

PERFIL ESPECTROSCÓPICO E CROMATOGRÁFICO DO ÓLEO DA MAÇÃ FUJI E GALA

SPECTROSCOPIC AND CROMATOGRAPHIC PROFILE OF THE OIL FUJI AND GALA APPLE

Rhuane Barbosa¹, Jéssica Cardoso Granero², Denise Milléo Almeida³, Luis Antonio Pinheiro⁴, Elenise Sauer⁵, Gilvan Wosiacki⁶, Rosilene Aparecida Prestes⁷

^{1,2,4,6,7} Universidade Estadual de Ponta Grossa – UEPG – Ponta Grossa – Brasil

^{3,5,8} Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Ponta Grossa – Brasil

raprestes@yahoo.com.br

Resumo

Neste trabalho, a Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) e Cromatografia a Gás (GC) foram empregadas para avaliar o rendimento de lipídios totais e o perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) a partir do epicarpo, mesocarpo e endocarpo de extrato hexânico das cultivares de maçã Fuji e Gala. Os resultados mostraram que, para as duas cultivares, o epicarpo e o endocarpo produziram maiores rendimentos de lipídio que o mesocarpo. O percentual de lipídio do epicarpo, endocarpo e mesocarpo encontrado para a cultivar Fuji foi de, respectivamente, 5,5%; 5,3% e 0,2% e para a cultivar Gala foi de 6,4%; 5,1% e 0,2%. Através do FTIR observou-se uma banda na região de 1746 cm^{-1} , referente à frequência de estiramento do grupo carbonila (C=O), e na região de 2915 a 2840 cm^{-1} , referentes à ligação C-H de alcanos. A região de 2955 cm^{-1} referente ao estiramento do hidrogênio de carbono insaturado por ligação dupla (C=C-H). A análise de componentes principais (PCA) discriminou as cultivares estudadas, com e sem exclusão de variáveis. As análises de ácidos graxos mostraram o perfil e a composição de ácidos graxos saturados e insaturados, sendo que os ácidos oléico e linoléico se apresentaram em maior quantidade. Foi também demonstrado que análise multivariada da concentração de ácidos graxos por GC pode ser usado para correlacionar com método não tão explorados (FTIR) na composição de ácidos graxos de frutas.

Palavras-chave: maçã, cromatografia, FTIR .

1 Introdução

A maçã (*Malus domestica*) é uma das frutas mais comercializadas no Brasil, tendo grande

participação no faturamento anual das frutas frescas brasileiras. Como estados de maior produção de maçãs, destacam-se os da região Sul, sendo as cultivares Fuji e Gala as mais comercializadas, cujos sabores são apreciados pelos consumidores (JANZANNTTI et al., 2000).

Maçãs constituem uma parte importante da dieta humana, já que elas são importantes fonte de monossacarídeos, fibra alimentar, minerais e diversos compostos biologicamente ativos, tais como a vitamina C, e certos compostos fenólicos (WU et al., 2007). Lipídeos e ácidos graxos são constituintes estruturais e metabólicos das células da planta e da fruta (SONG; BANGERTH, 2003). Eles também desempenham papel importante na qualidade sensorial dos alimentos e contribuem para o sabor como precursores de compostos voláteis tais como aldeídos e álcoois, por meio da ação do oxigênio e de um sistema multienzimático composto por lipoxigenase, hidroperoxiliase e álcool desidrogenase (BLANCO-GOMIS, 2002). Os ácidos graxos são um dos principais precursores dos compostos voláteis durante o amadurecimento do fruto, sendo o ácido palmítico, esteárico, oleico e linoleico. (BLANCO-GOMIS, 2001).

No estudo do cultivar de maçã *Red Delicious* foi verificada as mudanças na composição de ácidos graxos de acordo com as estações do ano através da GC-FID. Os ácidos graxos predominantes foram palmítico, linoléico e linolênico. No outono à primavera a composição dos ácidos aumentou principalmente para os ácidos linoleico e linolênico (WANG; FAUST, 1990). Estudos também foram realizados no extrato hexânico de sementes de maçã da cultivar Royal Gala. Portanto, a técnica de cromatografia a gás acoplada a espectroscopia de massa detectou ácidos como o palmítico, esteárico, oleico e linoléico (LU et al., 1998).

A partir de estudos para identificar ácidos graxos em amostras de sidras de maçã pode-se diferenciar sidras feita a partir de maçãs colhidas em regiões diferentes. Os principais ácidos encontrados através da cromatografia a gás foram caprótico, caprílico, cáprico, palmítico, palmitoléico, linoleico, mirístico e linolênico (BLANCO-GOMIS, 2001).

Pesquisadores avaliaram a composição de lipídios totais na cultivar de maçã Braeburn para investigar intervalos de irrigação e fertilizantes. Observaram em dois anos com três intervalos diferentes o conteúdo de lipídeos variou de 0,22 (irrigação diária sem adubo) para 0,70 (irrigação em intervalos de 7 dias com fertilizantes). Irrigação em intervalos de 3 dias sem fertilizantes apresentou 83,95 % de ácidos graxos, enquanto irrigação em sete dias com intervalo de fertilizante apresentou 64,08 % (KAFKAS et al., 2009).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o rendimento e o perfil espectroscópico e cromatográfico do lipídeo extraído a partir do epicarpo, mesocarpo e endocarpo das cultivares de maçã Fuji e Gala.

2 Material e Métodos

Material

As maçãs das cultivares Fuji e Gala foram lavadas, descascadas e suas estruturas básicas foram separadas em epicarpo (camada externa, casca), mesocarpo (camada imediatamente abaixo do epicarpo, polpa) e endocarpo (camada mais interna e rígida que envolve a semente). Em seguida, as camadas da maçã foram liofilizadas, moídas em multiprocessador.

Métodos

Extração do óleo com hexano

Aproximadamente dez gramas das estruturas básicas da maçã foram embebidas com 50 mL de hexano por 24 horas em um shaker com agitação de 200 rpm em temperatura ambiente. O solvente era removido e a extração repetida duas vezes. Após a remoção do solvente, a massa residual foi considerada o total de lipídeos. As extrações foram feitas em duplicatas.

Análise de Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho do extrato hexânico das estruturas básicas das cultivares de maçã Fuji e Gala foram obtidos por um espectrômetro Nicolet, modelo Spectrum 4.700, utilizou-se para cada espectro 60 varreduras, sendo a resolução de 2 cm^{-1} na região de 4.000 a 400 cm^{-1} . O preparo das pastilhas sólidas de KBr foram de 40 mg e 0,012 mg de amostra de óleo.

Análise de Cromatografia Gasosa (GC)

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) do óleo foram preparados pela reação de transesterificação utilizando o procedimento descrito por Prestes (2009) e Hartman (1973). A concentração relativa dos FAMES foi obtida em um cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC 148 equipado com um detector de ionização de chama (FID) e um injetor split/ splitless. A temperatura do injetor e detector foi de $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a temperatura inicial do forno foi de $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 8 min, aquecendo 8 a 8^o até $220\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo mantida isotermicamente nesta temperatura por 32 minutos. A coluna capilar utilizada foi sílica fundida LM-100 (Carbowax 29M, polietileno glicol) com dimensões $30\text{m} \times 0,25\text{mm} \times 0,30\mu\text{m}$.

Análise Multivariada

Análise de componentes principais (PCA) foram realizadas utilizando o programa Pirouette 4.0 (Infometrix). Os espectros de FTIR do óleo das estruturas básicas da cultivar Fuji e Gala foram colocados em uma matriz (6×4000), onde o 6 representa 3 amostras da cultivar Fuji e 3 da cultivar

Gala. As variáveis são representadas pelo 4000, referentes ao número de ondas (400 a 4000 cm^{-1}) dos espectros. As cultivares foram divididos em 3 classes (epicarpo, mesocarpo e endocarpo) e o pré-processamento utilizado foi o centrado na média.

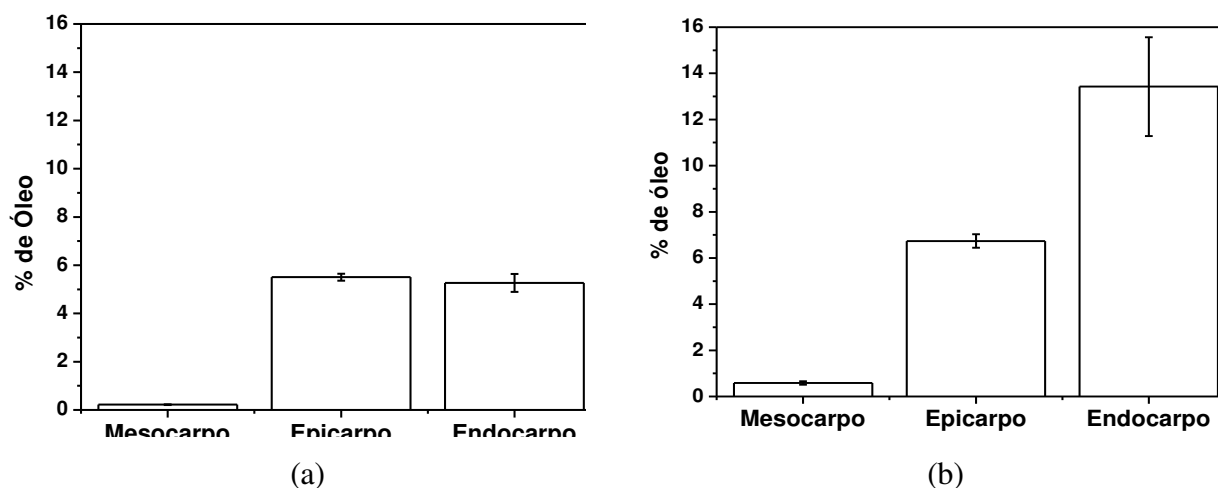
Os dados de diferentes técnicas foram correlacionados pelo método de PLS, onde se usou a matriz de dados de FTIR como variável independente e a dos FAME como variáveis dependentes⁴. A avaliação da previsibilidade dos modelos obtidos foi feita através da validação cruzada, na qual se remove uma amostra do conjunto de dados para a geração do modelo, que será testada como desconhecida, repetindo-se este procedimento para as demais amostras.

3. Resultados e Discussão

Rendimento da extração

A percentagem do rendimento do óleo das estruturas básicas das cultivares Fuji e Gala estão expressos na Figura 1. Na Figura 1.a observa-se que o maior rendimento de óleo para a cultivar Fuji, foi para o epicarpo da maçã (5,50%) seguido pelo endocarpo (5,26%) e mesocarpo (0,2%). A Figura 1.b refere-se à quantificação percentual do rendimento do óleo da maçã Gala, a qual obteve um maior rendimento de óleo no endocarpo (14%), seguido pelo epicarpo (6,4%) e mesocarpo (0,22%).

Figura 1- Quantidade percentual do óleo das cultivares de maçã: (a) Fuji e (b) Gala

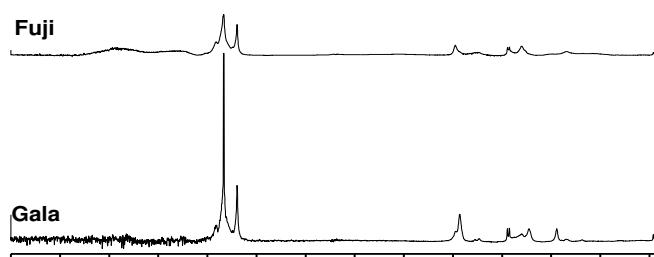


Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 2 mostra os espectros de FTIR do óleo extraídos do epicarpo das cultivares de maçã Fuji e Gala. Nesta figura observa-se na região de 2.955 cm^{-1} o estiramento do hidrogênio de carbono insaturado por ligação dupla (C=C-H). Esta banda não aparecerá nas amostras de ésteres metílico de ácidos graxos devido à reação de transesterificação quebrar a dupla ligação. As bandas 2.915 e 2.840 cm^{-1} são referentes a ligação (C-H) de alcanos. Na região de 1.746 cm^{-1} aparece uma

banda relativa à frequência de estiramento do grupo carbonila (C=O), característico dos ésteres. Também foi observado vibrações de formações axial de C-O e deformação angular de O-H presentes nas bandas 1.377 e 1.238 e entre 1.440 e 1.395 cm^{-1} (SILVERSTEIN, WEBSTER, 1998). Os ácidos graxos de cadeia longa apresentam um padrão com três bandas nas regiões de 1246, 1165, 1099 cm^{-1} , absorção somente vista no epicarpo da cultivar gala.

Figura 2- Espectros de FTIR do óleo do epicarpo das cultivares de maçã Gala e Fuji



As bandas apresentadas na Figura 2 entre 1.654-1.648 cm^{-1} , referente à frequência de estiramento de carbono ligados por uma ligação dupla (-C=C-). Na região de 723 cm^{-1} uma deformação fora do plano da ligação dupla entre carbonos (-HC=CH-) (GUILLÉN 1998).

Analisando o perfil do óleo das estruturas básicas das cultivares da maçã observou-se diferença somente na região referente a ácidos graxos de cadeia longa vista no epicarpo da cultivar gala. Este mesmo cultivar apresentou maior intensidade dos sinais nos espectros na região de 2.915 cm^{-1} do endocarpo e 1.746 cm^{-1} do epicarpo.

Análise Multivariada

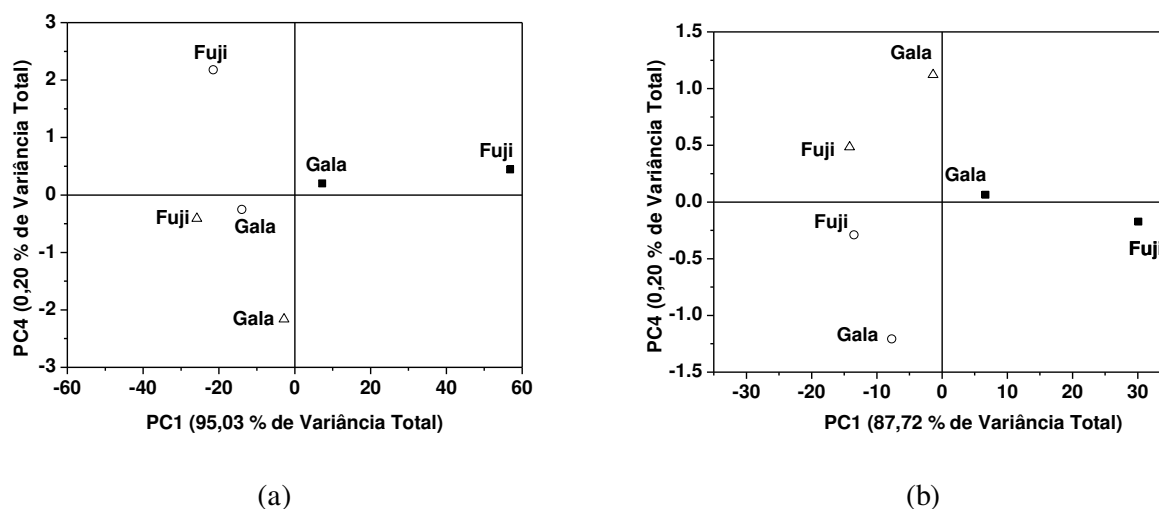
Através da análise de componentes principais (PCA) obteve-se a discriminação das cultivares estudadas pela análise de FTIR, determinando quais as variáveis de maior importância e discriminando as amostras de maior semelhança, com e sem exclusão de variáveis.

Na Figura 3 apresenta-se os gráficos dos escores obtidos pela PCA. Os resultados coletados (centrados na média) sem exclusão de variáveis (Figura 3.a), explicam mais do que 99% de variância, usando a quinta componente principal (PC). Plotando PC1 versus PC4, obteve-se a melhor discriminação entre as amostras, demonstrando que o endocarpo e o mesocarpo são muito semelhantes, sendo que PC1 forneceu 95,03% e PC4 0,20 % da variância explicativa.

Os dados também foram analisados com exclusão de variáveis. As variáveis excluídas dos espectros foram as quais apresentaram baixas correlações com os resultados, permanecendo somente as variáveis de interesse. Com exclusão das variáveis (4.000 – 2994.956 cm^{-1} ; 2800.178 –

1778.075 cm^{-1} ; 966.1777 – 751.1497 cm^{-1} ; 499.4808 – 399.199 cm^{-1}) (Figura 3.b), apresentou cinco componentes principais que forneceram 99% de informação. Plotando PC1 (87,72%) versus PC4 (0,20%) se obteve melhor discriminação das amostras. A PC1 foi responsável pela discriminação das amostras referentes ao epicarpo, e a PC4 discriminou as amostras referentes ao mesocarpo e endocarpo.

Figura 3- Gráficos dos escores para os dados de FTIR dos óleos do epicarpo (•), mesocarpo (o) e endocarpo (Δ) das cultivares de maçã Gala e Fuji: (a) sem exclusão de variáveis e (b) com exclusão de variáveis



O gráfico de pesos (dados não mostrados) entre PC1 e PC4 sem exclusão de variáveis (400-4000 cm^{-1}) e com exclusão de variáveis (4.000 – 2994.956 cm^{-1} ; 2800.178 – 1778.075 cm^{-1} ; 966.1777 – 751.1497 cm^{-1} ; 499.4808 – 399.199 cm^{-1}) mostraram respostas semelhantes com relação a formação do gráfico de escores. Portanto, isto indica que as variáveis excluídas não eram significativas na construção do modelo e não interferiram na discriminação das amostras.

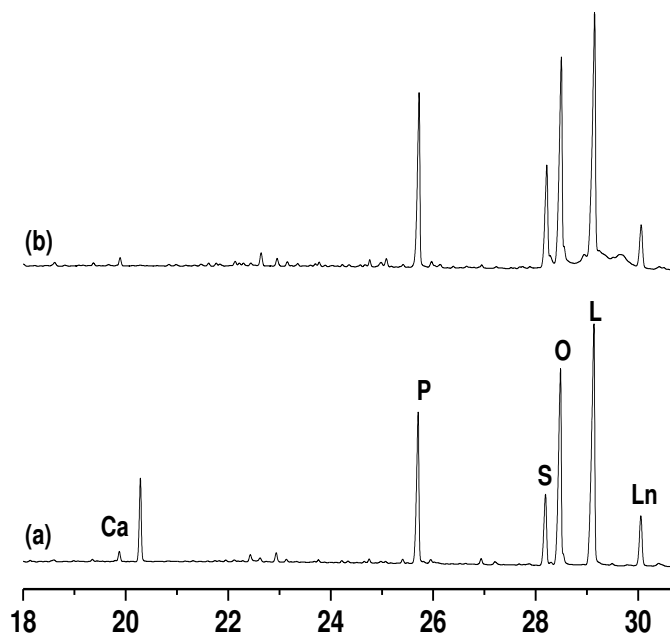
Cromatografia Gasosa

A Figura 4 mostra o perfil dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME), medidos por GC e preparados de extratos de TAG de estruturas básicas como epicarpo das cultivares de maçã Fuji e Gala. Foram identificados os ácidos cáprico (Ca), palmítico (P), esteárico (S), oléico (O), linoléico (L) e linolênico (Ln). Observou-se que o óleo do mesocarpo e endocarpo (dado não apresentado) das cultivares Fuji e Gala apresentaram perfil similar.

A mesma Figura mostra a menor concentração dos componentes do FAME dos triacilglicerídeo (TAG), qual são cáprico, linolênico e esteárico. Ca é a concentração mais baixa, menos de 8,0%, em todas as amostras analisadas. Este ácido graxo auxilia na paralisação espontânea da fermentação alcoólica antes do completo consumo de açúcares, por ser inibidor de levedura (GENEIX et al., 1984; LANFON-LAFOURCADE et al., 1984). P mostra concentração

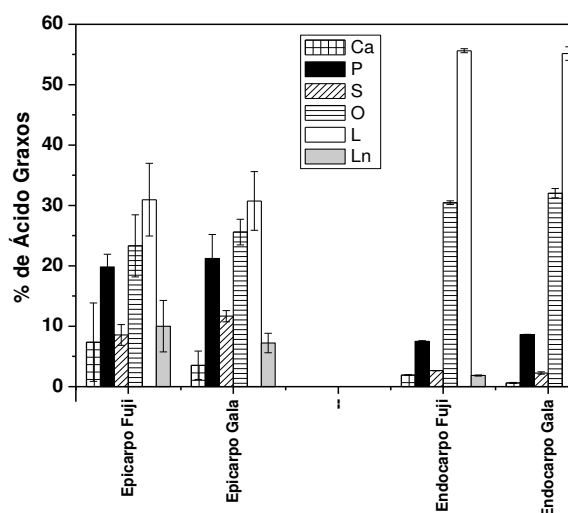
semelhante para as cultivares e varia de 1,4% em ambos os epicarpós e no endocarpo a variação é de 1,1%. A concentração do S aumentou na camada do epicarpo, sendo menor no endocarpo, ocorreu para os dois cultivares.

Figura 4- Perfil cromatográfico dos FAME das amostras de epicarpo das cultivares de maçã: (a) Fuji e (b) Gala



A maior concentração dos componentes do FAME foi para os ácidos insaturados O e L (Figura 5).

Figura 5- Concentração percentual de FAME, obtida do epicarpo e endocarpo de cultivares de maçã Fuji e Gala



Para o O a camada do epicarpo apresentou aumento na cultivar Gala (32,6%), enquanto, no endocarpo a concentração de ambas as cultivares foi similar. L é o ácido graxo mais abundante no endocarpo com o valor médio variando de 55,6 a 55,2% do FAME das cultivares de maçã Fuji e

Gala, respectivamente. O linoléico e oléico são o primeiro e segundo ácido graxo mais abundante no endocarpo das cultivares. Estes ácidos estão envolvidos no fenômeno de formação e estabilidade da espuma, fazendo com que estas duas cultivares sejam matéria prima importante para a produção de sidra (BLANCO-GOMIS, et al. 2002).

Para LU; L (1998) o endocarpo de maçã da cultivar Royal Gala apresentou ácido linoléico (51,2%) como o principal seguido pelos ácidos palmítico, linoléico, esteárico e oléico (10,5; 5,6; 4,3 e 4,1%), respectivamente.

Correlação dos dados de FTIR com FAME

Fez-se inicialmente a regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) dos dados de FTIR (matriz de 4 x 4000) de todas as 4 amostras de óleo do epicarpo e endocarpo das cultivares de maçã Fuji e Gala, com as concentrações dos FAME (4 x 6) determinadas por cromatografia gasosa.

Na Tabela 1 está os melhores coeficientes de correlação obtidos para os seis principais ácidos graxos identificados nas estruturas básicas da maçã, a partir dos resultados previstos pelo PLS dos dados de FTIR e os respectivos FAME, determinados por GC. Como se pode ver nesta tabela houve uma boa correlação entre os dados de FTIR previsto pelo PLS e os respectivos FAME determinados por GC.

Tabela 1 Correlação dos dados de FTIR com as concentrações dos ácidos graxos individuais das amostras do epicarpo e endocarpo das cultivares de maçã Fuji e Gala

Ácido Graxo	C	P	S	O	L	Ln
r (FTIR e FAME)	0,91	0,98	0,97	0,91	0,97	0,95

4. Conclusão

Os resultados mostraram que para as duas cultivares de maçã, o epicarpo e o endocarpo produziram maiores rendimentos de óleo do que o mesocarpo. O perfil do extrato hexânico por FTIR foi muito semelhante para as duas cultivares Fuji e Gala. Através das análises cromatográficas observou-se um perfil similar dos ésteres metílicos de ácidos graxos para as cultivares, sendo que os ácidos graxos majoritários foram oléico e linoléico.

Abstract

On this research, the Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and the Gas Chromatography (GC) were applied to evaluate the total lipids and the profile of the Fatty Acid Methyl Esters (FAME) present in the epicarp, mesocarp and endocarp of the hexanic extract from cultivars of Fuji and Gala apples. The results showed that for both the cultivars, the epicarp and the endocarp produced larger amounts of lipids than the mesocarp. The percentage of lipids in the epicarp, endocarp and mesocarp found in the Fuji cultivar was respectively, 5.5%; 5.3% and 0.2%. And for the Gala cultivar, the percentages were 6.4%; 5.1% and 0,2%. Through FTIR was observed

the presence of a band in the region of 1740 cm^{-1} that refers to the stretching frequency of the carbonyl group ($\text{C}=\text{O}$), and a band in the region between 2915 and 2840 cm^{-1} refers to the link $\text{C}-\text{H}$ in alkanes. The region of 2955 cm^{-1} is referred to the stretching of the hydrogen linked to a carbon that is unsaturated by a double bond ($\text{C}=\text{C}-\text{H}$). The Principal Component Analysis (PCA) differentiated both the cultivars, with and without excluding variables. The analysis of the fatty acids showed the profile and composition of the saturated and unsaturated fatty acids, where the acids oleic and linoleic were found in the greatest percentage. It was also shown that the multivariate analysis of the concentration of fatty acids by GC can be used to correlate with unexplored methods (FTIR) on the composition of fatty acids of fruits.

Key-words: Apple, chromatography, FTIR .

Referências

BLANCO-GOMIS, D.; MANGAS ALONSO, J. J.; MARGOLLES CABRALES, I.; ARIAS ABRODO, P. Characterization of cider apples on the basis of their fatty acid profiles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 1097-1100, 2002. <http://dx.doi.org/10.1021/jf010998x>.

BLANCO-GOMIS, D.; MANGAS ALONSO, J. J.; MARGOLLES CABRALES, I.; ARIAS ABRODO, P. Gas chromatographic analysis of total fatty acids in cider. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1260-1263, 2001. <http://dx.doi.org/10.1021/jf001006a>

FERREIRA, M. M. C. et al. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Química Nova**, v. 22, n. 5, p. 724-731, 1999.

GENEIX, C; LAFON-LAFOURCADE,S. Effect des acides gras sur la viabilité des populations de *Saccharomyces cerevisiae*. **Comptes rendus des seances de l'Academie des Sciences. Serie III. Sciences de la Vie**. v. 296, p. 943-947, 1983.

GUILLÉN, D. M; CABO, N; Relationships between the composition of edible oils and lard and the ratio of the absorbance of specific bands of their fourier transform infrared spectra. role of some bands of the fingerprint region. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v. 46, p. 1788-1793, 1988.

HARTMAN, L.; LAGO, R. A. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, p. 475-476, 1973.

HELPER, A. G; FERRÃO, F. M; FERREIRA, V. C; HERMES, N. Aplicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 779-786. Campinas, out/dez 2006.

JANZANNTTI, S. A; FRANCO, B. M. R; LANÇAS, M. F; Identificação de compostos voláteis de maçãs (*Malus domestica*) cultivar fuji, por cromatografia gasosa-espectrometria de massas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v 20. n. 2, mai/ago 2000.

LAFON-LAFOURCADE, S; GENEIX, C. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeast and their elimination by yeast ghosts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, p. 1246-1249, 1984.

MARTENS, H.; NAES, T. Multivariate calibration. Chichester: John Wiley & Sons, p. 424, 1994.

MASSAFERA, G; COSTA, B. M. T; OLIVEIRA, D. E. J; Composição de ácidos graxos do óleo do mesocarpo e da semente de cultivares de abacate (*Persea americana*, MILL.) da região de Ribeirão Preto, SP. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 21, n. 2, p. 325-331, abr/jun 2010.

PRESTES, R. A.; COLNAGO, L. A. ; FORATO, L. A.; CARRILHO, E.; BASSANEZI, R. B.; WULFF, N. A. Nuclear magnetic resonance characterization of metabolite disorder in orange trees caused by citrus sudden death disease. **Molecular Plant Pathology**. v. 10, n. 1, p. 51-57, 2009. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00507.x>

REDA, S. Y; **Estudo comparativo de óleos vegetais submetidos a estresse térmico**. 2004. 129 f. Dissertação de Mestrado- Setor de Ciência Agrária e de Tecnologia, Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2004.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de compostos Orgânicos**. São Paulo: Editora: Livros Técnicos e Científicos. 6^o Ed., 1998.

SONG, J.; BANGERTH, F. Fatty acids as precursors for aroma volatile biosynthesis in pre-climacteric an climacteric apple fruit. **Postharvest Biology and Technology**. v. 30, p. 113-121, 2003. [http://dx.doi.org/10.1016/S0925-5214\(03\)00098-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0925-5214(03)00098-X)

WANG, S. Y; FAUST, M. Seasonal changes of membrane lipids in apple shoots. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 115, n. 3, p. 462-467, 1990.

WU, J.; GAO, H.; ZHAO, L.; LIAO, X. ; CHEN, F. ; WANG, Z. ; HU, X. Chemical composition characterization of some apple cultivars. **Food Chemistry**, v. 103, p. 88-98, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.030>

YINRONG, L.; FOO, L. Y. Constitution os some chemical componentes of apple seed. **Food Chemistry**. v. 61, n. 1-2, p. 29-33, 1998. [http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146\(97\)00123-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0308-8146(97)00123-4)

Submetido em 06 mar. 2012, Aceito para publicação em 22 mai. 2012.