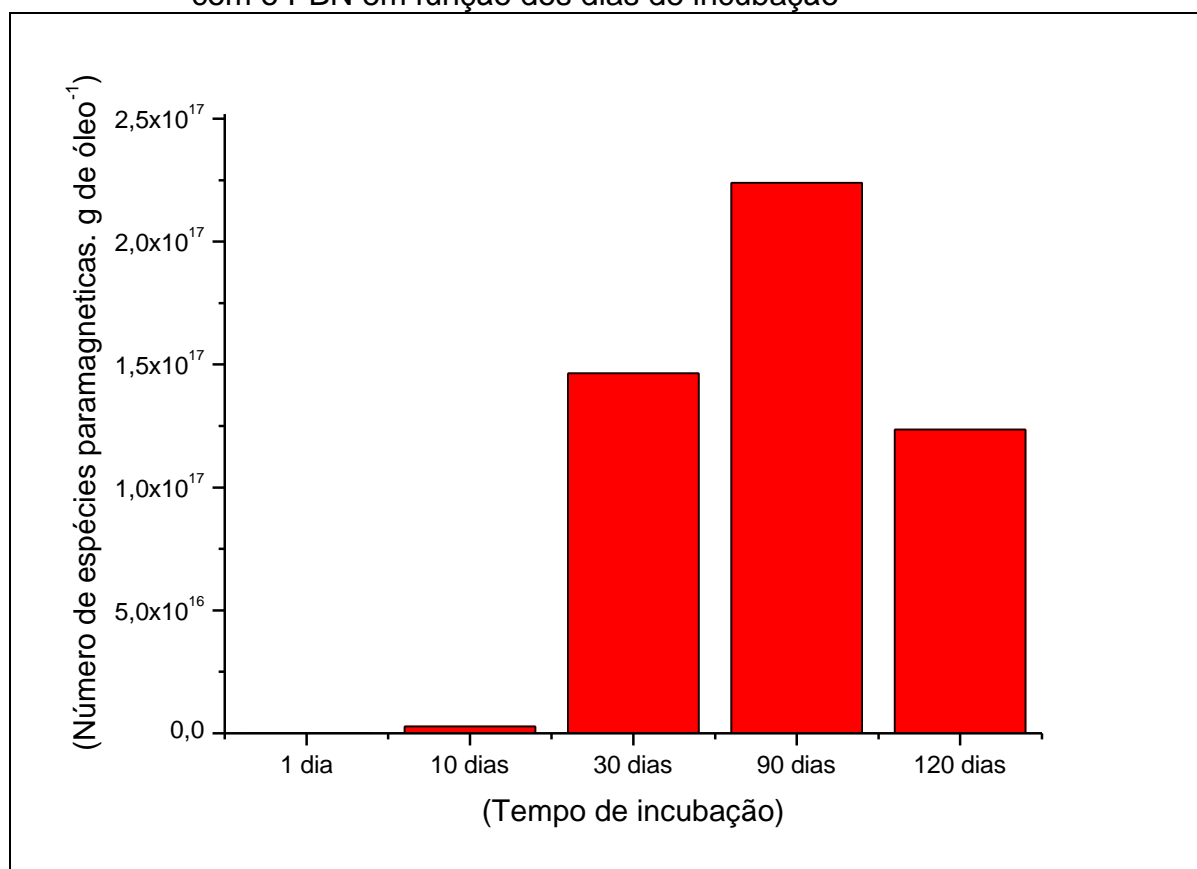
três linhas de desdobramento. Segundo esses autores, o alargamento das linhas, devido ao alto volume molecular dos radicais apreendidos pelo PBN, é o motivo da não visualização das seis linhas de ressonância. Além disso, segundo Pingret (2012), o acúmulo de radicais detectados, proporciona alterações nas formas das linhas de ressonância, sugerindo uma sobreposição de linhas.

Nota-se ainda, que aos 90 dias de incubação ocorre a detecção do maior número de espécies paramagnéticas, e mesmo sob essas condições, o desdobramento referente às interações do radical capturado com o átomo de hidrogênio PBN não é visualizado. Já aos 120 dias, é possível verificar uma queda na intensidade do sinal referente ao número de radicais acumulados, ou seja, capturados pelo PBN, em comparação com 90 dias.

O azeite de oliva extravirgem apresentou o valor da constante de acoplamento hiperfina $A_N = 14,79\text{G}$ e em temperatura ambiente não apresentou o desdobramento hiperfino referente à interação com o átomo de hidrogênio. Ottaviani et al., (2001) encontraram o valor da constante de acoplamento hiperfina para o azeite de oliva extravirgem $A_N = 15,3\text{G}$ e não encontraram o desdobramento referente ao átomo de hidrogênio. O fator espectroscópico g encontrado para o azeite de oliva foi de $2,006 \pm 0,001$, valor muito próximo ao encontrado por Thomsen et al., (2000) (2,0059). Vale ressaltar que este valor não se altera, independentemente do tempo de incubação, da quantidade de espécies capturadas e das formas de linha detectadas.

A Figura 10 apresenta a concentração de espécies paramagnéticas encontradas no azeite de oliva.

Figura 10 – Concentração do número de radicais livres no azeite de oliva, incubados com o PBN em função dos dias de incubação



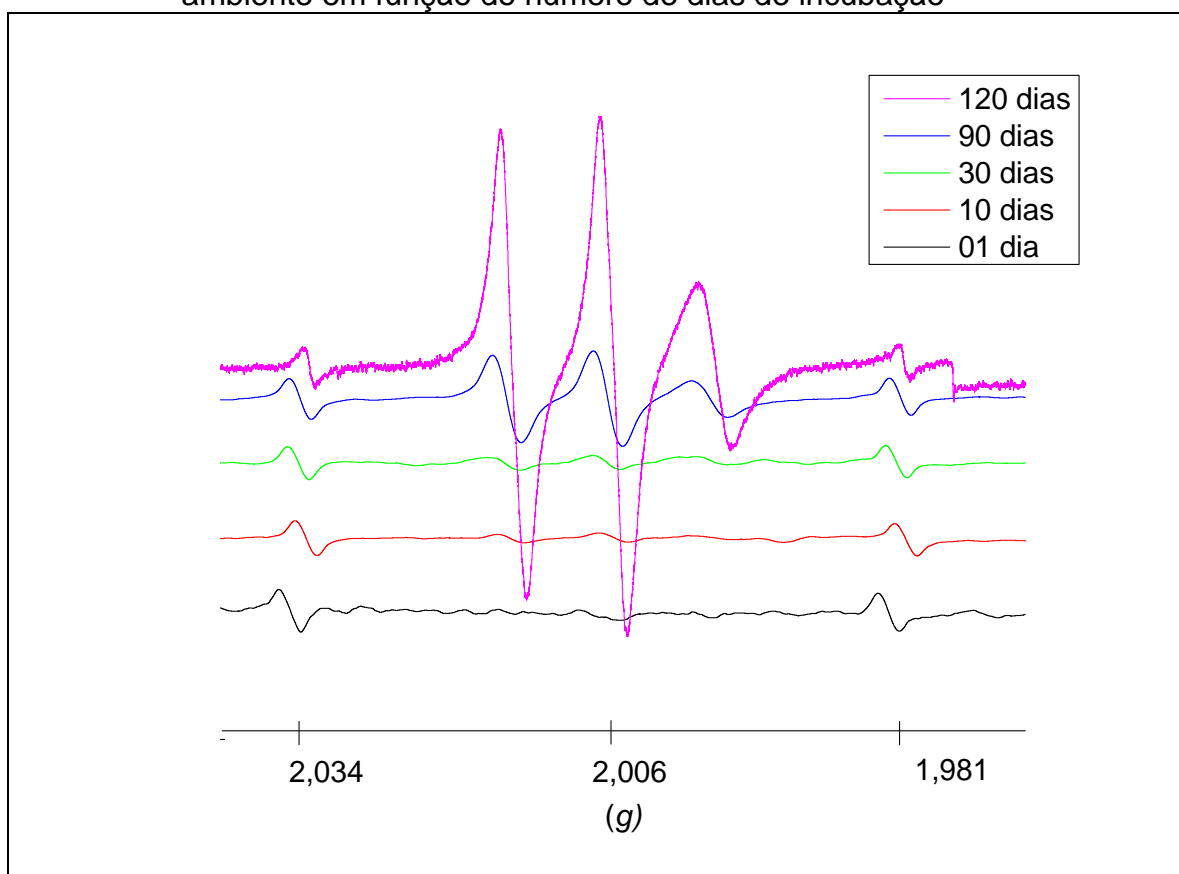
Fonte: o autor

Nota-se na Figura 10, que no azeite de oliva com apenas 01 dia de incubação em temperatura ambiente não foi possível identificar radicais livres. A partir do décimo dia já foi possível quantificar as espécies capturadas. Este crescimento permaneceu de forma bem acentuada até os 90 dias de incubação. Entretanto no tempo de 120 dias de incubação existe um decréscimo no número de radicais. Especula-se que para períodos longos de armazenamento, onde a quantidade de radicais é elevada, a queda na intensidade do sinal ocorra pelo fato de que as próprias moléculas do PBN adulto estejam se ligando a outro radical livre presente no óleo, ou uma molécula de PBN adulto está se ligando à outra, formando nestes dois casos uma molécula estável, a qual não apresenta sinal de ressonância, explicando dessa forma o decréscimo observado na intensidade do sinal de ressonância.

4.3 RPE DO ÓLEO DE SOJA COMERCIAL (SC)

O óleo de soja comercial, já incubado, foi analisado nos tempos de 01 dia, 10 dias, 30 dias, 90 dias e 120 dias. Estas análises ocorreram em temperatura ambiente. A Figura 11 apresenta a evolução dos espectros neste período. Verifica-se no SC os espectros começam a apresentar as três linhas de ressonância a partir dos 10 dias de incubação. Estas três linhas, são referentes à interação ocorrida entre o radical capturado e o átomo de nitrogênio que existe na molécula do PBN, permanecendo com suas linhas pouco intensas até os 30 dias de incubação. Somente a partir de 90 dias verifica-se uma alteração robusta na intensidade do sinal encontrado. Nota-se ainda, que aos 120 dias de incubação o sinal se torna intenso, porém, o espectro ainda permanece com apenas três linhas de ressonância.

Figura 11 – Espectros de RPE do óleo de soja comercial, em temperatura ambiente em função do número de dias de incubação



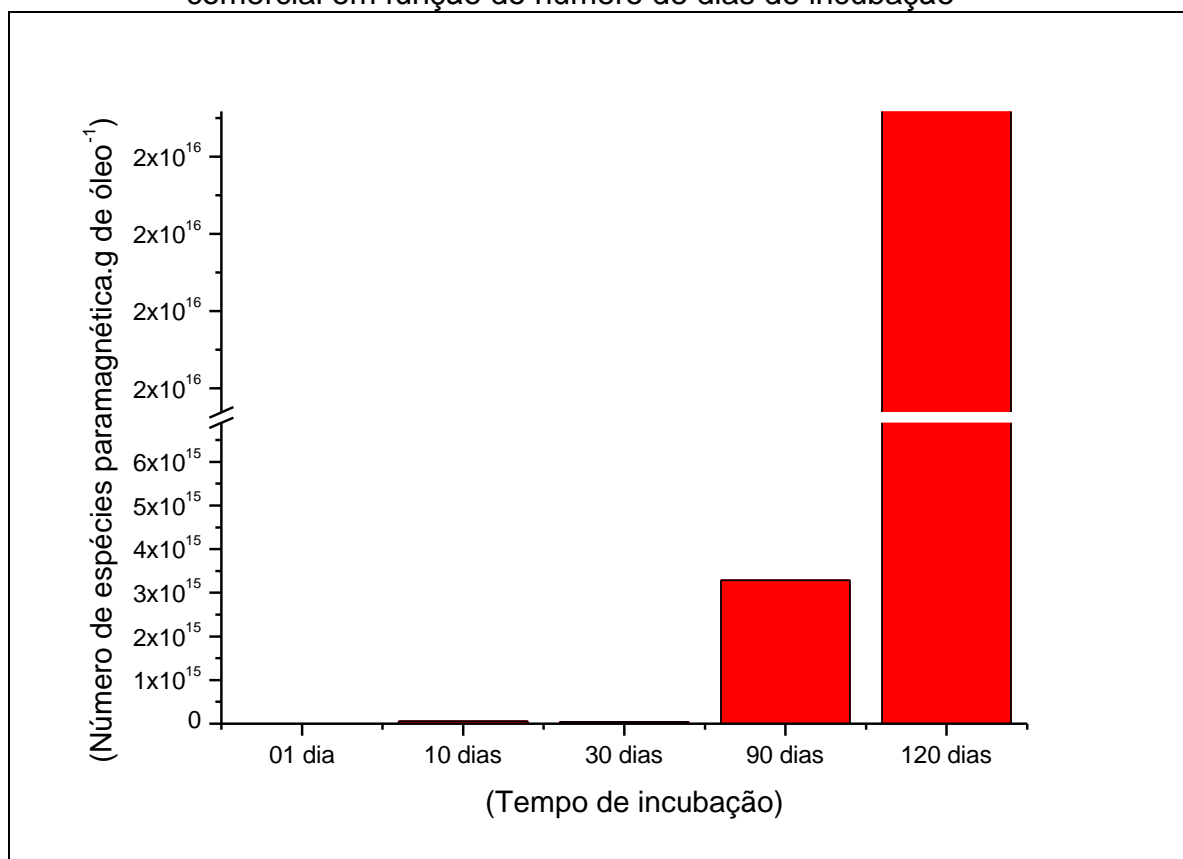
Fonte: o autor

Apesar de toda mudança na intensidade do sinal, o fator espectroscópico g permanece o mesmo, com valor de $2,006 \pm 0,001$. O salto na

intensidade do sinal pode ser verificado mais facilmente através da quantificação das espécies capturadas, apresentada na Figura 12.

Verifica-se no óleo de soja comercial uma baixa concentração de radicais livres, principalmente no período inicial de 90 dias. Esta ocorrência deve estar relacionada ao fato desse óleo possuir em sua composição inicial o agente quelante/sequestrante ácido cítrico (RAMALHO; JORGE, 2006), que também é um agente desativador de íons de metais que são catalisadores da reação de oxidação (PINTAURO, 1974). Acredita-se que ele esteja contribuindo para a não proliferação de radicais livres. Após este período pode-se supor que a ação do antioxidante fica comprometida, dessa maneira o número de radicais capturados cresce substancialmente.

Figura 12 – Concentração do número de radicais livres no óleo de soja comercial em função do número de dias de incubação



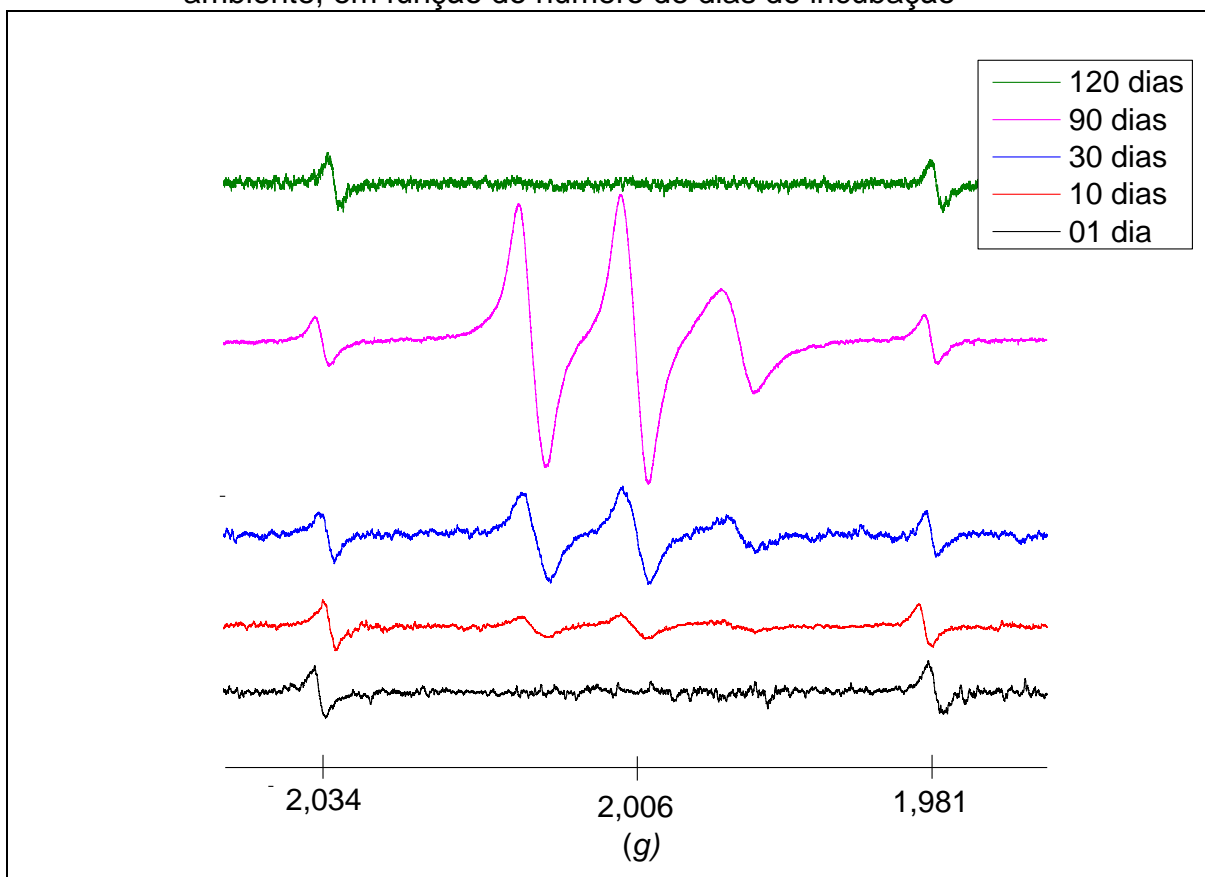
Fonte: o autor

4.4 RPE DO ÓLEO DE SOJA SEM ANTIOXIDANTES (SA)

O óleo de soja refinado não comercial, não possui antioxidantes industriais e o seu processo de análise foi semelhante ao do óleo de soja comercial e ao do azeite de oliva.

Após o óleo estar incubado, alíquotas foram analisadas nos tempos de 01 dia, 10 dias, 30 dias, 90 dias e 120 dias. Estas análises ocorreram em temperatura ambiente. A figura 13 representa a evolução dos espectros neste período.

Figura 13 – Espectros de RPE do óleo de soja não comercial, em temperatura ambiente, em função do número de dias de incubação



Fonte: o autor

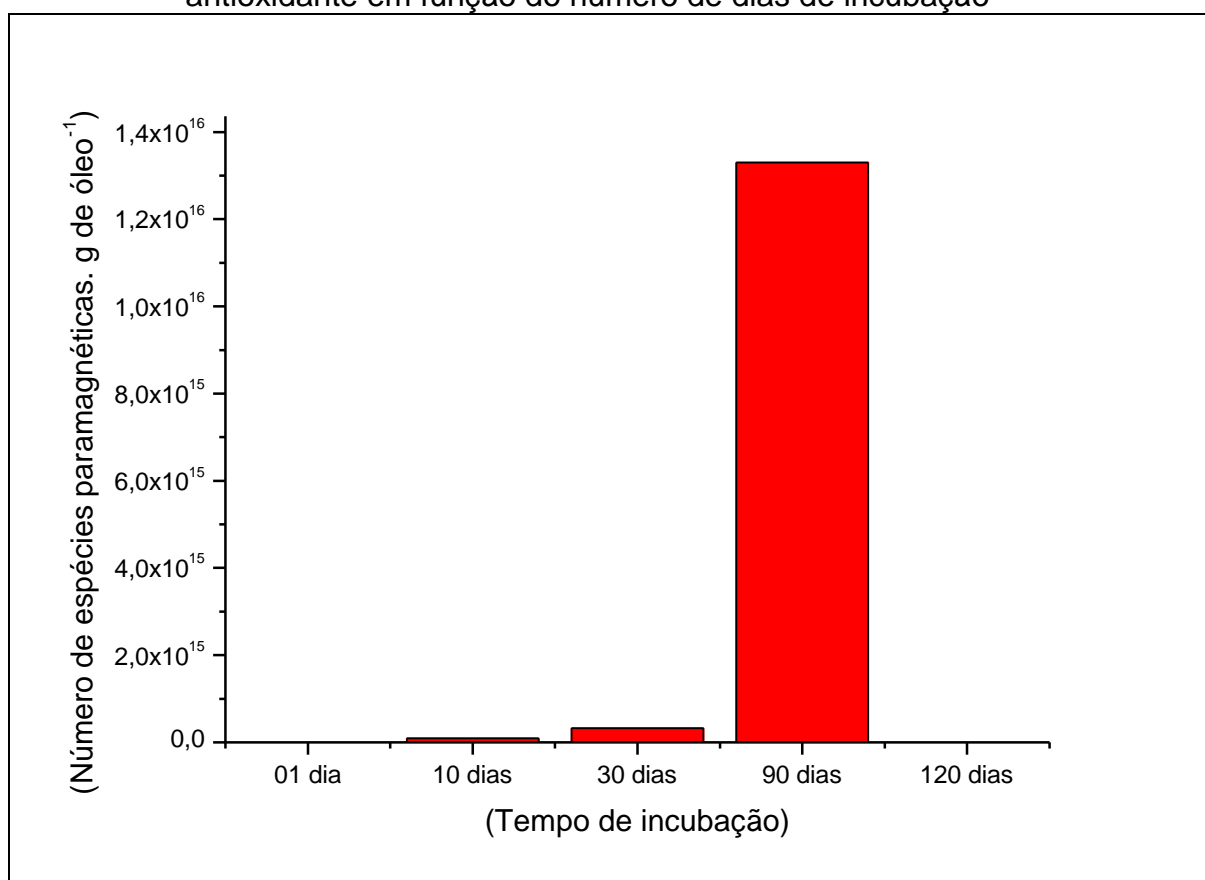
Analisando a Figura 13, verifica-se que aos 10 dias de incubação é possível identificar sinais de ressonância, indicando a presença de radicais livres aprisionados pelo PBN neste período. Este sinal possui uma pequena intensidade, tal como no óleo de soja comercial. A partir do trigésimo dia, a intensidade começa a crescer, e com 90 dias de incubação a intensidade do sinal torna-se máxima para

este tipo de óleo. Entretanto aos 120 dias de incubação não existe mais sinais de ressonância paramagnética, refletindo a ausência de radicais livres.

A explicação da ausência de espécies paramagnéticas aos 120 dias e consequentemente da falta de sinal de ressonância é a possibilidade de ter ocorrido a aceleração do processo de oxidação do óleo (PINTAURO, 1974). Além disso, acredita-se que essas espécies capturadas, podem ter reagido entre si, formando moléculas de momento magnético igual a zero, resultando na ausência de sinais de ressonância (GERSON; HUBER, 2003).

Na Figura 14, pode-se verificar o comportamento de crescimento do número de radicais capturados pelas moléculas de PBN. É interessante notar que a formação de uma grande quantidade de radicais livres ocorre mais rapidamente no óleo de soja sem antioxidante, principalmente após o período de 30 dias de incubação, levando-se à hipótese de que a partir deste tempo o processo de auto-oxidação tenha se acelerado.

Figura 14 – Concentração do número de radicais livres no óleo de soja sem antioxidante em função do número de dias de incubação

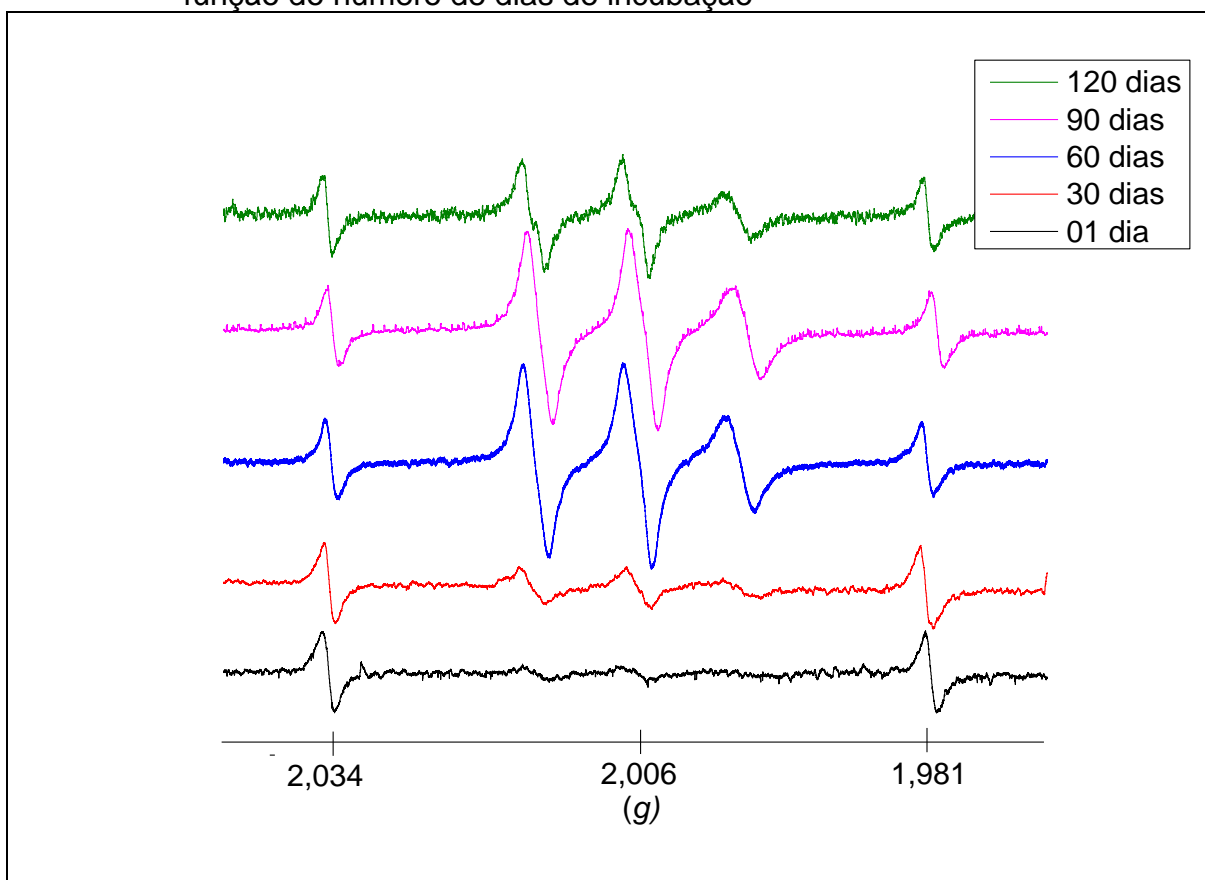


Fonte: o autor

4.5 RPE DO ÓLEO DE LINHAÇA (OL)

Quanto ao óleo de linhaça, após ser incubado e ter suas alíquotas analisadas por RPE em temperatura ambiente nos tempos de 01 dia, 30 dias, 60 dias, 90 dias e 120 dias, apresentou a evolução dos espectros conforme a representação da Figura 15.

Figura 15 – Espectros de RPE do óleo de linhaça (OL), em temperatura ambiente em função do número de dias de incubação

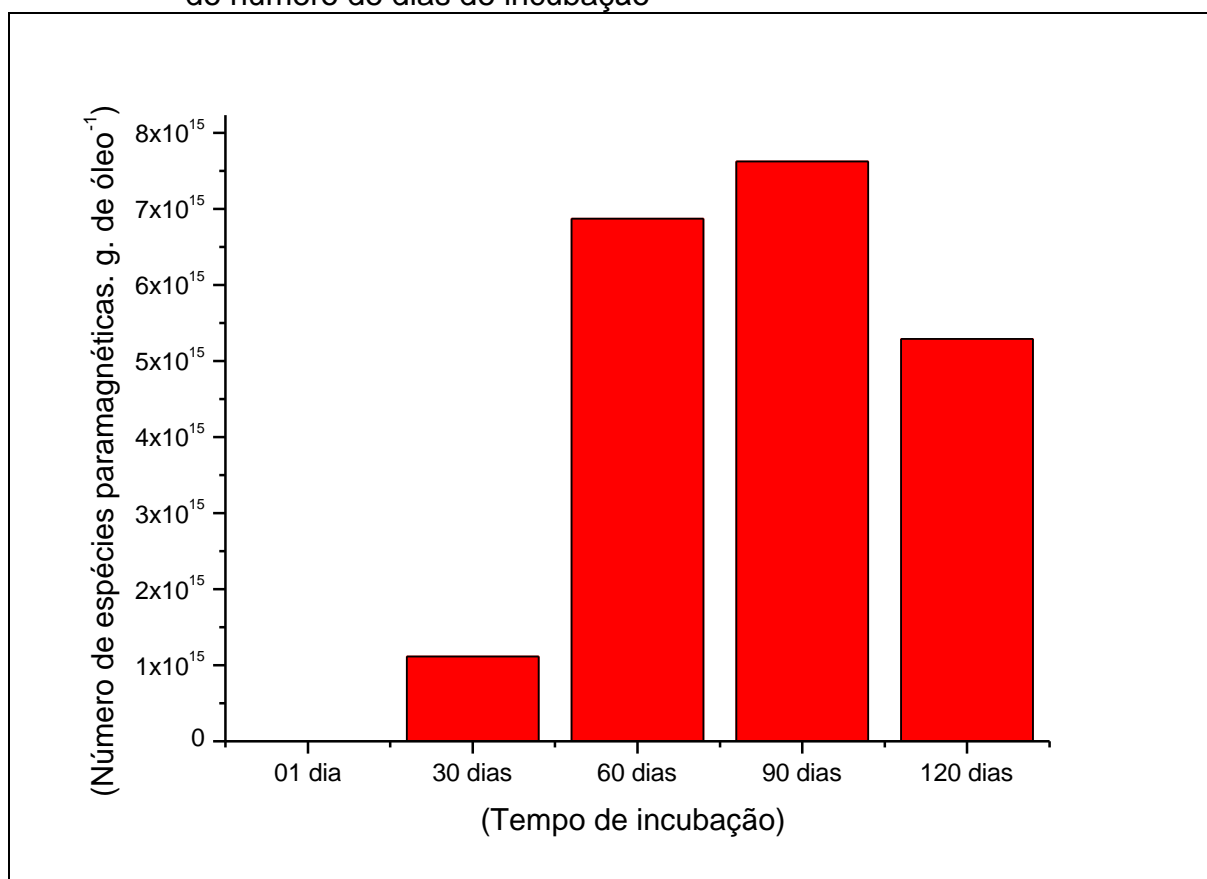


Fonte: o autor

Observou-se que com um dia de incubação não é possível, ainda, encontrar sinais claros de ressonância. Já ao se analisar a Figura 15, no tempo de 30 dias, percebe-se uma pequena alteração no espectro de RPE, resultado da concentração de radicais aprisionados pelo PBN. Portanto, com o aumento do tempo de incubação, verificou-se o aumento da intensidade do sinal, atingindo aos 90 dias a maior intensidade. A partir desta data constatou-se novamente o decréscimo da amplitude do sinal.

A Figura 16 representa a quantidade de espécies capturadas entre 01 e 120 dias. Foi acrescentado aqui, para o óleo de linhaça, um tempo intermediário de 60 dias, e retirado o tempo de 10 dias. Isto ocorreu, pois, verificou-se que até este período não houve alteração substancial do espectro obtido. Nota-se ainda que a concentração de radicais aumenta até os 90 dias de incubação e que a partir dos 120 dias de incubação a quantidade de radicais encontrados começa a decrescer, realçando a ideia de que as moléculas do PBN adulto estão se acoplando, ou seja, formando espécies estáveis, diminuindo a quantidade de espécies encontradas e, conseqüentemente, a amplitude.

Figura 16 – Concentração do número de radicais livres no óleo de linhaça, em função do número de dias de incubação



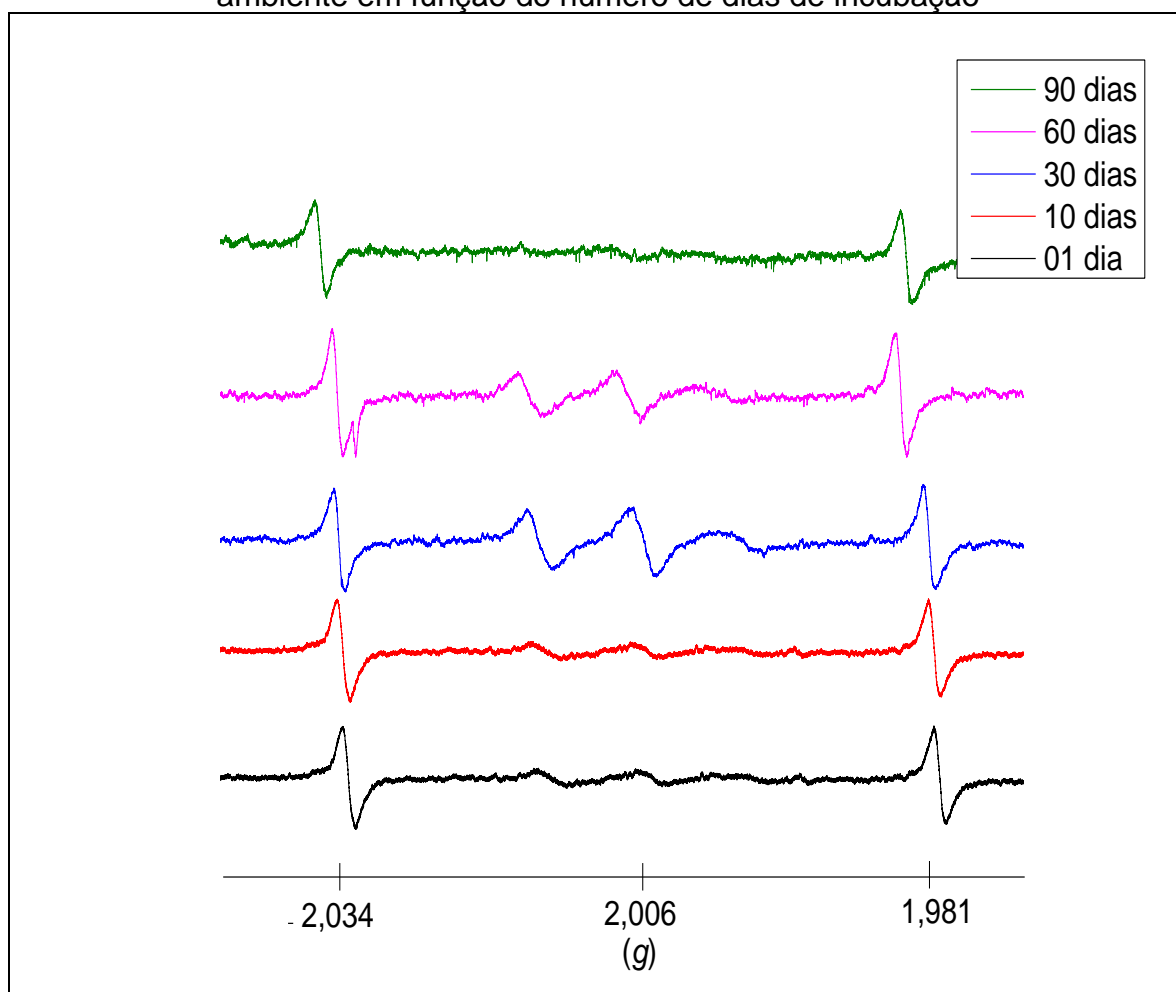
Fonte: o autor

4.6 RPE DO ÓLEO DE SEMENTE DE UVA (OU)

Após ser acrescentado o spin trap PBN ao óleo de semente de uva, alíquotas foram retiradas nos tempos de 01 dia, 10 dias, 30 dias, 60 dias e 90 dias. Estas análises ocorreram em temperatura ambiente e a Figura 17 representa a

evolução dos espectros neste período. O óleo de semente de uva no primeiro dia de incubação apresentou pequenos sinais de ressonância e alcançou sua intensidade máxima já aos 30 dias de contato com o PBN. Entretanto os sinais encontrados são de intensidades menores, sugerindo que o óleo de semente de uva é menos suscetível à produção de radicais livres.

Figura 17 – Espectros de RPE do óleo de semente de uva (OU), em temperatura ambiente em função do número de dias de incubação

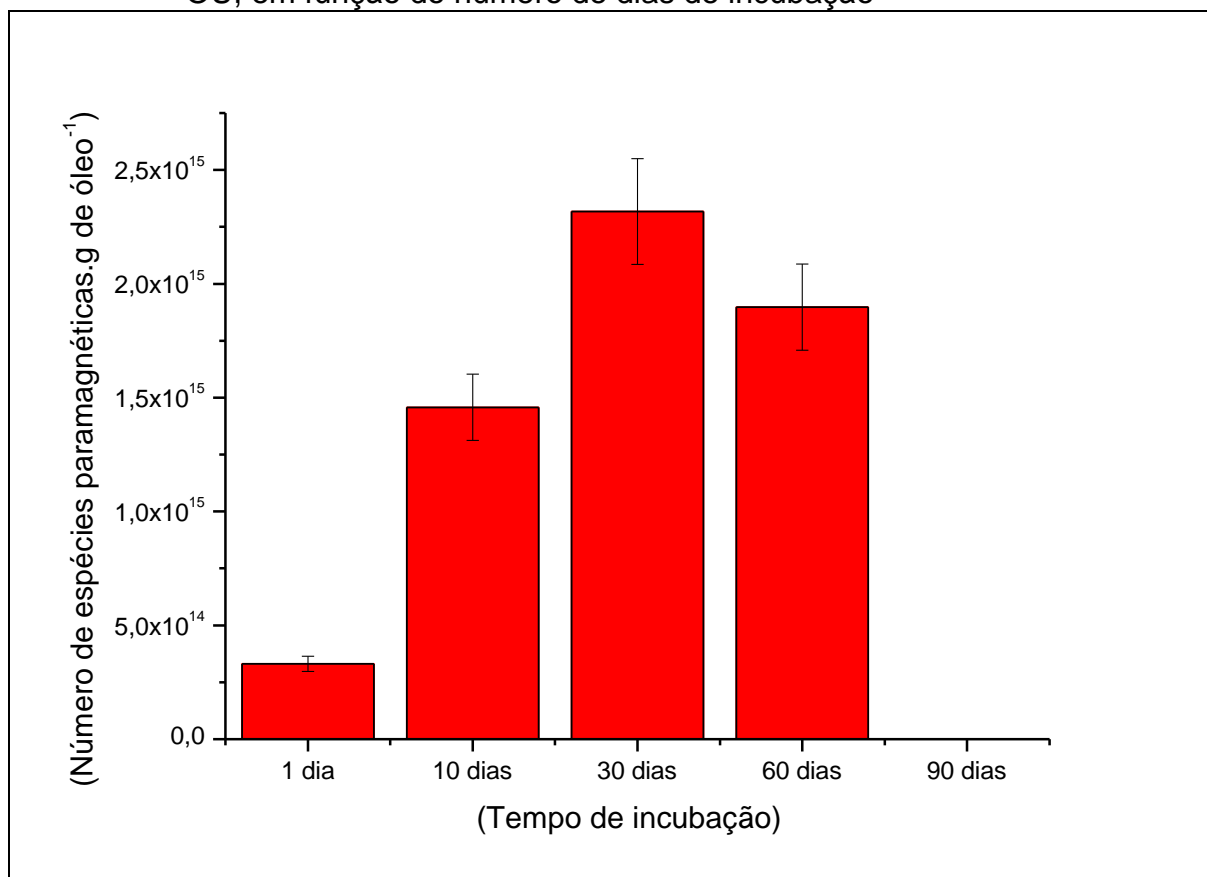


Fonte: o autor

No óleo de semente de uva, após se obter um sinal intenso de quantidade mensurável aos 30 dias de incubação, houve a redução do sinal detectado até o total desaparecimento do mesmo aos 90 dias de incubação. Como a intensidade do sinal do óleo de semente de uva foi menor, comparado com os demais óleos, pode-se inferir que ainda existam moléculas de PBN disponíveis para capturar mais radicais livres, ou seja, o processo de geração desses radicais pode ter diminuído ou cessado. Assim, para que possa ter ocorrido a queda da intensidade do

sinal, provavelmente ocorreu o acoplamento entre os radicais formados. Dessa maneira pode-se inferir que o óleo de semente de uva é o que produz menos radicais livres conforme a Figura 18.

Figura 18 – Concentração do número de radicais livres no óleo de semente de uva OU, em função do número de dias de incubação



Fonte: o autor

4.7 ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE OS ÓLEOS

A tabela 6 apresenta uma comparação entre o número máximo de radicais capturados, a constante de acoplamento hiperfina A_N (G) e o valor do fator espectroscópico g , além de apresentar as características principais de cada óleo.

Tabela 6 – Comparação entre as características dos óleos e a produção de radicais livres

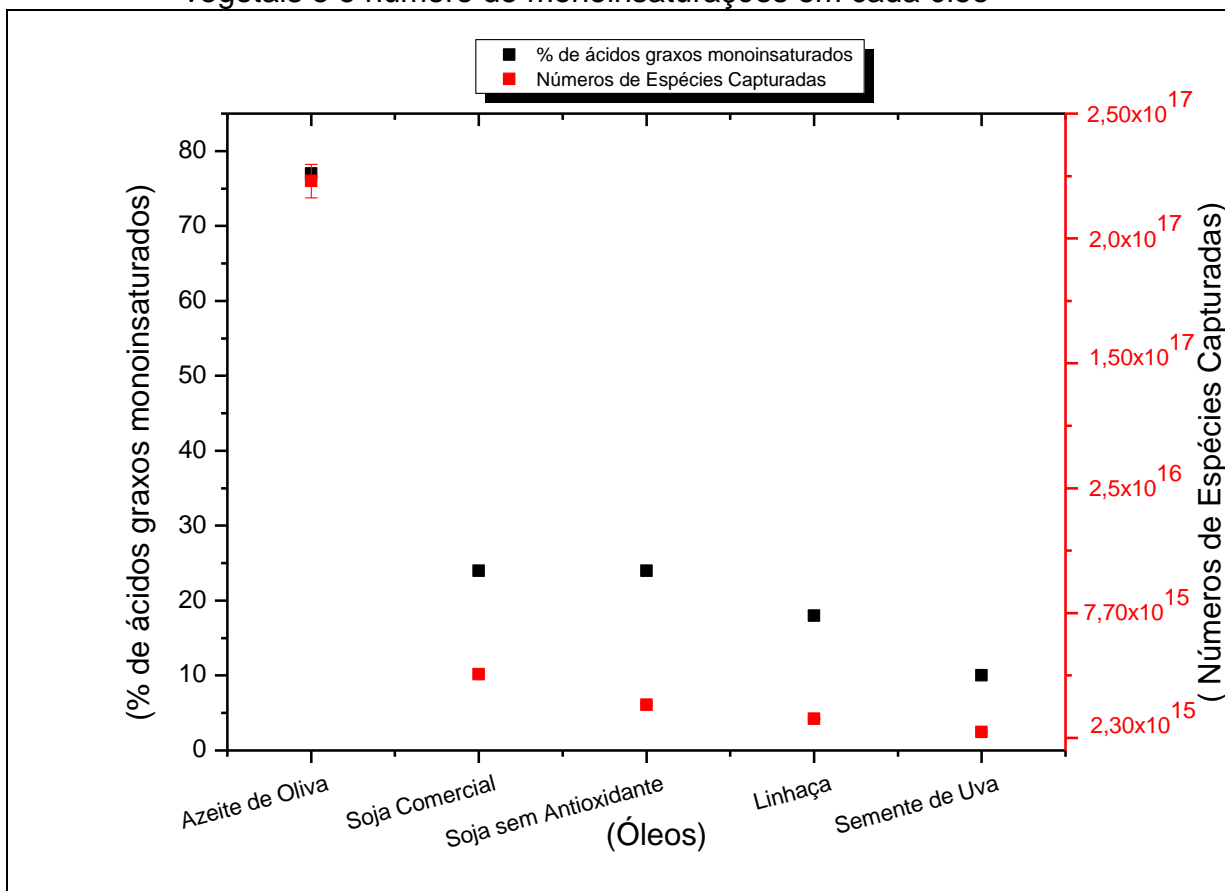
Óleo	Ácido graxo		Período de incubação (dias)	Nº Radicais capturados	$A_N(G)$	g
	Principal	mono (%) poli(%)				
AO	C18:1 Oléico	77 11	90	2,23(±0,03)E+17	14,7(±0,3)	2,006(±0,001)
SC	C18:2 Linoléico	24 61	120	2,55(±0,03)E+16	14,8(±0,3)	2,006(±0,001)
SA	C18:2 Linoléico	24 61	90	1,33(±0,03)E+16	14,8(±0,3)	2,006(±0,001)
OL	C18:3 ω 3 Linolênico	18 73	90	7,61(±0,03)E+15	14,7(±0,3)	2,006(±0,001)
OU	C18:2 Linoléico	10 59	30	2,32(±0,03)E+15	15,1(±0,3)	2,006(±0,001)

Fonte: o autor e adaptado de Rockenbach et al., (2010)

Segundo a Tabela 6, os óleos estudados apresentam, principalmente em relação às formas de linhas e larguras de linhas, características muito semelhantes. Além disso, as constantes de acoplamento hiperfina dos óleos mostraram valores muito próximos, o que evidencia a possibilidade do radical capturado ser o mesmo em todos os óleos.

Em temperatura ambiente, não foi possível detectar o desdobramento hiperfino esperado em nenhum dos óleos, devido à estrutura do PBN, e isto ocorreu independentemente do número de dias de incubação. Entretanto verificou-se que o aumento na quantidade de radicais capturados altera de maneira significativa a intensidade do sinal de RPE. Além disso, outro dado relevante foi o fator espectroscópico g se manter constante entre os óleos, revelando a possibilidade de que os radicais aprisionados pelo spin trap nos diversos óleos estudados seja o mesmo. Outra conclusão importante é a relação direta entre quantidade de ácidos graxos monoinsaturados e a quantidade de radicais livres gerados, conforme mostra a Figura 19. É possível verificar nos óleos analisados, que conforme ocorre o aumento no número de monoinsaturações, encontra-se também o maior número de espécies paramagnéticas. O azeite de oliva, por exemplo, possui o maior número de monoinsaturações entre os óleos estudados, sendo assim, este óleo é aquele que apresenta o maior de número de radicais livres capturados.

Figura 19 – Relação entre a quantidade máxima de radicais gerados em óleos vegetais e o número de monoinsaturações em cada óleo



Fonte: o autor

4.8 ANÁLISES COM VARIAÇÃO DA TEMPERATURA

4.8.1 Espectros de RPE

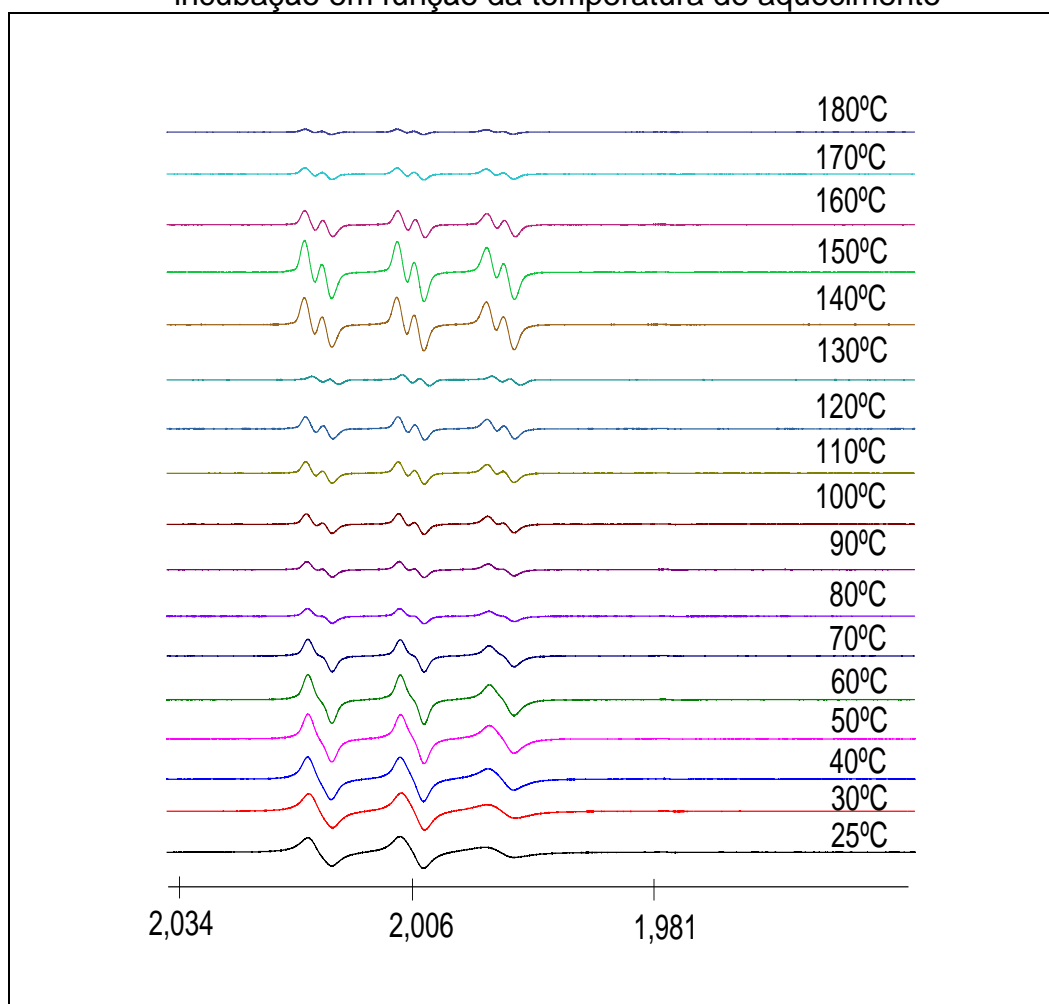
Após serem realizadas as análises das amostras de óleos em temperatura ambiente, as mesmas foram submetidas a uma variação de temperatura, a fim de se analisar a influência que a temperatura exerce na geração dos radicais livres e sobre o meio reacional. Todas as amostras dos óleos foram submetidas à variação de temperatura, nos mesmos dias nos quais houve as análises em temperatura ambiente. Pretendeu-se assim, verificar o comportamento de cada óleo quando submetido ao aumento da temperatura.

Em testes anteriores, cujos resultados não são apresentados neste trabalho, verificou-se que após os 180°C os sinais detectáveis de ressonância eram mínimos. Deste modo, as leituras ocorrem somente até esta temperatura.

4.8.2 RPE do Azeite de Oliva Extravirgem (AO)

A Figura 20 apresenta a evolução dos sinais de RPE encontrados para o azeite de oliva com 90 dias de incubação. Este tempo de incubação foi escolhido para análise, por ter-se obtido a maior quantidade de radicais livres dentre todo o período de incubação analisado neste óleo, em temperatura ambiente. Vale ressaltar que todos os espectros estão normalizados pelo marcador de campo MgO:Mn^{2+} . Nesta figura, aparece a evolução das formas e das larguras das linhas em função da temperatura de aquecimento. Pode-se verificar que mesmo sob a influência da temperatura, o conjunto de três linhas, referentes à interação do radical aprisionado pelo PBN e o átomo de nitrogênio, permanece até os 70°C . Ricca et al., (2012) trabalhando com óleo de oliva extravirgem à temperatura de 60°C encontraram apenas três linhas de ressonância. Este fato ocorreu também com Papadimitriou et al., (2006) mesmo mantendo o óleo aquecido a 70°C por mais de seis horas. Desse modo, pode-se inferir, que até a temperatura de 70°C não ocorrem mudanças significativas no meio reacional que propiciem condições para alterações na forma de linha. A partir desta temperatura, a forma de linha começa a ser alteradas e que ao alcançar a temperatura de 90°C , é possível perceber o início do segundo desdobramento hiperfino referente à interação entre o radical capturado e a estrutura do PBN, deduz-se então, que o meio reacional começa a ser modificado.

Figura 20 – Espectros de RPE do azeite de oliva extravirgem, com 90 dias de incubação em função da temperatura de aquecimento

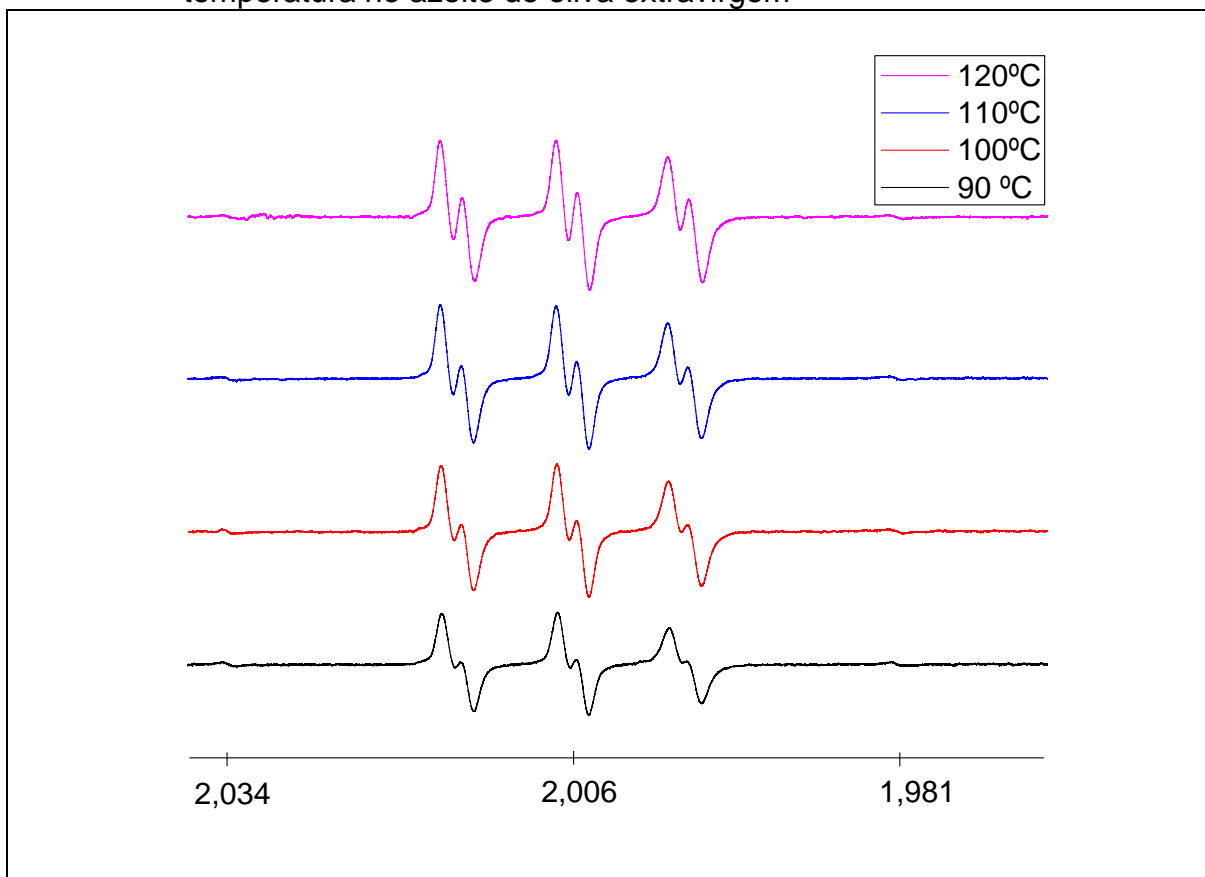


Fonte: o autor

A Figura 21 é uma visão ampliada da faixa de temperatura na qual ocorrem as primeiras alterações na forma de linha no azeite de oliva extravirgem, cujo desdobramento referente à interação entre o radical aprisionado e a molécula do PBN é encontrado. Vale ressaltar que este conjunto de um triplete com um dublete é resultado da interação entre o spin do elétron $S=1/2$ com o núcleo do átomo de nitrogênio $I_N = 1$ e o núcleo do átomo hidrogênio $I_H = 1/2$, respectivamente.

A visualização deste conjunto de seis linhas de RPE só foi possível em virtude da mudança do meio reacional, cujo comportamento apresentado passou de um comportamento rápido para um regime isotrópico em virtude do aumento da temperatura. Deste modo, pode-se constatar que a temperatura altera o movimento molecular.

Figura 21 – Desdobramento hiperfino encontrado em função do aumento da temperatura no azeite de oliva extravirgem



Fonte: o autor

Esse processo de desdobramento continua e conforme ocorre o aumento da temperatura, a partir dos 110°C é possível encontrar os três conjuntos de duas linhas e aos 120°C, nota-se uma maior intensidade nas linhas. Vale ressaltar que este desdobramento surge, em função das alterações na viscosidade do azeite, e que uma vez ocorrido o desdobramento, este permanece até o final da análise (180°C).

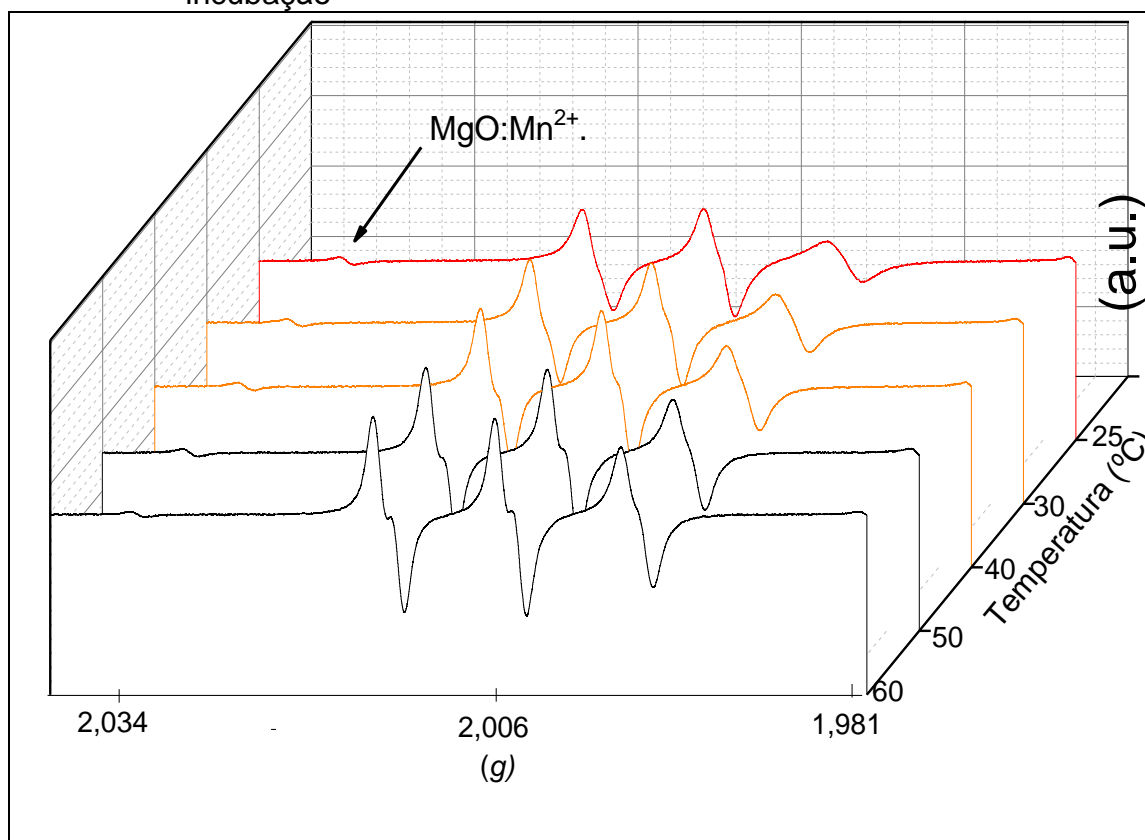
4.8.3 RPE do Óleo de Soja Comercial (SC)

As Figuras 22, 23 e 24, representam as evoluções dos espectros de EPR do óleo de soja comercial com 120 dias de incubação e sob a influência da temperatura. Três faixas de aquecimento serão apresentadas para se obter uma melhor visão da evolução dos sinais. Os espectros foram todos normalizados pelo marcador de campo MgO:Mn^{2+} .

Conforme já citado, o óleo de soja comercial possui em sua formulação a predominância do ácido graxo Linoléico e possui antioxidantes comerciais. No tempo de 120 dias de incubação detecta-se a maior concentração de radicais formados em temperatura ambiente. Por esse motivo escolheu-se esse tempo de incubação para analisar a influência do aumento da temperatura.

Com o aumento da temperatura, Figura 22, verificou-se o acréscimo na intensidade dos sinais, refletindo a possibilidade de que o aumento da temperatura acelere o processo de oxidação gerando radicais livres mais rapidamente. Além disso, sugere-se que existam ainda moléculas de PBN disponíveis para realizar a captura desses radicais formados. Pode-se afirmar isto, pois, caso não existissem tais moléculas disponíveis, a intensidade do sinal não aumentaria.

Figura 22 – Espectro do óleo de soja comercial submetido ao aumento da temperatura de 25°C a 60°C, para uma amostra com 120 dias de incubação

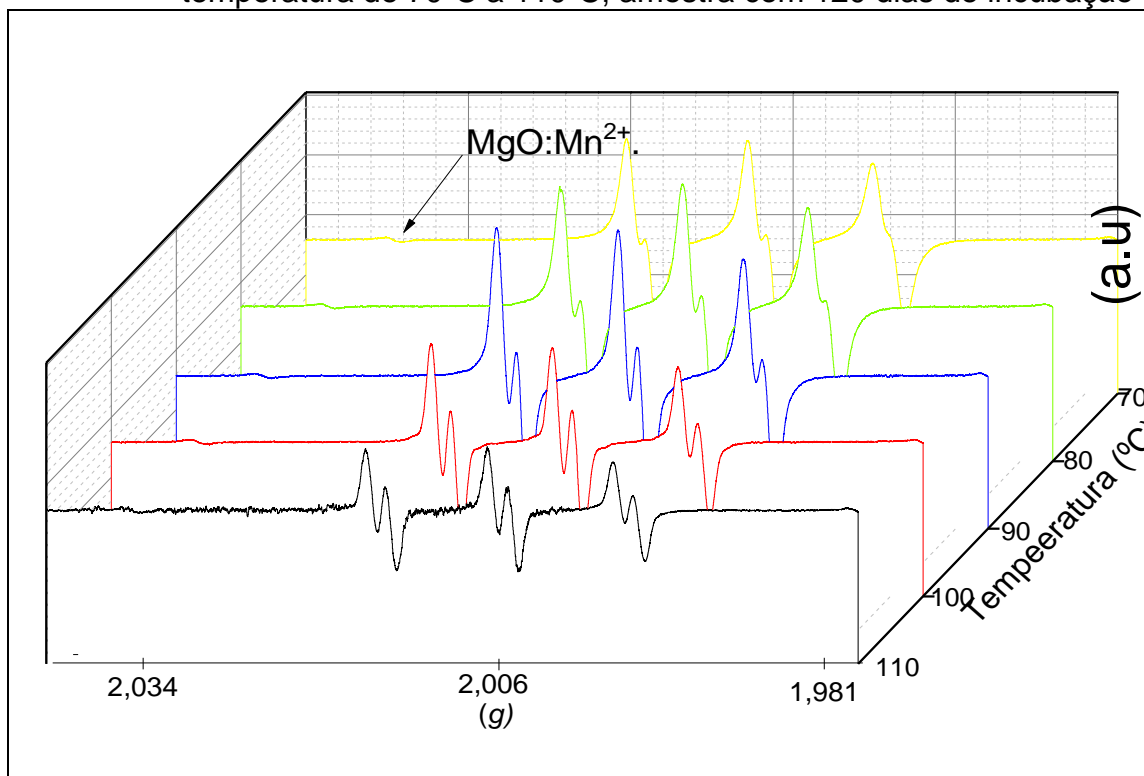


Fonte: o autor

Na Figura 23, a partir da temperatura de 90°C pode-se notar de maneira mais clara seis linhas de ressonância. Assim, é possível verificar o início do segundo desdobramento hiperfino, ou seja, a interação entre o radical capturado e o

átomo de hidrogênio da molécula do PBN. Nesta análise constatou-se que esta interação só ocorreu pelo fato da viscosidade do meio ter sido alterada pelo aumento da temperatura.

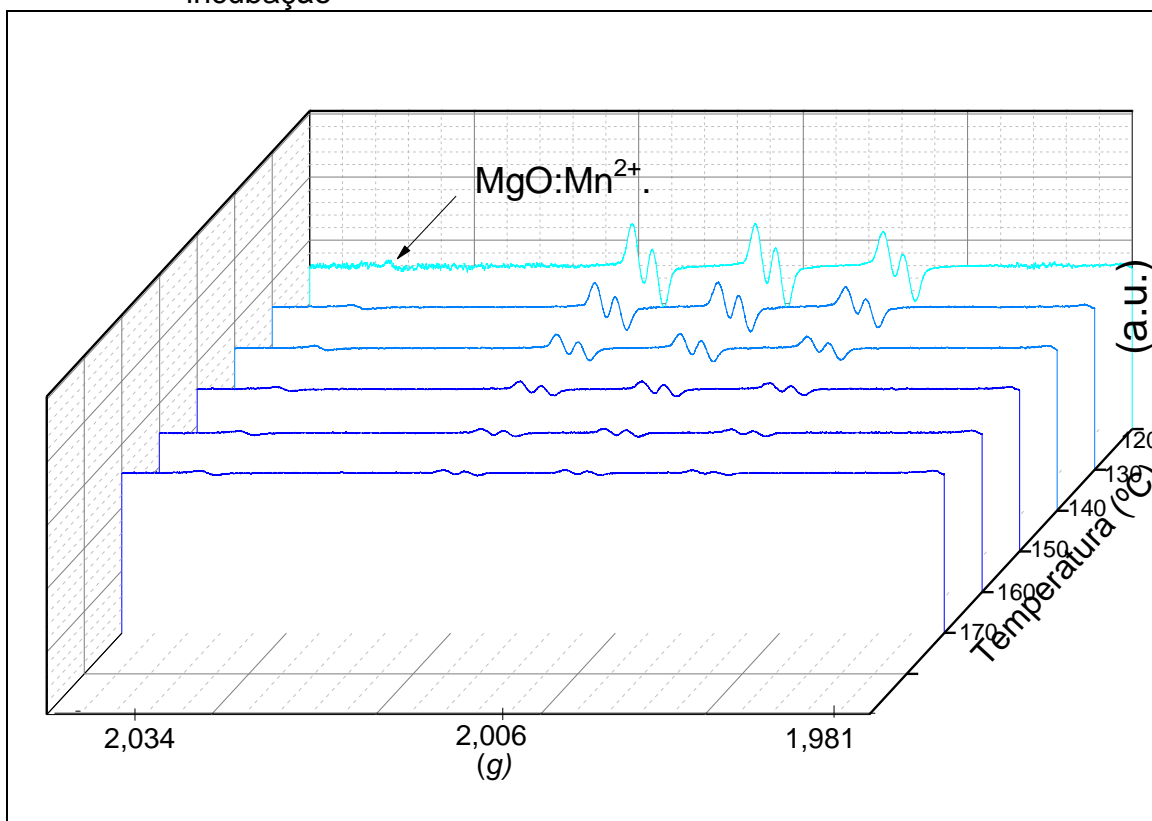
Figura 23 – Espectro do óleo de soja comercial submetido ao aumento da temperatura de 70°C a 110°C, amostra com 120 dias de incubação



Fonte: o autor

Interessante notar na Figura 24, que, a partir da temperatura de 120°C começa ocorrer a queda da intensidade do sinal. Não se pode afirmar que a partir desta temperatura não esteja ocorrendo mais a formação de radicais livres, entretanto, supõe-se que devido ao aumento da temperatura comece a diminuir a razão populacional entre os níveis energéticos conforme equação 10.

Figura 24 – Espectro do óleo de soja comercial submetido ao aumento da temperatura de 120°C a 170°C, para uma amostra com 120 dias de incubação



Fonte: o autor

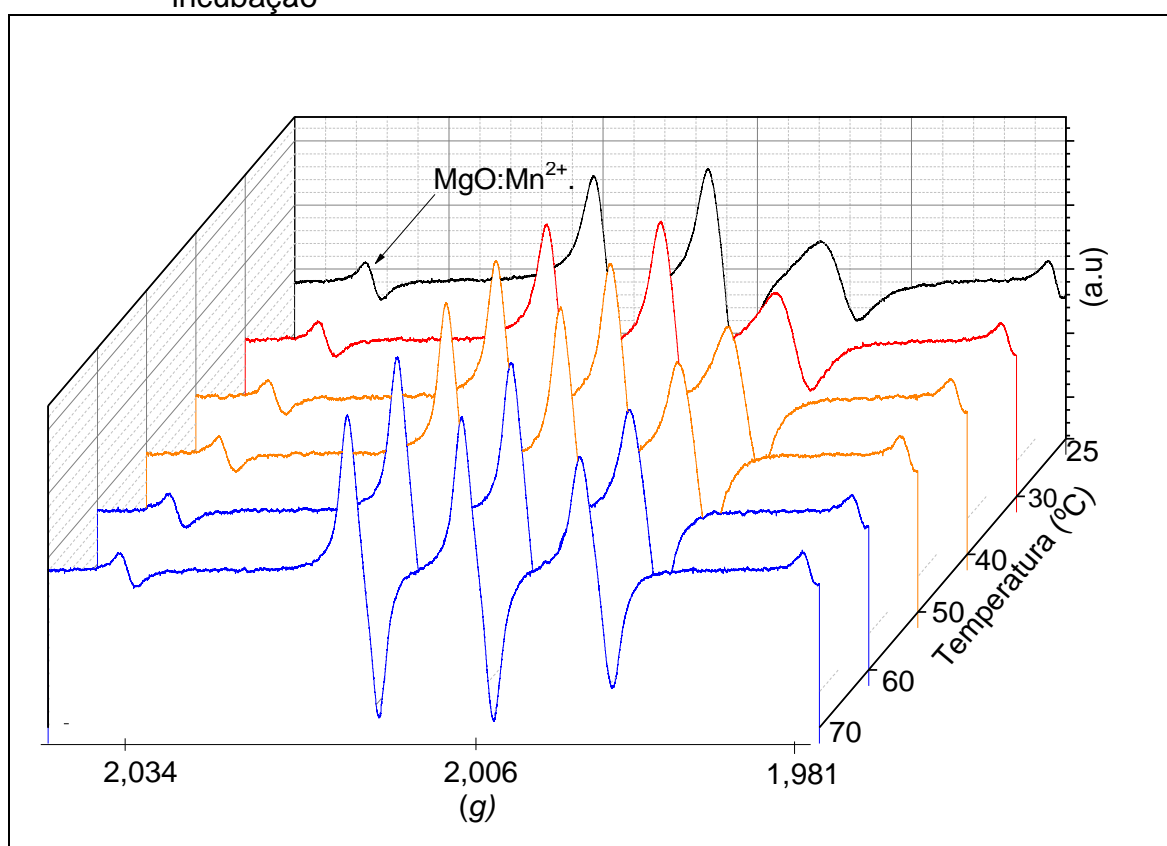
Deste modo, elevando-se a temperatura, esperava-se encontrar um alargamento da linha de ressonância. Entretanto, este fato não ocorreu e mesmo aos 170°C ainda é possível verificar o conjunto de dois tripletos. Como a razão populacional depende exponencialmente da temperatura, (Equação 10), os efeitos da diminuição na intensidade dos sinais são verificados antes do alargamento das linhas.

4.8.4 RPE do Óleo de Soja Sem Antioxidante (SA)

A amostra de óleo de soja não comercial analisada estava com 90 dias de incubação. Escolheu-se esta amostra para análise, pois foi a que apresentou o maior número de radicais livres em temperatura ambiente. Este óleo possui predominante em sua estrutura o ácido graxo Linoléico (C18:2). Conforme já apresentado, esta amostra de óleo de soja refinado não possui antioxidantes em sua formulação. Além disso, todos os espectros estão normalizados pelo marcador de campo MgO:Mn^{2+} .

É possível notar através da Figura 25, que o número de radicais livres continua a crescer com o aumento da temperatura, pois a intensidade dos picos continua a aumentar. Apesar da grande intensidade dos sinais, ainda aos 70°C não se verifica o desdobramento em três conjuntos de duas linhas. Desta maneira, acredita-se que a visualização dessas seis linhas de ressonância não seja uma função do número de espécies capturadas pelo PBN, mas sim função de alterações no meio reacional, como por exemplo, mudança na viscosidade dos óleos.

Figura 25 – Espectro do óleo de soja sem antioxidante, com aumento da temperatura de 25°C a 70°C, para uma amostra com 90 dias de incubação

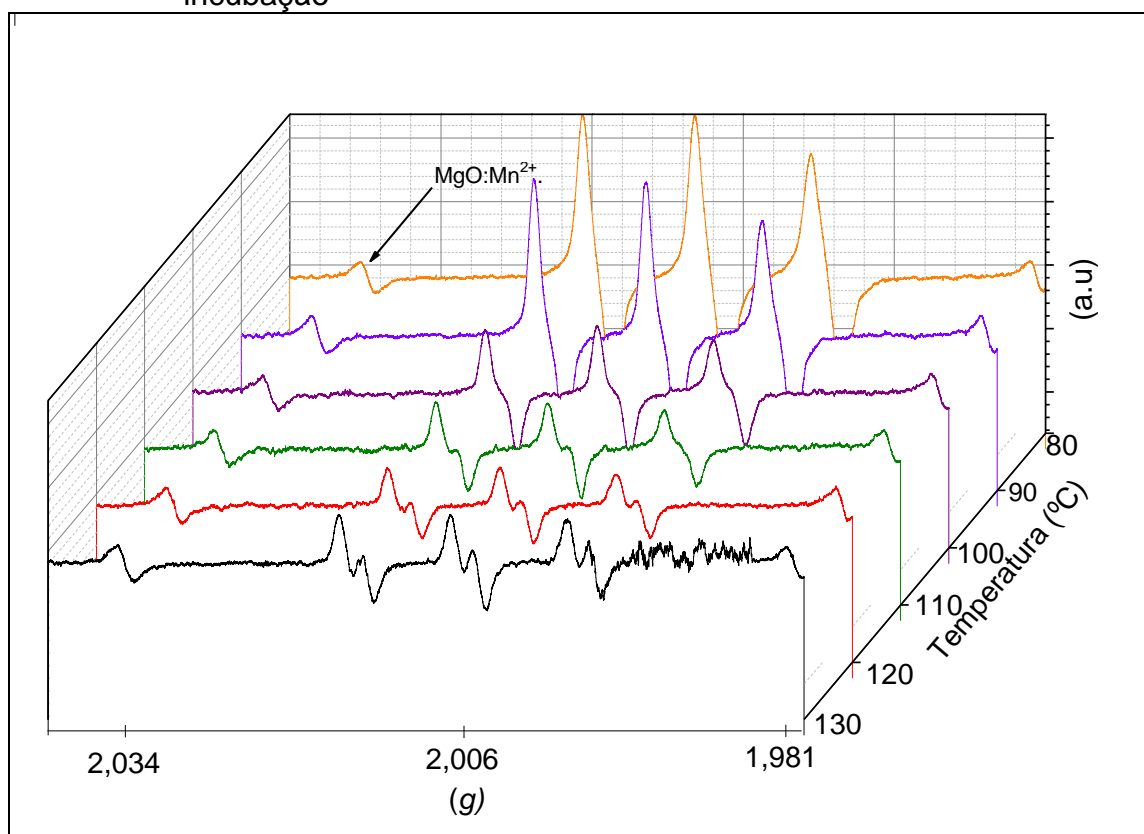


Fonte: o autor

A Figura 26 mostra a mudança na forma de linha. É possível perceber inicialmente, apenas o conjunto de três linhas referentes à interação do radical com o átomo de nitrogênio. Com o aumento da temperatura, observa-se seis linhas de ressonância, resultado da interação do radical com os átomos de nitrogênio e hidrogênio da molécula do PBN. O surgimento do sistema tripleto com dubleto, para o óleo de soja sem adição de antioxidantes acontece aos 120°C, sendo esta temperatura diferente da encontrada no óleo de soja comercial que possui

antioxidantes. Os motivos para esta diferença não são claros. Entretanto, o crescimento do número de radicais livres indicam uma maior oxidação e que as mudanças ocorridas no meio reacional, devido ao aumento da temperatura, influenciam a mobilidade molecular no meio (LAWSON, 1994).

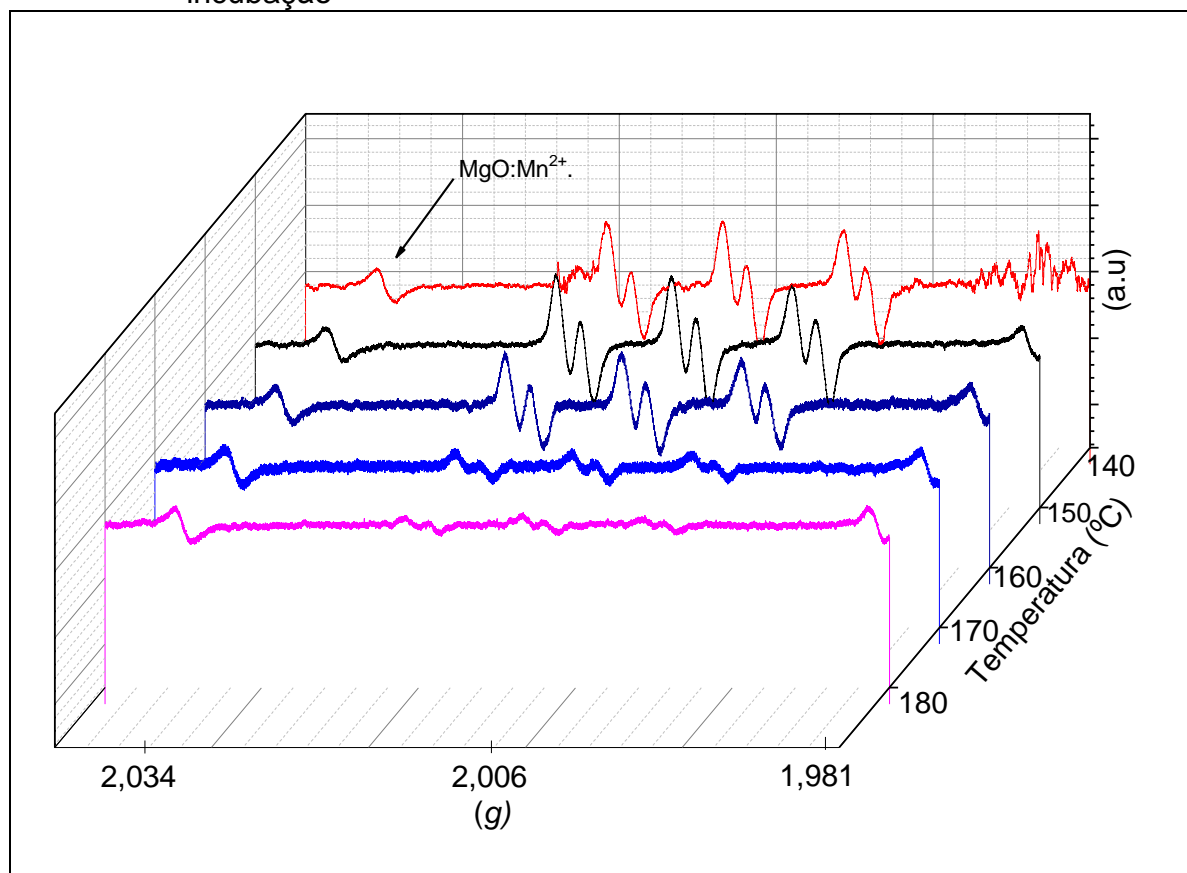
Figura 26 – Espectro do óleo de soja sem antioxidante, com aumento da temperatura de 80°C a 130°C, para uma amostra com 90 dias de incubação



Fonte: o autor

A Figura 27 mostra os espectros obtidos até 180°C para o óleo de soja não comercial. É possível verificar que mesmo nesta temperatura, ainda é observável a interação entre o radical e a molécula de PBN, de maneira que, caso ocorra o alargamento de linhas, isto deve ocorrer em temperaturas superiores aos analisados neste trabalho.

Figura 27 – Espectro do óleo de soja sem antioxidante, com aumento da temperatura de 140°C a 180°C, para uma amostra com 90 dias de incubação



Fonte: o autor

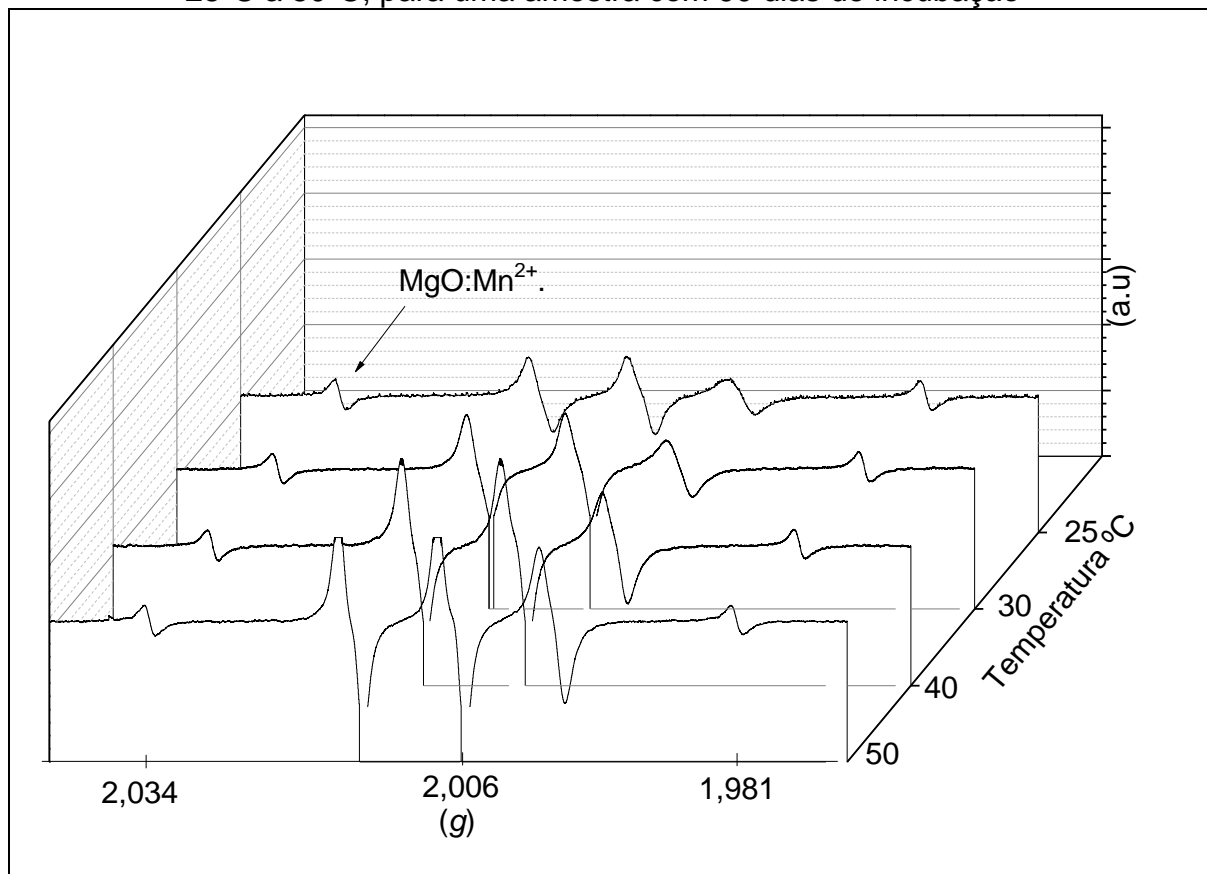
4.8.5 RPE do Óleo de Linhaça (OL)

O óleo de linhaça foi analisado com 90 dias de incubação, pois nesse tempo se encontrou o maior número de radicais livres. Este óleo possui em sua estrutura três duplas ligações (C18:3 ω 3 Linolênico) e esta formatação da cadeia carbônica pode facilitar o movimento molecular, pois, estas duplas ligações promovem uma dobra na cadeia hidrocarbonada. Ácidos graxos com uma ou várias dessas dobras não podem agrupar-se, portanto suas interações são mais fracas. Deste modo, é necessária uma quantidade menor de energia térmica para desordenar suas cadeias (DAVID; COX, 2011).

A Figura 28 apresenta a evolução das linhas de ressonância. Verifica-se que até os 50°C a intensidade dos sinais de ressonância aumentam, entretanto, ainda são encontrados apenas os sinais de desdobramento hiperfino referentes ao acoplamento entre o spin do radical livre e do átomo de nitrogênio da molécula do

PBN. Assim, percebe-se um comportamento semelhante entre os óleos estudados apresentados até aqui.

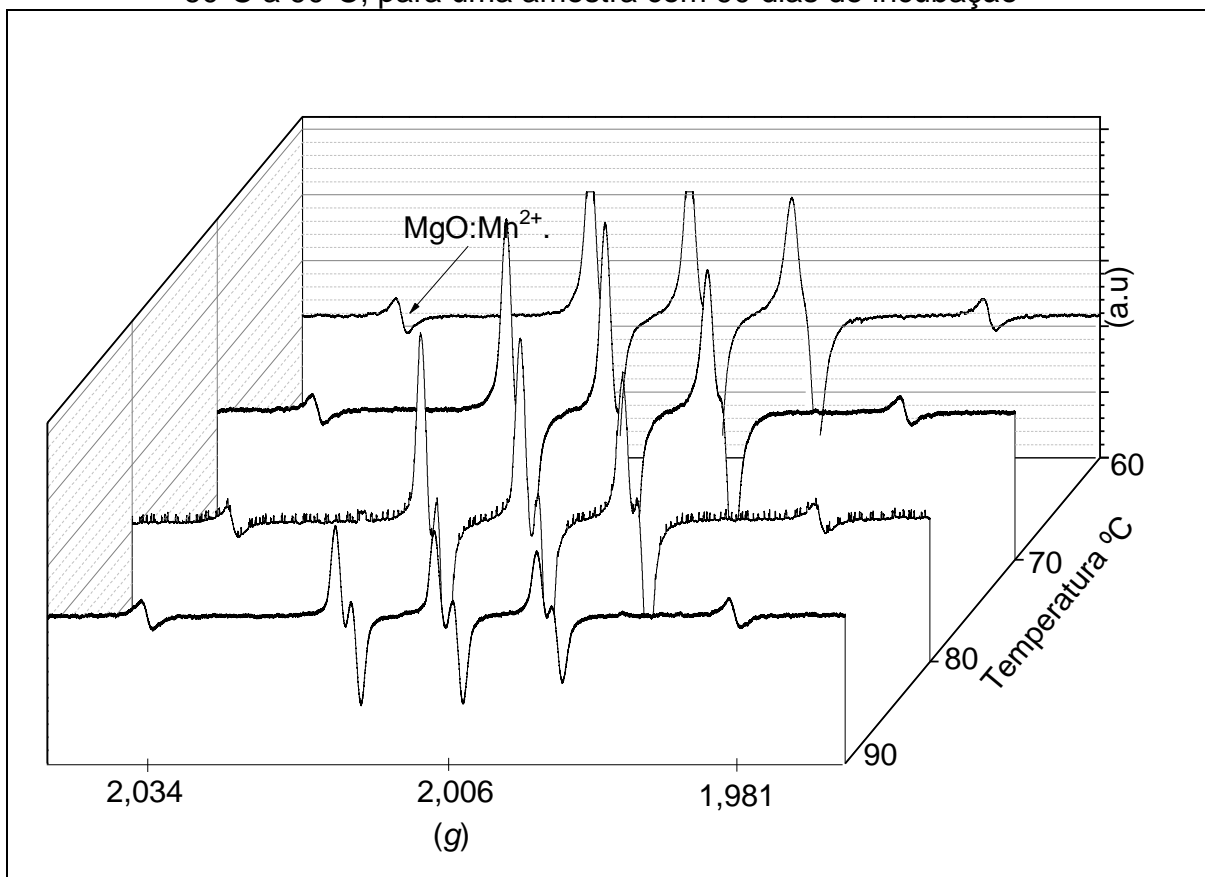
Figura 28 – Espectro do óleo de Linhaça submetido ao aumento da temperatura de 25°C a 50°C, para uma amostra com 90 dias de incubação



Fonte: o autor

Na Figura 29 verifica-se que a partir dos 80°C é possível começar identificar as seis linhas de ressonância referentes à interação do radical capturado com os núcleos de nitrogênio e hidrogênio, e aos 90°C, pode-se afirmar que ocorre um completo desacoplamento das linhas sobrepostas. Assim, o aumento da temperatura proporciona alterações no óleo de forma que é possível detectar as linhas de ressonância esperadas, ou seja, com esta alteração é possível visualizar o desacoplamento das linhas sobrepostas.

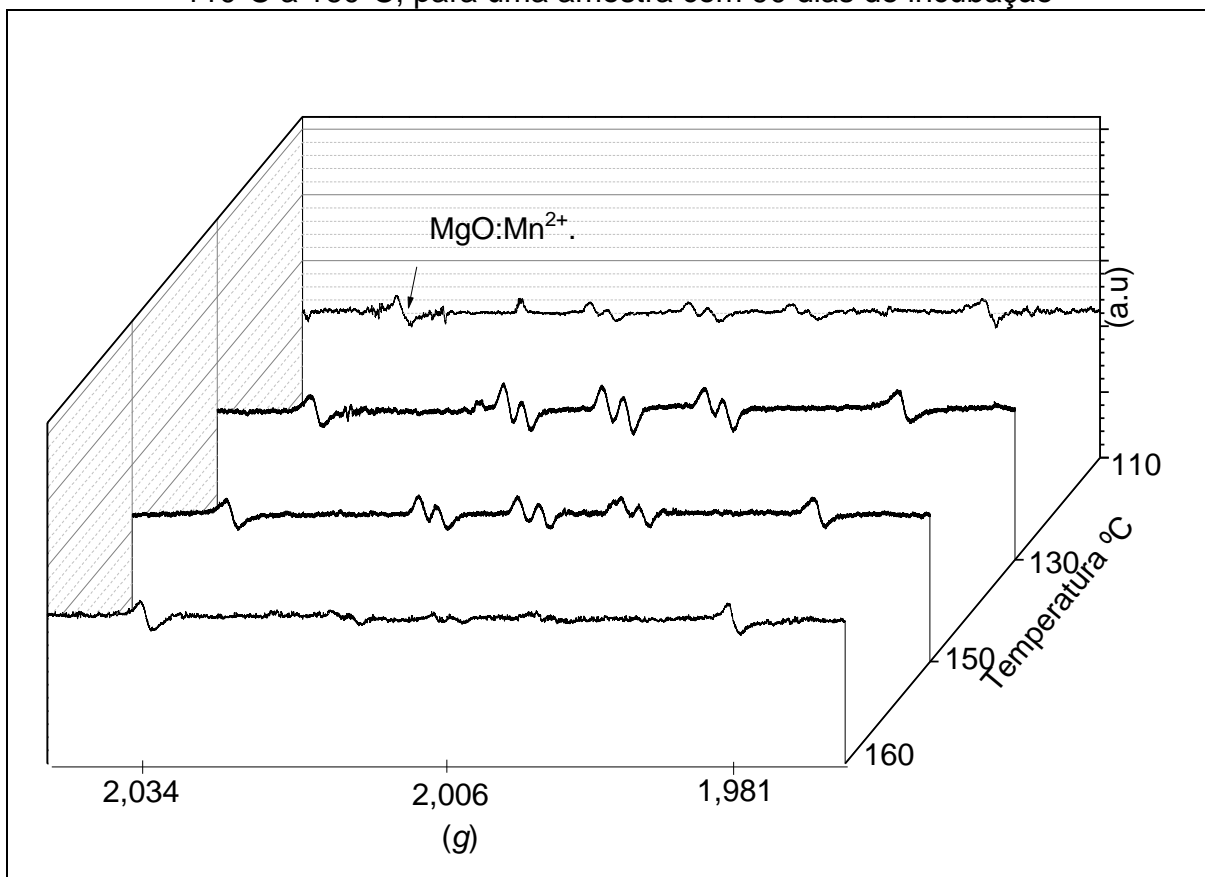
Figura 29 – Espectro do óleo de Linhaça submetido ao aumento da temperatura de 60°C a 90°C, para uma amostra com 90 dias de incubação



Fonte: o autor

Como em todos os outros óleos estudados, no óleo de linhaça não se pode afirmar que houve o alargamento das linhas. Também não se verifica sinais de ressonância a partir dos 160°C, como visto na Figura 30. Assim, é possível que a diferença de temperatura na qual não seja possível visualizar as linhas de ressonância, esteja relacionada com o número de radicais capturados pelo spin trap.

Figura 30 – Espectro do óleo de Linhaça submetido ao aumento da temperatura de 110°C a 160°C, para uma amostra com 90 dias de incubação



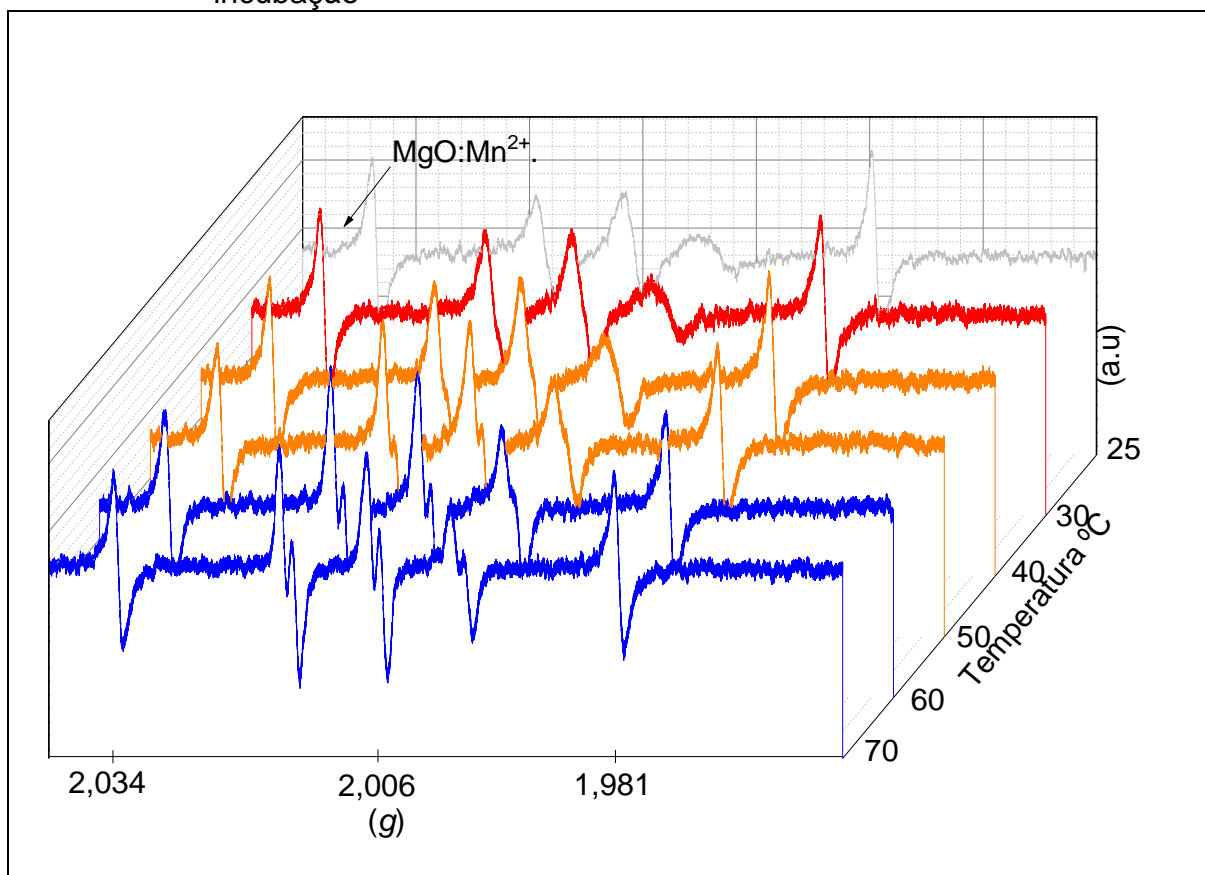
Fonte: o autor

4.8.6 RPE do Óleo de Semente de Uva (OU)

A Figura 31 apresenta os espectros do óleo de semente de uva. Quando submetida à variação de temperatura, com apenas 30 dias de incubação, o óleo de semente de uva apresentou maior número de radicais capturados. Por este motivo, este período de incubação foi escolhido para ser submetido ao aumento da temperatura. No óleo de semente de uva, verifica-se que aos 60°C dá-se o início da alteração das formas de linha, revelando assim, uma maior sensibilidade à mudança de temperatura. Provavelmente em função das características estruturais deste óleo, necessita-se de menos energia para que o meio reacional seja alterado.

Aos 70°C já é possível encontrar as seis linhas de ressonância, porém a intensidade do sinal é baixa, devido ao baixo número de radicais capturados e estabilizados quando comparado aos outros óleos estudados.

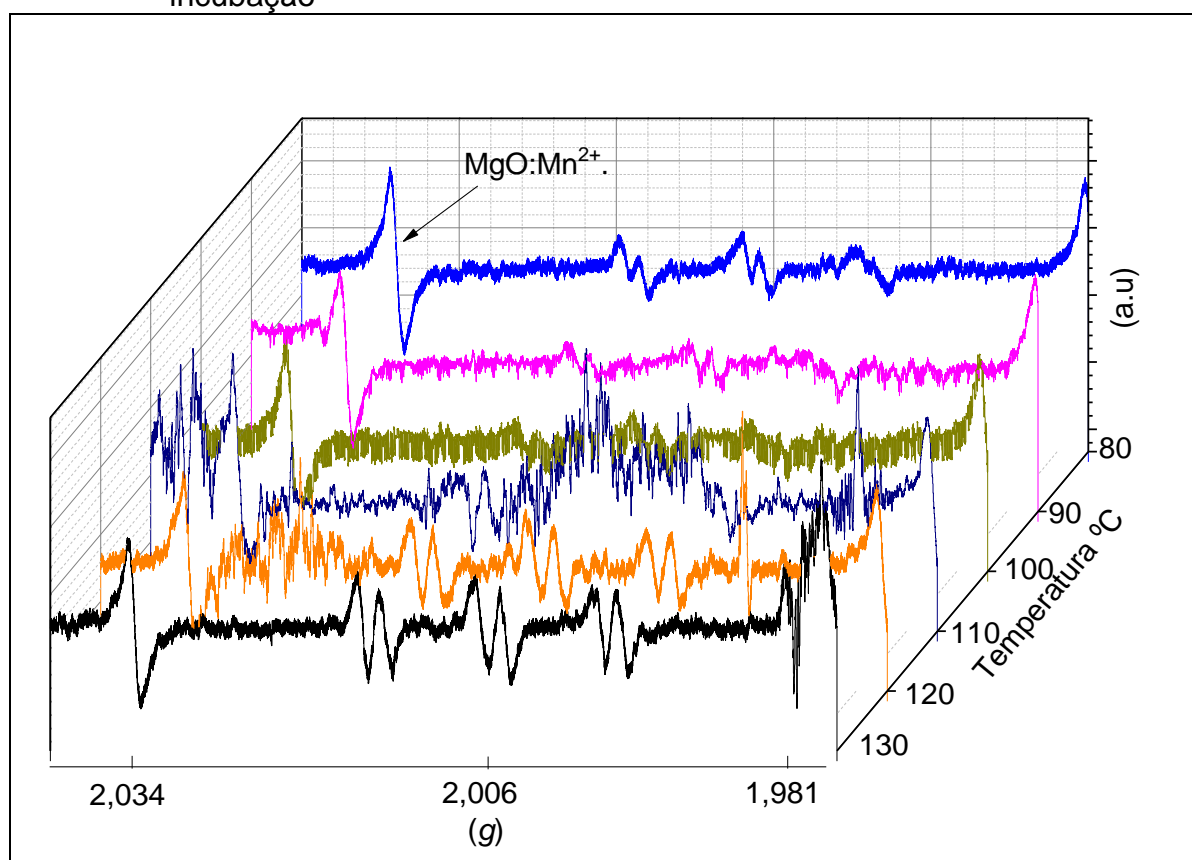
Figura 31 – Espectro do óleo de semente de uva submetido ao aumento de temperatura de 25°C a 70°C, para uma amostra com 30 dias de incubação



Fonte: o autor

Apesar da queda de qualidade do sinal da Figura 32, ainda é possível notar a interação que ocorre entre o radical e a molécula do PBN. Esta queda na qualidade do sinal provavelmente ocorreu por alterações ocorridas com o óleo em função do aumento da temperatura. A partir dos 110°C, é possível identificar o conjunto de seis linhas de ressonância referentes à interação do radical capturado com o átomo de nitrogênio e hidrogênio presentes na molécula do PBN, e este desdobramento é visível até os 150°C, apesar da queda na intensidade do sinal, como ocorre em todos os óleos analisados.

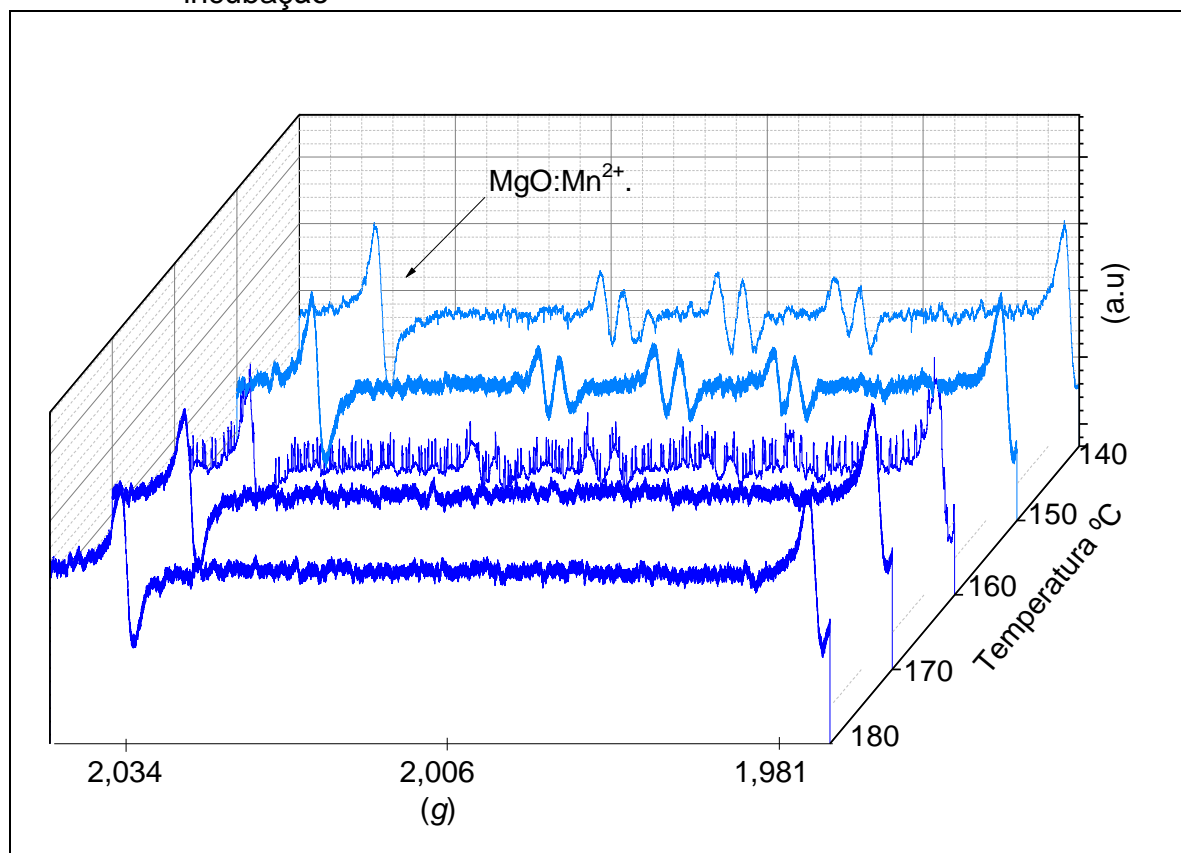
Figura 32 – Espectro do óleo de semente de uva submetido ao aumento de temperatura de 80°C a 130°C, para uma amostra com 30 dias de incubação



Fonte: o autor

A Figura 33 mostra a ausência de sinais de RPE a partir dos 160°C, porém não é possível afirmar se ocorreu o alargamento de linhas ou se houve um acoplamento entre as moléculas de PBN.

Figura 33 – Espectro do óleo de semente de uva submetido ao aumento de temperatura de 140°C a 180°C, para uma amostra com 30 dias de incubação



Fonte: o autor

O óleo de semente de uva é predominantemente composto pelo ácido graxo linoleico (C18:2) em quantidades que variam entre 48 e 57,2%. Além disso, o número total de ácidos graxos insaturados varia de 70% a 76% (ROCKENBACH et al., 2010).

4.9 VISCOSIDADE DINÂMICA (RMN) E O COMPLETO DESDOBRAMENTO HIPERFINO NO RPE

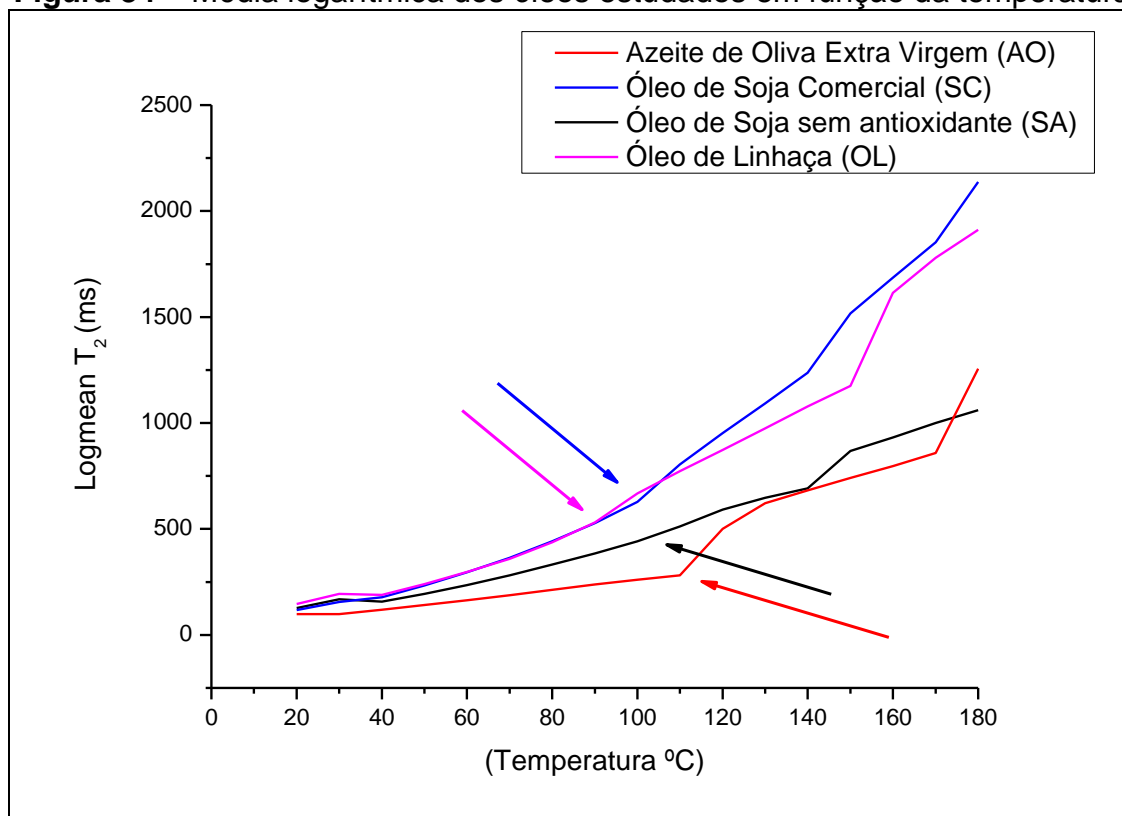
A Figura 34 apresenta os resultados das médias logarítmicas T_{2ml} encontradas para os óleos AO, SC, SA e OL. A temperatura de análise foi entre 20°C e 180 °C.

A curva logarítmica de relaxação T_{2ml} do azeite de oliva (AO) sofre uma alteração conforme o aumento da temperatura. Ao alcançar os 115°C apresenta uma mudança considerável em seu tempo de relaxação. Supõe-se, então, que a partir dessa temperatura, o óleo começa a sofrer alterações significativas em sua

viscosidade. Essas alterações continuam e seguem até os 130°C. Supõem-se que entre o 115°C e o 130°C o azeite de oliva extravirgem alcançou uma viscosidade mínima, na qual o coeficiente de difusão rotacional e translacional do fluido é modificado de forma que a mobilidade molecular é alterada (NICOT; FLEURY; LEBLOND, 2006).

Por outro lado, entre 110°C e 120°C, o espectro de RPE do azeite de oliva, Figura 20, mostrou o completo desdobramento hiperfino. Dessa forma, pode-se associar a mudança da mobilidade rotacional detectada pelo RMN com a alteração na forma de linha mostradas pelo RPE.

Verifica-se pela Figura 34, que aos 100°C, no óleo de soja comercial (SC), inicia uma mudança mais acentuada na curva de relaxação, ou seja, nesta temperatura ocorre uma mudança mais definida no coeficiente de viscosidade deste óleo. Interessante notar que os espectros de RPE (Figura 23) começam a sofrer alterações significativas nas formas de linhas a partir dos 80°C. Nesta temperatura, inicia-se o processo de desacoplamento das linhas sobrepostas e aos 100°C já é possível verificar o completo desdobramento hiperfino das linhas. O gráfico da média logarítmica do óleo de soja sem antioxidante (SA) começa a apresentar uma leve mudança no tempo de relaxação aos 110°C e esta alteração continua até os 120°C. Mesmo sendo pequena, esta alteração é sinal de que provavelmente o óleo atingiu um valor de viscosidade mínima que proporcionou a ele se movimentar em um novo regime dinâmico. Tal afirmação pode ser verificada pelo espectro de RPE, Figura 26, pois aos 120°C é possível encontrar as seis linhas de ressonância esperadas referentes à interação do radical aprisionado e a molécula do PBN.

Figura 34 – Média logarítmica dos óleos estudados em função da temperatura

Fonte: o autor

Conforme mostra a Figura 34, o óleo de linhaça apresentou alterações em sua média logarítmica aos 90°C, por outro lado, verifica-se na Figura 28, que também aos 90°C ocorreu o total desacoplamento das linhas de ressonância observado pelo espectro de RPE.

O fato de cada tipo de óleo possuir uma temperatura própria na qual ocorrem mudanças em suas médias logarítmicas de relaxação T_{2ml} , aliado ao efeito de desdobramento hiperfino detectado por RPE também ocorrer em temperaturas distintas, leva a considerar a hipótese de que a temperatura não seja o fator preponderante na alteração da forma de linha, mas sim que ela atue na alteração do índice de viscosidade dos óleos, sendo esse o fator determinante para mudanças ocorridas no meio reacional, a fim de que se possa observar o desdobramento hiperfino entre o radical aprisionado e da molécula do PBN. Deste modo, apresenta-se a ideia de que exista uma viscosidade mínima na qual todo óleo vegetal comece a ter uma nova dinâmica molecular. Tal verificação pode ser sustentada com a visualização do desdobramento hiperfino que ocorre nos espectros de RPE, pois estas mudanças no meio reacional tornam a interação com o hidrogênio intensa o

bastante para ser observada por RPE, então é possível afirmar que ao se visualizar o desdobramento hiperfino nos espectros de RPE, a viscosidade mínima foi alcançada.

A partir desta constatação, pode-se supor que mesmo óleos vegetais que tenham sua viscosidade alterada por outros fatores, ao atingir esta viscosidade mínima, tenham seus regimes dinâmicos alterados, e que esta alteração seja possivelmente detectada por RPE. A hipótese acima pode ser respaldada com a tabela abaixo, a qual apresenta viscosidades encontrados para cada óleo analisado.

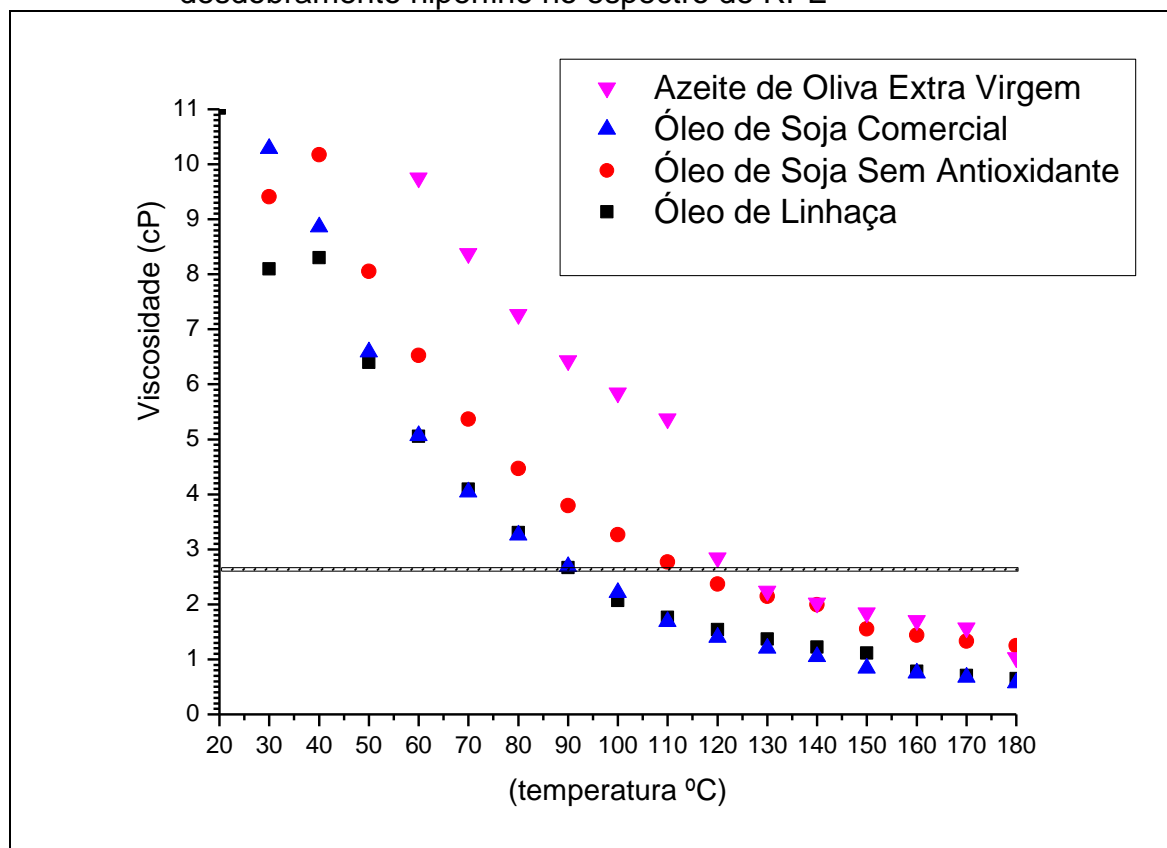
Tabela 7 – Temperaturas encontradas no RPE nas quais se visualiza o desdobramento hiperfino e viscosidade mínima calculada a partir das médias logarítmicas fornecidas por RMN dos óleos vegetais

Óleo	Temperatura °C		Viscosidade η (cP)
	RPE	RMN	
(AO)	120(\pm 5%)	123	2,6
(SC)	100(\pm 5%)	100	2,6
(SA)	120(\pm 5%)	113	2,6
(OL)	90(\pm 5%)	90	2,6

Fonte: o autor

A Figura 35 apresenta as curvas de decaimento da viscosidade em função da temperatura.

Figura 35 - Comportamento da viscosidade em função da temperatura. O traço delimita a viscosidade mínima para que se possa detectar o desdobramento hiperfino no espectro de RPE



Fonte: o autor

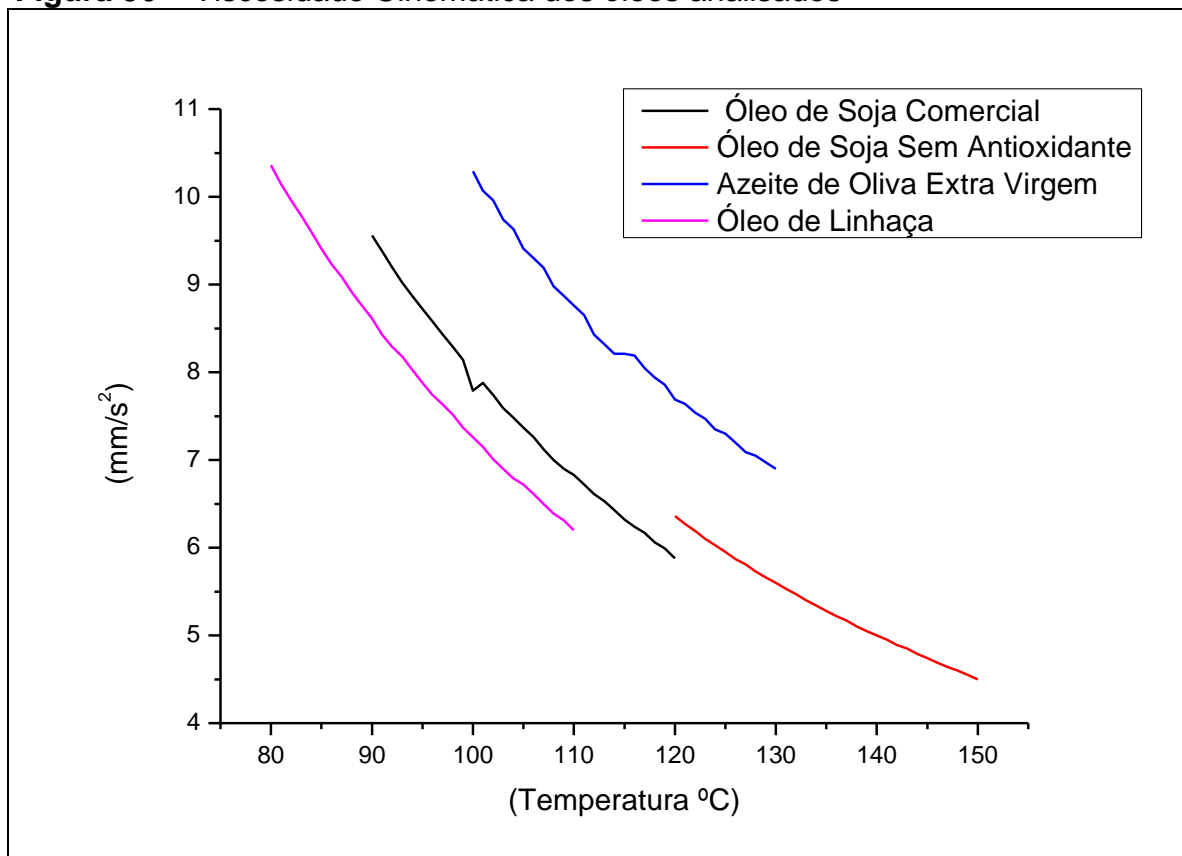
As curvas da Figura 35 representam a queda no coeficiente de viscosidade dinâmica dos óleos vegetais. É possível notar que o acréscimo da temperatura é o responsável pela redução em seu valor. Através dos valores extraídos da Tabela 7, pode-se encontrar um valor mínimo, no qual se supõem que o regime dinâmico dos óleos é alterado, e tal alteração é confirmada pelos desdobramentos que resultam nas seis linhas detectadas por RPE.

4.10 VISCOSIDADE CINEMÁTICA

As análises da viscosidade cinemática ocorreram somente nas faixas de temperatura em cujos desdobramentos hiperfinos e viscosidades mínimas foram detectados por RPE e por RMN respectivamente. Os resultados apontaram uma alteração significativa no azeite de oliva extravirgem aos 115°C e no óleo de soja comercial aos 100°C, enquanto que no óleo de linhaça e no óleo de soja sem antioxidantes não foi detectado nenhuma alteração considerável.

Estas duas alterações ocorridas no óleo de soja comercial e no azeite de oliva podem ser referentes às mudanças na dinâmica molecular ocorridas nos óleos, ou estarem relacionadas ao maior número de ácidos graxos monoinsaturados.

Figura 36 – Viscosidade Cinemática dos óleos analisados



Fonte: o autor

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO

A técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica foi utilizada para monitorar e quantificar radicais livres nos óleos, entretanto, sua detecção ocorreu apenas com o uso do spin trap PBN. Assim, foi possível avaliar a geração de radicais livres nos óleos de soja comercial com antioxidantes e sem antioxidantes e também nos óleos de linhaça, de semente de uva além do azeite de oliva extravirgem.

A concentração de radicais livres nos óleos aumentou devido ao maior tempo de contato entre o óleo e o spin trap, assim pôde-se concluir que quanto maiores são os períodos de armazenamento, maior é a oxidação dos óleos.

Além disso, constatou-se que o número de espécies paramagnéticas capturadas pelo spin trap, está diretamente relacionado com a quantidade de ácidos graxos monoinsaturados presentes em cada óleo, ou seja, quanto maior o número de mono insaturações, maior será a concentração de radicais livres.

Os óleos foram incubados por um período de 120 dias. Observou-se neste período, que o azeite de oliva extravirgem foi o óleo que apresentou o maior número de radicais livres capturados dentre os óleos estudados.

Constatou-se ainda, em temperatura ambiente, não ser possível visualizar a interação do radical livre aprisionado com o átomo de hidrogênio presente na molécula do PBN. Entretanto, com o aumento da temperatura e a consequente mudança no meio reacional, detectou-se a interação entre o radical capturado e a molécula de PBN, ou seja, desta maneira foi possível visualizar o desdobramento hiperfino completo, revelando as seis linhas de ressonância.

Com a utilização da técnica de Ressonância Magnética Nuclear, pôde-se verificar que a queda no valor da viscosidade é dependente do aumento da temperatura. Deste modo, para menores valores de viscosidade, maior será a mobilidade molecular.

A determinação da viscosidade revelou ainda um valor mínimo de 2,6 cP, no qual, os óleos ao atingi-lo, passam a se comportar sob um novo regime dinâmico de alta mobilidade molecular.

Deste modo, pode-se conectar as técnicas de RPE e RMN, pois as temperaturas, nas quais foram possíveis detectar os desdobramentos hiperfinos no

RPE, são as mesmas em que se encontram o valor mínimo da viscosidade no RMN, mostrando que a interação com o átomo de hidrogênio presente na molécula do PBN passa a ser perceptível do ponto de vista da RPE somente quando a viscosidade é alterada, ou seja, quando a mobilidade molecular, atinge em um valor específico.

Esta pesquisa oferece como perspectivas futuras, a proposta de um aprofundamento no estudo da oxidação lipídica dos óleos vegetais, que pode ser aplicado diretamente nos estudos de alimentos e também em trabalhos com biocombustíveis, especificamente o biodiesel.

Como sugestões, entre outras indagações surgidas com este trabalho, pode-se buscar compreender qual a influência que tempos prolongados de aquecimento dos óleos (processo de fritura) exercem sobre a geração de radicais livres. Além disso, pode-se buscar compreender os mecanismos que atuam sobre os óleos quando eles atingem os mesmos valores da viscosidade. Deste modo, acredita-se ser possível aplicar os conhecimentos desenvolvidos neste trabalho de forma interdisciplinar abrangendo dessa forma, várias áreas do conhecimento.

REFERÊNCIAS

- ANP - AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS. **Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis**: 2016. Rio de Janeiro: ANP, 2008. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/wwwanp/images/publicacoes/Anuario_Estatistico_ANP_2016.pdf>. Acesso em: 15 out. 2016.
- BARBOSA, Lúcio L.; KOCK, Flávio V. C.; ALMEIDA, Vinícius M. D. L.; MENEZES, Sônia M. C.; CASTRO, Eustáquio V. R. Low-field nuclear magnetic resonance for petroleum distillate characterization. **Fuel Processing Technology**, n. 138, p. 202 – 209, 2015.
- BASKIN, S. I.; SALLEM H. **Oxidants, antioxidants, and Free Radicals**. 1ª Edição, Taylor & Francis, 1987.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.
- BIKTAGIROV, T. B.; GAFUROV, M. R.; VOLODIN, M. A.; MAMING, V.; RODIONOVA, A.; IZOTOV, V. V.; VAKHIN, A. V.; ISAKOV, D. R.; ORLINSKII, S. B. EPR study of rotational mobility of vanadyl-porphyrin complexes in crude oil asphaltenes: probing the effect of thermal treatment of heavy oils. **Energy & Fuel**, v.28, n.10, p. 6683–6687, 2014.
- BLOEMBERGEN, N.; PURCEL, E.M.; I, POUND, R.V. Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption. **Physical Review**, n.73, p. 679–746, 1948.
- BOURNE, Malcolm C. **Food texture and viscosity: Concept and measurement**. New York: Academic press, 1982.
- BUNCE, N. J. Introduction to the interpretation of electron spin resonance spectra of organic radicals. **Journal of Chemical Education**, v.64, n. 11, p. 907-914, 1987.
- CANCIAM, C. A. Efeito da temperatura na viscosidade de óleos vegetais refinados. UEP. Exatas Terra, **Ci Agr. Eng.**, Ponta Grossa. v.16, n.1, p.7-12, 2010.
- CARDOSO, Luiz Gustavo Vieira; BARCELOS, Maria de Fátima Piccolo; OLIVEIRA, Adelson Francisco de; PEREIRA, Juciane de Abreu Ribeiro; ABREU, Wilson César de; PIMENTEL, Flávio de Araujo; CARDOSO, Maria das Graças; PEREIRA, Michel Cardoso de Angelis. Características físico-químicas e perfil de ácidos graxos de azeites obtidos de diferentes variedades de oliveiras introduzidas no Sul de Minas Gerais – Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 127-136, jan./mar. 2010.
- CARRINGTON, A.; MCLACHLAN, A. **Introduction to Magnetic Resonance**, Harper & Row, 1967.

CHALFONT, G. R.; PERKINS, M. J.; HORSFIELD, A. Electron Paramagnetic Resonance Study of Free-Radical Reactions Initiated by Radioactive Decay in Solid Naphthalene-1-t. **J. Am. Chem. Soc.** v.90, p.7141-7142, 1968.

CHOE, E.; MIN, B. DAVID. Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.5, n.4, p. 169-186, 2006.

CLÉMENT, J. L.; TORDO, P. Advances in spin trapping. In: GILBERT, B.C.; DAVIES, M.J.; MURPHY, D. M. **Electron Paramagnetic Resonance**. Volume 20 - A Review of the Recent Literature. The Royal Society of Chemistry, 2007. P. 29-49.

D'ARCE, Marisa A. B. Regitano. Deterioração de lipídeos - ranço. In: OETTERER, Marília; D'ARCE, Marisa A. B. Regitano; SPOTO, Marta Helena Fillet. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. São Paulo: Editora Manole Ltda, 2006. p. 243– 299.

D'ARCE, Marisa A. B. Regitano. Química básica dos lipídeos. In: OETTERER, Marília; D'ARCE, Marisa A. B. Regitano; SPOTO, Marta Helena Fillet. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. São Paulo: Editora Manole Ltda, 2006. p. 196 – 242.

D'ARCE, Marisa A. B. Regitano; VIEIRA, Thais M. Ferreira de Souza. Fuentes de aceites y grasas: materias primas industriales. In: BLOCK, Jane Mara; ARELLANO, Daniel Barrera. **Temas selectos em aceites y grasas. Volumen 1 – procesamiento**. São Paulo: Edgard Blucher Ltda, 2009. p. 1-29.

DAUN, James K.; BARTHET, Véronique J.; CHORNICK, Tricia L.; DUGUID, Scott. Structure, composition, and variety development of flaxseed. In: THOMPSON, Lilian U. CUNNANE, Stephen C. **Flaxseed in human nutrition**. 2th ed. Champaign, Illinois: AOCS PRESS, 2003. p. 7 - 47.

DAVID, L. Nelson; COX, M. Michael. **Principios de bioquímica de lehniger**. 5. ed. Porto alegre: Artmed, 2011.

DENG, F.; XIAO, L.; CHEN, W.; LIU, H.; LIAO, G.; WANG, M. Rapid determination of fluid viscosity using low-field two-dimensional NMR. **Journal of Magnetic Resonance**, n.247, p.1 - 8, 2014.

DESHPANDE, S. S.; DESHPANDE, U. S.; SALUNKHE, D. K. Nutritional and Health aspects of food antioxidantes. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. **Food antioxidants: technological, toxicological, and health perspectives**. New York: Marcel Dekker Inc, 1996. p. 361-470.

DONOSO, J. P.; BARBERIS, G. E. Descrição quântica de espectros de ressonância paramagnética eletrônica. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v.19, n.1, p.125-135, mar. 1997.

ERICKSON, R. David. Production and composition of frying fats. In: ERICKSON, D. Michael.; PERKINS, G. Edward. **Deep Frying: chemistry, nutrition, and practical applications**. Illinois: AOCS Press, 1996. p. 4-28.

FERNANDES, Luana; CASAL, Susana; CRUZ, Rebeca; PEREIRA, José Alberto; RAMALHOS, A. Elsa. Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. **Food Research International**, v. 50, p. 161 – 166, 2013.

FINKELSTEIN, E.; ROSEN G. M.; RAUCKMAN, E. L.; Spin trapping of superoxide and hydroxyl radical: practical aspects. **Arquivos of Biochemistry and Biophysics**, v.200, n. 1, p.1-16, 1980.

GALVÃO, Elisângela Lopes; SILVA, Débora Cristina Fernandes da; SILVA, Jamile Oliveira da; MOREIRA, Ana Vlândia Bandeira; SOUSA, Elisa Maria Bittencourt Dutra de. Evaluation of the antioxidant potential and sub-critical extraction of linseed oil. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n.3, p. 551-557, jul./set. 2008.

GERSON, F.; HUBER, W. **Electron Spin Resonance Spectroscopy of Organic Radicals**. Weinheim, 2003.

GIUFFRIDA, Francesca; DESTAILLATS, Frédéric; EGART, H. Maria; HUG, Bernadette; GOLAY, A. Pierre; SKIBSTED, H. Leif; DIONISI, Fabiola. Active and thermal stability of antioxidants by differential scanning calorimetry and electron spin resonance spectroscopy. **Food Chemistry**, n.101, p.1108-1114, 2007.

HARBOUR, J.R., CHOW V., BOLTON J.R. **Canada Journal Chemical**, v.52, p. 3549, 1974.

HARTGERINK, J. W. **Spin trapping by nitrosoalkanes**. Mechanisms of some photochemically induced reactions. Holanda, 1971.

IKEYA, M. **New Applications Of Electron Spin Resonance – dating, dosimetry and microscopy**. Singapore: World Scientific, 1993.

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**. Marcel Dekker Inc, 1996. p. 5-63.

JANZEN, E. G.; KOTAKE, Y.; HINTON, R. D. Stabilities of hydroxyl radical spin adducts of pbn-type spin traps. **Free Radical Biology & Medicine**, v.12, p.169-173, 1992.

LAGERCRANTZ, C.; FORSHULT, S.; Trapping of short-lived free radicals as nitroxide radicals detectable by ESR spectroscopy. The radicals formed in the reaction between OH-Radicals and some sulfoxides and sulphones. **Acta Chem. Stand.** n.23,p. 811-817, 1969.

- LATORRACA, G. A.; STONARD, S. W.; WEBBER, P. R. Heavy oil viscosity determination using NMR logs. **SPWLA 40th Annual Logging Symposium**, Oslo, 1999.
- LAWSON, Harry; **Food oils and fats: technology, utilization, and nutrition**. New York: Chapman & Hall, 1994.
- LEWIS, Michael; Heppell, Neil. **Continuous thermal processing of foods – Pasteurization and UHT sterilization**. Maryland: Aspen Publishers, 2000.
- LIST, G. R.; ERICKSON, D. R. Storage, handling, and stabilization. In: ERICKSON, David R.; PRYDE, Everett H.; Brekke, Ordean L.; Mounts, Timothy L.; Falb, Richard A. **Handbook of soy oil processing and utilization**. USA: AOCS, 1980. p. 267-353.
- LUND, A.; LIU, W. Continuous wave epr of radicals in solids. In: LUND, A.; SHIAOTANI, M. **Epr of free radicals in solids: Trends in methods and applications**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2003. p.1-37.
- MANDARINO, José Marcos Gontijo; ROESSING, Antonio Carlos; BENASSI, Vera de Toledo. **Óleos alimentos funcionais**. Londrina: Embrapa Soja. 2005.
- MELTON S. L.; JAFAR, Sajida; SYKES, Danielle; TRIGIANO, M. K.; Review of stability measurements for frying oils and fried food flavor. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.71, p.1301-1308, 1994.
- MIYASAKA, Shiro; MEDINA, Júlio Cesar. **A soja no Brasil**. Brasil: Embrapa, 1981.
- NAZ, Shahina; SHEIKH, Hina; SIDDIQI, Rahmanullah; SAYEED, Syed Asad. Oxidative stability of olive, corn and soybean oil under different conditions. **Food Chemistry**, v. 88, p. 253–259, Jan. 2004.
- NICOT, B.; FLEURY, M.; LEBLOND, J. A new methodology for better viscosity prediction using nmr relaxation. In: **SPWLA 47th Annual Logging Symposium**, 2006.
- O'BRIEN, D. Richard. **Fats and Oils: formulating and processing for applications**. Pennsylvania: Technomic Publishing Company, Inc, 1998.
- O'CONNOR, T. P.; O'BRIEN, N. M. Lipid oxidation. In: FOX, P. F. **Advanced dairy chemistry**. 2th ed. London: Chapman & Hall, 1995. p. 309-347.
- OLIVEIRA, Paulo Murilo Castro de. Análise qualitativa da ressonância paramagnética eletrônica. **Revista Brasileira de Física**, Rio de Janeiro, v.10, n.2, p.329-352, 1980.
- ORTON, J. W. **Electron Paramagnetic Resonance**. ILIFFE BOOKS LTD, London: 1968.
- OTTAVIANI, M. F.; SPALLACI, M.; CANGIOTTI, M.; NINFALI, M. B. P. Electron paramagnetic resonance investigations of free radicals in extra virgin olive oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.3691-3696, 2001.

- PAPADIMITRIOU, V.; MARIDAKIS, G. A.; SOTIROUDIS, T. G.; XENAKIS, Aristotelis. Antioxidant activity of polar extract from olive oil and olive mill wastewaters: an EPR and photometric study. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.107, p.513–520, 2005.
- PAPADIMITRIOU, V.; SOTIROUDIS, T. G.; XENAKIS, A.; SOFIKITI, N.; STAVYIANNOUDAKI, V.; CHANIOTAKIS, N. A. Oxidative stability and radical scavenging activity of extra virgin olive oils: An electron paramagnetic resonance spectroscopy study, **Analytica Chimica Acta**, p.453–458, 2006.
- PARDO, Jose Emilio; FERNÁNDEZ, Enrique; RUBIO, Manuela; ALVARRUIZ, Andrés; ALONSO, Gonzalo Luis. Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). **European Journal Lipid Science and Technology**, v. 111, p. 188 –193, 2009.
- PEREDA, Juan A. Ordóñez; RODRIGUEZ, Maria I. C. Cambero; ÁLVAREZ, Leónidez F.; SANZ, María L. Garcia; MINGUILLÓN, Gonzalo D. G. de Fernando; PERALES, Lorenzo de La Hoz; CORTECERO, María D. Selgas. **Tecnología de alimentos – Componentes dos alimentos e processos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- PERKINS, G. Edward. Volatile odor and flavor components formed in deep frying. In: ERICKSON, D. Michael.; PERKINS, G. Edward. **Deep frying: chemistry, nutrition, and practical applications**. Illinois: AOCS Press, 1996. p. 43-48.
- PINGRET, D.; DURAND, G.; TIXIER, A. S. F.; ROCKENBAUER, A.; GINIES, C.; CHEMAT F. Degradation of edible oil during food processing by ultrasound: electron paramagnetic resonance, physicochemical, and sensory appreciation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, p.7761–7768, 2012.
- PINTAURO, D. Nicholas. **Food additives to extend shelf life**. New Jersey: Noyes Data Corporation, 1974.
- PODMORE, J. Fats in Bakery and Kitchen Products. In: MORAN, D.P.J.; RAJAH, K. K. **Fats in food products**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 213-253.
- POOLE, C. P. **Electron Spin Resonance – A Comprehensive Treatise on Experimental Techniques**. New York: Wiley, 1967.
- POOLE, C. P.; FARACH, H. A. **Teoria de la resonancia magnética**. Editorial Reverte S.A., 1975.
- PORTO, Carla Da; DECORTI, Deborha; NATOLINO, Andrea. Effect of commercial enzymatic preparation with pectolytic activities on conventional extraction and ultrasound-assisted extraction of oil from grape seed (*Vitis vinifera* L.). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 2127 – 2132, 2013.
- QUILES, J. L.; TORTOSA, M. C. Ramírez; GOMEZ, J. A.; HUERTAS, J. R.; MATAIX, José. Role of vitamin e and phenolic compounds in the antioxidant capacity, measured

by esr, of virgin olive, olive and sunflower oils after frying. **Food Chemistry**, v.76, p. 461–468, 2002.

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

RICCA, M.; FODERÁ, V.; VETRI, V.; BUSCARINO, G.; MONTALBANO, M.; LEONE, M. Oxidation processes in sicilian olive oils investigated by a combination of optical and EPR spectroscopy. **Journal of Food Science**, v.77, p. 1084-1089, 2012.

RIEGER, H. PHILIP. **Electron Spin Resonance Analysis and Interpretation**. RSC Publishing, 2007.

ROCKENBACH, I. I.; RODRIGUES, E.; GONZAGA L. V.; FETT, R. Composição de ácidos graxos de óleo de semente de uva. Fatty acid composition of grapes (*Vitis vinifera* L. e *Vitis labrusca* L.) seed oil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.III, p.23-26, 2010.

ROHN, S.; KROH, W. L. Electron spin resonance - A spectroscopy method for determining the antioxidative activity. **Molecular Nutrition & Food Research**, v.49, p.896-907, mar. 2005.

SABIR, Ali; UNVER, Ahmet; KARA, Zeki. The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.). **Journal of the Science of Food Agriculture**, v.92, p. 1982–1987, jan. 2012.

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

SIMBALISTA, Renée Leão; FROTA, Karoline de Macêdo Gonçalves; SOARES, Rosana Aparecida Manólio; ARÊAS, José Alfredo Gomes. Effect of storage and processing of brazilian flaxseed on lipid and lignan contents. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 2, p.374-380, abr./jun. 2012.

SOUZA, E. Nilson; MATSUSHITA, Makoto; VISENTAINER, V. Jesui. Ácidos graxos: estrutura, classificação, nutrição e saúde. **Arquivos Apadec**, v.2, n.2, p.102-107, jul. 1998.

STOLL, S.; SCHWEIGER, A. **EasySpin**: simulating cw ESR spectra. Disponível em: <http://easyspin.org/pubs/easyspin_bmr07.pdf>. Acesso em: 30 jun. 2015.

THOMSEN, M. K.; JACOBSEN, C.; SKIBSTED, L. H. Mechanism of initiation of oxidation in mayonnaise enriched with fish oil as studied by electron spin resonance spectroscopy. **European Food Research and Technology**, v.211, p.381-386, 2000.

URBACH, G.; GORDON, M. H. Flavours Derived from fats. In: MORAN, D.P.J.; RAJAH, K. K. **Fats in food products**. London: Chapman & Hall, 1994. p. 213-253.

VAUGHAN, J. G. **The structure and utilization of oil seeds**. Great Britain: Chapman and hall Ltd, 1970.

VELASCO, J.; ANDERSEN, M. L.; SKIBSTED, L. H. Electron spin resonance spin trapping for analysis of lipid oxidation in oils: inhibiting effect of the spin trap alpha-phenyl-N-tert-butyl nitron on lipid oxidation. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p.1328-1336, 2005.

WEIL, J. A.; BOLTON R. J. **Electron Paramagnetic Resonance - Elementary Theory and Practical Applications**. 2^a Ed. New Jersey: John Wiley & Sons: Hoboken, 2007, p. 1-664.

WEISS, J. Theodore. **Food oils and their uses**. The Avi Publishing Company, Inc, 1983.

WILSON, R.; KIVELSON, D. ESR. Linewidths in Solution. I. Experiments on Anisotropic and Spin-Rotational Effects. **The journal of chemical physics**. Califórnia, v.44, p.154-168, 1966.

YOSHIKAWA, Toshikazu; NAITO, Yuji; KONDO Motoharu. Free radicals and diseases. In: HIRAMATSU, M.; TOSHIKAWA, T.; INOUE, M. **Food and Free Radicals**. New York, 1997. p. 11-19.

ZEGA, J.A.; HOUSE, W.V.; KOBAYASHI, R. A corresponding-states correlation of spin relaxation in normal alkanes. **Physica A**, v.156, n. 277–293, 1989.

ZHANG, G. Q.; LO, S. W.; HUANG, C. C. Some exceptions to default NMR rock and fluid properties. **SPWLA 36th Annual Logging Symposium**, Keystone, 1998.

ZHANG, Qing; SALEH, Ahmed S. M.; SHEN, Qun. Discrimination of Edible Vegetable Oil Adulteration with Used Frying Oil by Low Field Nuclear Magnetic Resonance. **Food Bioprocess Technology**, n. 6, p. 2562–2570, 2013.