

Q-216 49

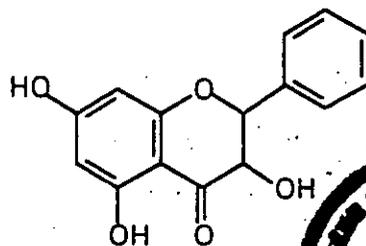
UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

TRABALHO DE LICENCIATURA

**Criação de um método simples de pesquisa de compostos
com propriedades antioxidantes de origem vegetal**



Autora: *Gertrudes Cláudia Tivane*

UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Trabalho de Licenciatura

**Criação de um método simples de pesquisa de compostos
com propriedades antioxidantes de origem vegetal**

Autora: *Gertrudes Cláudia Tivane*

Supervisor: *Dr. Felisberto Pagula*

U. E. M. DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
BIBLIOTECA
R. E. 27-11
DATA. 17.12.7.26
AQUISIÇÃO. F. E. R. T. A
COTA.....

Maputo, Setembro de 1995

AGRADECIMENTOS

Ao meu supervisor, Dr. Felisberto Pagula, pela orientação e discussão contínuas do trabalho e, a todos que me deram apoio técnico, material e, principalmente moral, durante todo o tempo de preparação e elaboração deste trabalho e que, por isso, muito contribuíram para que se chegasse ao término.

O meu, muito obrigado.

DECLARAÇÃO DE HONRA

O presente trabalho de licenciatura foi elaborado pela autora com base nos recursos a que ao longo do mesmo se faz referência.

Maputo, Setembro de 1995

Gertrudes Cláudia Tivane

RESUMO

O presente trabalho está basicamente virado à criação de um método simples de pesquisa de compostos com propriedades antioxidantes de origem vegetal.

Tem uma parte inicial de estudo bibliográfico que contempla um levantamento das características dos compostos antioxidantes, seu mecanismo de acção, classes de compostos com este tipo de propriedades e principais fontes naturais, assim como a sua localização geográfica em Moçambique.

Durante o estudo, dá-se atenção aos métodos existentes de pesquisá-los, às dificuldades e desvantagens na aplicação de cada método e ao tipo de equipamento envolvido nas experiências.

A secção experimental está dividida em duas partes:

A primeira inclui a extracção usando os solventes adequados de acordo com a classe de compostos a extrair, realização de cromatografia de camada fina e de coluna de média pressão (MPLC) para acompanhar o processo de trabalho e realização de testes qualitativos de pesquisa de compostos antioxidantes.

Na segunda, criam-se condições óptimas (temperatura e pressão de oxigénio) para a oxidação do ácido linoléico. Fazem-se dois ensaios em branco, aplica-se um antioxidante conhecido a diferentes concentrações para testar a validade do método e por último são aplicados os extractos vegetais para a medição do poder antioxidante dos mesmos.

Faz-se uma análise estatística dos resultados obtidos por comparação de alguns parâmetros.

Com base na interpretação teórica e estatística dos resultados, conclui-se que o método criado é válido para a pesquisa de compostos com propriedades antioxidantes de origem vegetal.

INDICE

	Página
1. Introdução e Objectivos	1
1.1. Mecanismo de oxidação das matérias orgânicas	1
1.2. Função desempenhada pelos antioxidantes	4
1.3. Classificação dos antioxidantes.	6
1.3.1. Classificação segundo o meio	7
1.3.1.1. Antioxidantes sintéticos	7
1.3.1.2. Antioxidantes naturais	8
1.3.2. Classificação segundo a solubilidade	10
1.3.2.1. Antioxidantes hidrosolúveis	10
1.3.2.2. Antioxidantes liposolúveis	11
1.3.2.3. Antioxidantes hidro-liposolúveis	11
1.4. Efeito tóxico dos antioxidantes	11
1.5. Efeito sinérgico	13
1.6. Teoria de oxidação do ácido linoléico	13
2. Metodologia	16
2.1. Desvantagens dos métodos	17
2.2. Critérios para a escolha de um antioxidante	18
2.3. Incorporação dos antioxidantes	18
3. Parte Experimental	20
3.1. Extracção dos fenóis	20
3.2. Identificação dos fenóis nos extractos	20
3.2.1. Testes com cloreto férrico	20
3.2.2. Testes com reagente cérico amoniacal	21
3.2.3. Cromatografia em camada fina	21
3.3. Isolamento dos compostos	22

3.3.1. Adsorção em alumina	22
3.3.2. Cromatografia em coluna de média pressão (MPLC)	22
3.3.3. Isolamento por TLC- preparativa	22
3.4. Criação de condições ótimas de oxidação do ácido linoléico	22
3.4.1. MODELO A-Autoxidação por injeção directa de oxigénio 100°C	24
3.4.2. MODELO B-Autoxidação em CNTP	24
3.4.3. MODELO C-Autoxidação por injeção directa de oxigénio, sem calor	24
3.4.4. MÉTODO DE AUTOXIDAÇÃO-Autoxidação a 40°C	24
3.4.4.1. Aplicação do ácido gálico a diferentes concentrações	24
3.4.5. Medição do poder antioxidante dos extractos vegetais	25
3.4.5.1. Poder antioxidante da Erytrina Huheana	25
3.4.5.2. Poder antioxidante do Eucalipto Camaldulensis	25
3.4.6. Controle do método em óleo alimentar	25
4. Resultados	26
5. Tratamento estatístico dos resultados	38
6. Discussão dos resultados	46
7. Conclusões e recomendações	49
8. Bibliografia	51
Anexo-1 Formulário para o tratamento estatístico dos resultados	ii

Anexo-2- Simbologia	iii
Anexo-3- Tabela de distribuição de t	v
Anexo-4- Cromatogramas	vi
Anexo-5- Glossário	viii

1. Introdução Teórica e Objectivos

Várias matérias orgânicas, quando expostas ao ar, a luz, ou à humidade, depois de um certo tempo verifica-se uma alteração nas suas características organolépticas, elas deterioram-se, pois sofrem oxidação[2]. A maior parte destas matérias é composta de proteínas, carboidratos e principalmente de lípidos e, a maior dificuldade encontrada para a sua conservação está no desenvolvimento da rancidez, que surge como consequência da adição de oxigénio nas duplas ligações dos ácidos gordos insaturados, constituintes comuns dos lípidos, com formação dos chamados **HIDROPERÓXIDOS LÍPIDOS**.

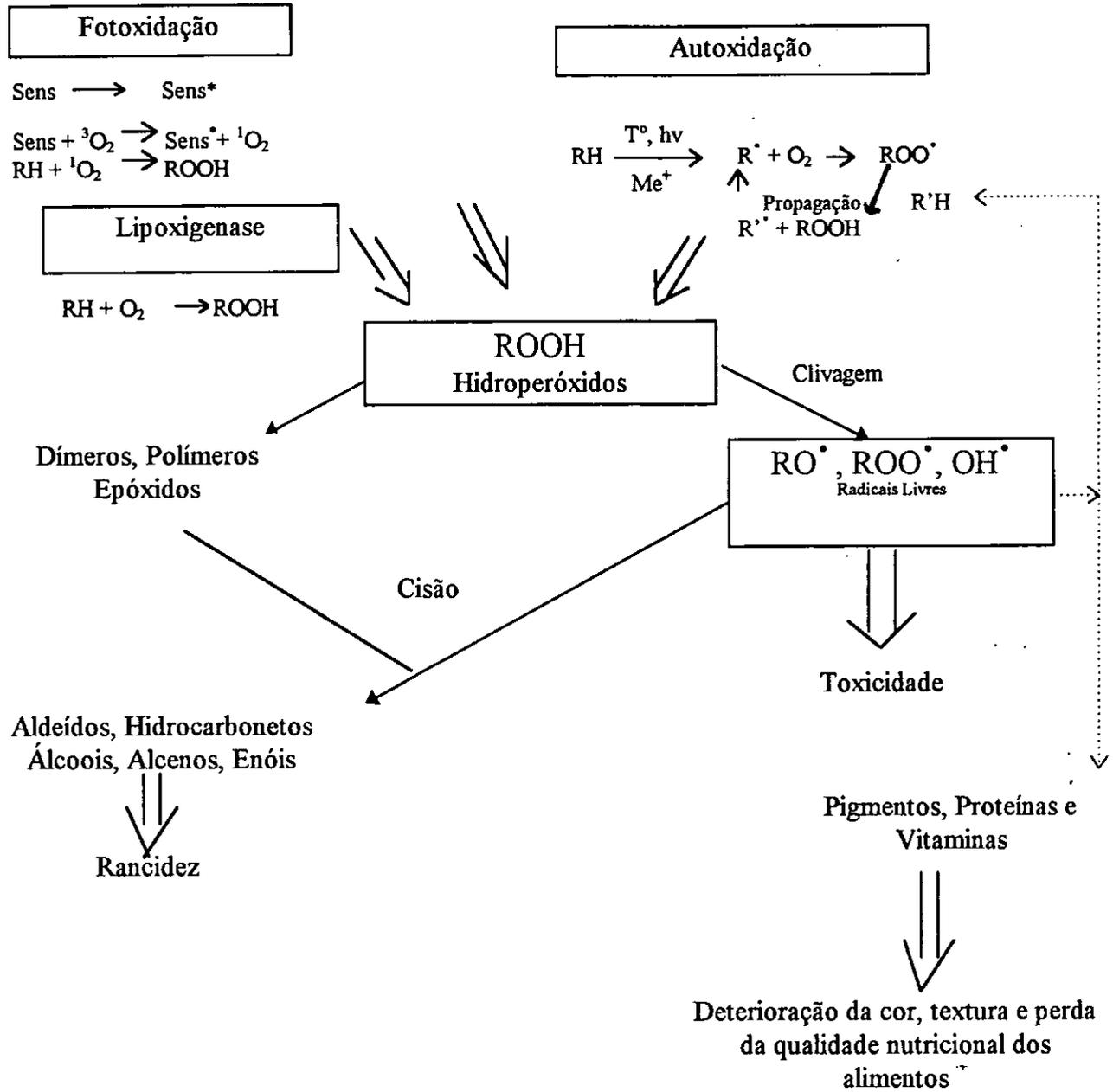
Já há vários anos que na indústria se vêm usando certos aditivos para a preservação das matérias orgânicas desde a borracha, plástico, combustíveis até aos produtos alimentícios. Estes aditivos são designados **ANTIOXIDANTES**[22]. Tem esta designação, qualquer substância que quando presente em baixas concentrações relativamente a um substracto oxidável retarda significativamente a oxidação do mesmo aumentando deste modo o seu tempo de vida.

A nossa membrana celular por possuir lípidos, necessita de antioxidantes como um meio de defesa eficaz contra a rancidez[23], pelo que se pode ver eles são de extrema importância.

1.1. Mecanismo de oxidação das matérias orgânicas

No processo de oxidação, participam como substractos os ácidos gordos insaturados, o oléico, linoléico e linolénico, os constituintes comuns das gorduras[12]. Ela pode ocorrer por qualquer uma das vias apresentadas no esquema, e em qualquer uma delas formam-se hidroperóxidos como produtos principais deste processo de oxidação.

ESQUEMA GERAL DE OXIDAÇÃO



A fotoxidação envolve a reacção entre o substracto e o oxigénio singlete. O oxigénio neste estado é um útil e selectivo oxidante, pode ser preparado fotoquimicamente por passagem de oxigénio através de uma solução contendo um fotosensitizante (sens) e um substracto oxidável. Irradiando a solução, o oxigénio passa para o estado excitado com propriedades diferentes das que continha no estado fundamental. Forma-se o oxigénio singlete. A produção química de oxigénio singlete, faz-se através da reacção entre o peróxido de hidrogénio e o hipoclorito mas, o mecanismo da produção ainda não foi bem esclarecido[11].

Na autoxidação, o substracto é oxidado a elevadas temperaturas na presença de metais ou de um iniciador de oxidação. Na primeira etapa formam-se radicais livres. Na segunda etapa de propagação, o radical livre reage com o oxigénio formando o radical peróxi e, este reage com outra molécula de substracto formando os hidroperóxidos lípidos.

Na terceira etapa de terminação, há recombinação dos radicais para dar produtos inactivos. A etapa de propagação é a mais rápida de todas.

Na presença das enzimas lipoxigenases, estes actuam como catalizadores na reacção entre o substracto e o oxigénio.

Os principais produtos que se formam neste processo, são os hidroperóxidos. São pouco estáveis e podem sofrer vários processos, entre eles a degradação até a formação de radicais livres que por sua vez iniciam uma nova cadeia de reacções, podem sofrer ciclização, polimerização dando dímeros, polímeros e epóxidos. A cisão dos radicais livres com os produtos de polimerização e ciclização forma principalmente compostos de carbonilo.

Alguns dos principais produtos que se formam da degradação dos hidroperóxidos, são os aldeídos. São de baixa percepção, mas responsáveis pela alteração das características organolépticas dos produtos[10], resultam da cisão nas ligações c-c adjacentes ao radical alcóxi e podem produzir-se em dois pontos:

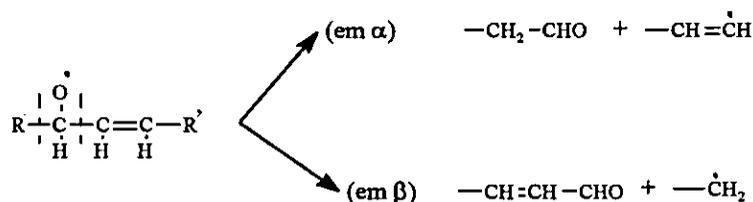


Fig.1-Degradação dos hidroperóxidos

Na posição *alfa*, formam-se aldeídos saturados e o radical vinil. Esta ocorre mesmo a baixas temperaturas. Na posição *beta*, formam-se aldeídos insaturados e um radical alcano e é favorecida por temperaturas elevadas e presença de metais.

1.2 Função desempenhada pelos antioxidantes

Os antioxidantes quando presentes no processo de oxidação das matérias orgânicas, jogam um papel fundamental pois, eles reagem com os radicais livres intermédios, formando produtos menos activos, podem retardar a formação destes radicais e ainda podem concorrer com eles removendo-os da reacção. Um exemplo da actuação de antioxidantes é encontrado no BHT (Butil-hidróxi-tolueno) um antioxidante usado na indústria para a conservação da margarina [18], [16]. Exemplo:

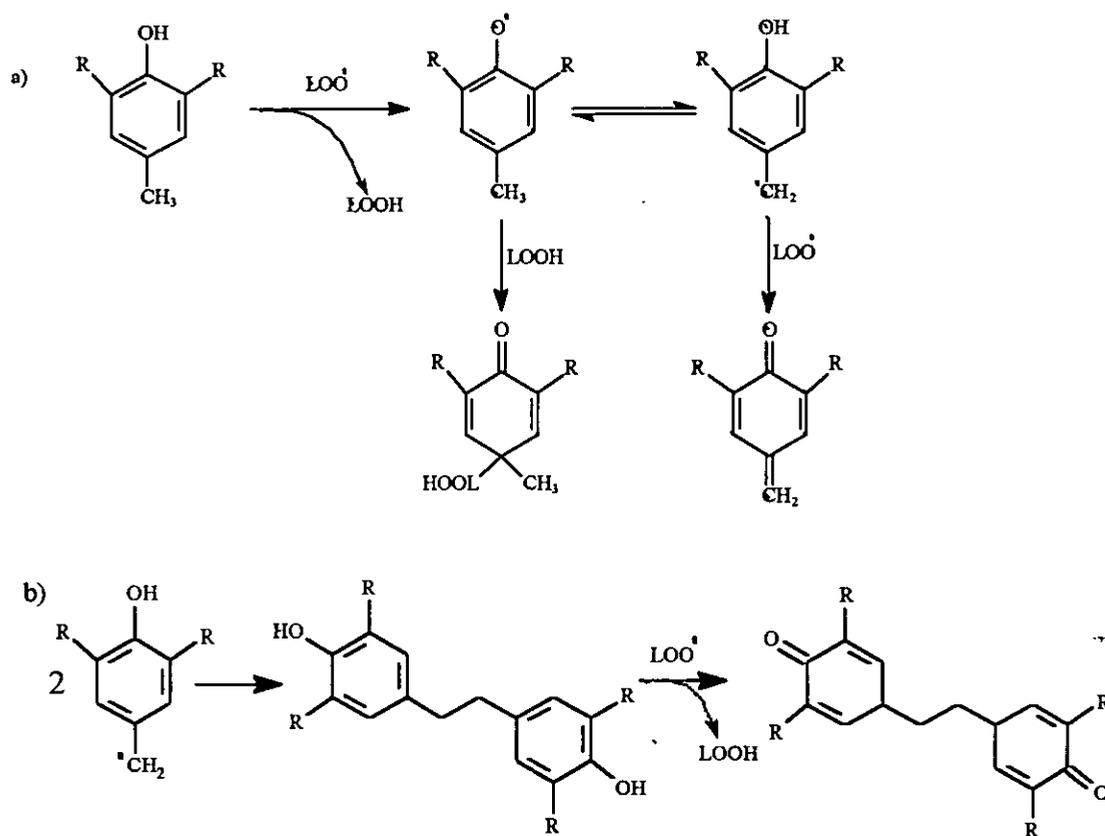


Fig.2- Exemplo de actuação do BHT

Fazendo uma análise destas reacções verifica-se o seguinte:

O radical peróxi retira um átomo de hidrogénio ao BHT formando-se a partir deste último, radicais de ressonância estabilizada. Estes reagem tanto com os hidroperóxidos assim como com os radicais livres formando produtos inactivos.

Um outro processo que pode ocorrer é a polimerização de um radical do antioxidante formando um produto que é atacado pelo radical peróxi resultando em produtos inactivos.

Os antioxidantes aumentam o tempo de vida das matérias orgânicas mas, não bloqueiam definitivamente o processo de oxidação das mesmas. Verifica-se uma variação nas concentrações relativas dos antioxidantes, dos hidroperóxidos e dos compostos de carbonilo no decurso de oxidação dos ácidos gordos insaturados[3]. O diagrama seguinte ilustra a variação das concentrações das espécies no processo de oxidação.

Varição das concentrações das espécies com o tempo

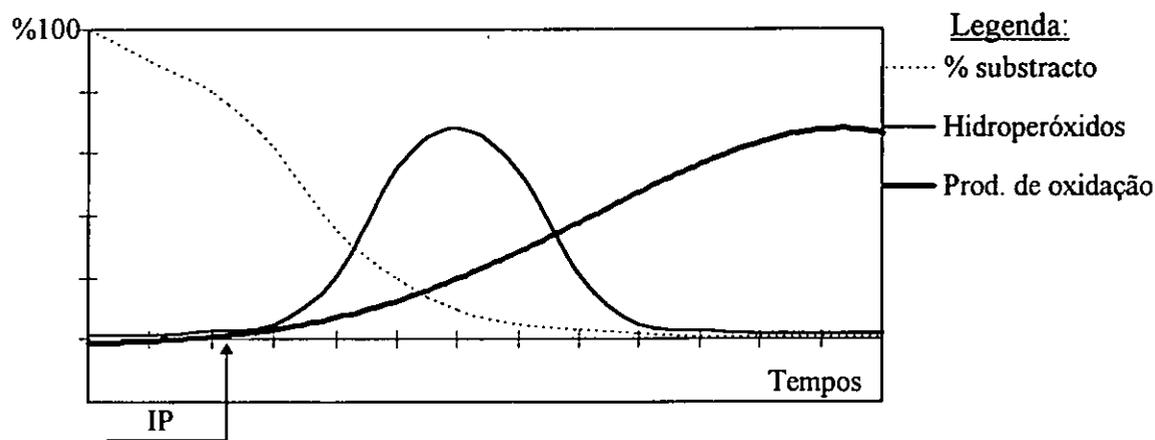


Fig.3- Variação da concentração das espécies com o tempo

A concentração do substracto diminui com o tempo e quando ela tende a zero, tem-se uma concentração maior dos hidroperóxidos e que com o tempo esta diminui aumentando a dos compostos de carbonilo.

Um antioxidante quando presente espera-se que:

- Seja eficaz à baixas concentrações (evitando um eventual efeito prooxidante);
- Haja compatibilidade ou ausência de gosto, odor e cor;
- A sua actividade seja persistente no decurso de tratamentos tecnológicos e de conservação;
- Seja fácil de incorporar;
- Tenha baixos custos;
- Não seja tóxico e tenha autorização legal;
- Seja aceite pelos consumidores.

Um antioxidante apresenta algumas limitações, tais como a falta de capacidade de suprimir alterações hidrolíticas já presentes na matéria gorda devido a acção das lipases e poder de paralisar um processo de oxidação que já tenha iniciado pois, ele é irreversível. Daí a importância de utilizar matérias primas de boa qualidade e introduzir o antioxidante o mais cedo possível no decurso da fabricação para garantia da sua eficácia.

1.3. Classificação dos antioxidantes

De uma forma geral os principais antioxidantes são compostos fenólicos[14]. O seu poder antioxidante explica-se pelo facto desta classe de compostos possuir um átomo de hidrogénio activo e que após a sua retirada formam-se radicais de ressonância estabilizada. Esta estabilização contribue para a formação de compostos não radicalares na reacção entre um antioxidante e um radical livre intermédio.

Os antioxidantes são classificados segundo o meio em que se encontram e segundo a sua solubilidade.

1.3.1 Classificação segundo o meio

1.3.1.1. Antioxidantes comerciais ou sintéticos

São designados de sintéticos os que são adicionados na matéria prima ou no decurso de fabricação de um dado produto. Alguns dos mais usados são a seguir descritos[8]:

QUADRO 1

NOME DO ADITIVO	ALIMENTOS EM QUE PODE SER TOLERADO	LIMITE MÁXIMO (%)
BHA (Butil hidroxi anisole)	Farinhas, margarinas, óleos, produtos de cacau	0,01
BHT (Butil hidroxi tolueno)	Margarinas, leite de côco, produtos de cacau.	0,01
NDGA (Ácido nordihidroxi guiarético)	Óleos, margarinas, produtos de cacau.	0,01
Ácido cítrico	Margarinas	0,01
	Gorduras	0,01
	Conservas de pescados	0,20
	Conservas vegetais	0,20
	Licores artificiais	0,20
	Mayoneses	0,10
Ácido Ascórbico	Cervejas	0,20
	Conservas de carne	0,20
	Refrescos e refrigerantes	0,03

1.3.1.2. Antioxidantes Naturais

São chamados de naturais os que se encontram naturalmente presentes na matéria prima, como no caso dos tocoferóis nos óleos vegetais. Podem ser enquadrados nesta categoria, os que se formam no decurso da fabricação de um dado produto como é o caso dos produtos de formação de Millard (reação entre um amino-ácido e um açúcar).

De entre os antioxidantes naturais, destacam-se as classes a seguir apresentadas:

QUADRO 2

CLASSE DE COMPOSTOS	PRINCIPAIS FONTES NATURAIS
Alcalóides	Thea sinensis, Coffea Arabica, Lupinus Albus, Berberis Himalaya
Flavanóides	Vicia faba, Arachis hipogea, Quercus rubra, Digitalis Purpurea, Oxiria Digyna
Outros fenóis	Rosmarinus Officinalis, Curcuma longa, Sesamu indicum
Compostos miscelaneos	Eucaliptus Leucoxylon, Plantago Asiática.
Acidos fenólicos	Plalaris Canariensis

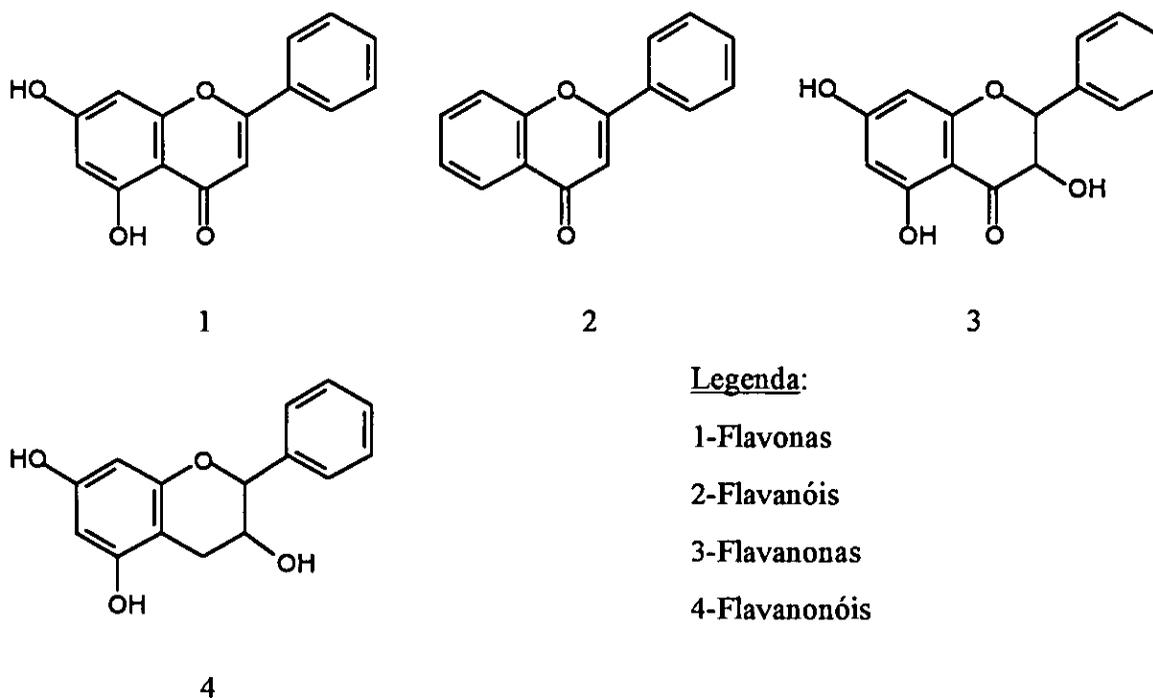
A maior parte das plantas apresentadas no quadro 2 podem ser encontradas no sul de Moçambique[6].

QUADRO 3

NOME CIENTIFICO	NOME VULGAR	LOCALIZAÇÃO	DESCRIÇÃO
Lupinus Albus	Tremoço	Sul do Save; Posto de culturas regadas no vale do Limpopo.	Flores levemente rosadas.
Thea sinensis	Chá	Sul do save; Namaacha, à direita da estrada da cascata	Arbusto isolado de folhas verdes
Arachis hipogea	Amendoim bebiano	Namaacha	Amendoim pequeno esbranquiçado ou avermelhado
Vicia faba	Faveira	Sul do save, Umbeluzi	Cultivado próximo ao viveiro de citrinos
Sesamo indicum	Chimangana	Sul do save; Namaacha; base do monte ponduine	Flores rosadas; junto a terrenos de amendoim
Curcuma longa	Safrão	Marracuene, Mahotas	Planta cultivada
Eucaliptus Leucoxylon	Eucalipto	Namaacha	Troncos cinzento escuro com frutos pequenos.

De entre as classes de compostos apresentadas no quadro 2, a dos flavanóides é a mais importante. Estas encontram-se em muitas plantas superiores, protegem os vegetais contra a intensidade dos relâmpagos, são desactivadores do oxigénio singlete, inibidores de várias enzimas, entre elas as lipoxigenases, e podem agir directamente sobre radicais livres oxigenados. São considerados antioxidantes potenciais[13].

Existem diferentes classes de flavanóides:



Legenda:

- 1-Flavonas
- 2-Flavanóis
- 3-Flavanonas
- 4-Flavanonóis

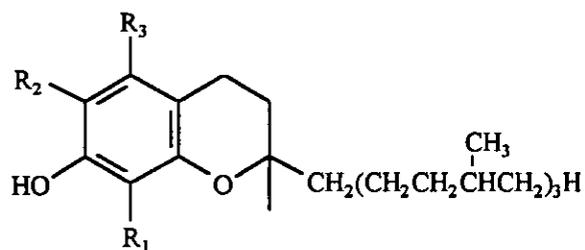
Fig.4- Classes de Flavanóides

Outro grupo importante é o dos tocoferóis (vit.E)[4]. Encontram-se nas plantas e nos tecidos dos mamíferos.

A sua maior acção baseia-se na sua actividade vitamínica E, que consiste em proteger a integridade das estruturas membranares ameaçadas pela presença de radicais livres que atacam os fosfolípidos. A sua acção é reforçada pelos agentes quelatantes como o ácido ascorbil ou, redutores como o palmitato de ascorbil.

Esta classe de compostos difere no número e na posição dos grupos metil no anel aromático.

Estrutura:



Composto	R ₁	R ₂	R ₃
α - Tocoferol	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β - Tocoferol	CH ₃	H	CH ₃
γ - Tocoferol	H	CH ₃	CH ₃
δ - Tocoferol	H	H	CH ₃

Fig.5- Estrutura dos Tocoferóis

De entre eles, o α-T é considerado o mais biologicamente activo.

Existem compostos não fenólicos que têm capacidade antioxidante, os mais conhecidos são:

Ácido ascórbico - Tem a capacidade de regenerar os antioxidantes primários.

Ácido cítrico - Age como quelatante dos metais de transição e muitas vezes regenera a actividade da vitamina E.

1.3.2. Classificação segundo a solubilidade

1.3.2.1. Antioxidantes hidrosolúveis

Esta classe de antioxidantes é solúvel em água, sendo por isso mais usada em soluções aquosas. Os mais conhecidos são:

- Vitamina C
- Manitol
- Sorbitol
- EDTA (quelatante dos metais de transição)

1.3.2.2. Antioxidantes lipossolúveis

Estes, têm a capacidade de produzir radicais fenóxi, resultantes da reacção entre o protector fenólico e o radical livre. São estáveis (estabilização por ressonância) ou são mantidos em estado radicalar por redutores como a vitamina C. Mas, existe uma possibilidade de reacção destes radicais com os substratos aos quais protegem, provocando um efeito próoxidante. São solúveis em gorduras.

Os mais conhecidos são:

- Tocoferóis (vit. E)
- BHT
- BHA
- Galato de propil
- Caroteno

1.3.2.3. Antioxidantes hidro-lipossolúveis

São solúveis em água e em gorduras.

Têm este poder de solubilidade os polifenóis e, o seu efeito é comparável ao dos antioxidantes lipossolúveis fenólicos. São capazes de produzir radicais fenóxi.

Os flavanóides pertencem a esta categoria.

1.4. Efeito tóxico dos antioxidantes

Os antioxidantes têm os seus efeitos negativos quando usados fora dos limites máximos estabelecidos[7].

A vitamina C, tem a dose máxima de 45mg/dia para um adulto e, doses excessivas podem causar efeitos diabéticos e ainda, podem surgir danos a nível intestinal.

A vitamina E. é recomendada em doses de 15mg/dia e, em doses que variam de 100 á 3000mg/dia por via oral, para um adulto de 70kg. Doses elevadas podem causar vários efeitos negativos e, podem causar morte.

Para o BHT e BHA, as doses recomendadas por via oral são de 0,125mg/dia e 0,5mg/dia respectivamente.

Doses excessivas de BHA podem provocar câncer de estômago. O efeito carcinogénico de BHA é reforçado pela vitamina C.

O efeito tóxico dos flavanóides é baixo comparativamente a de outros antioxidantes.

1.5. Efeito sinérgico

Há determinados antioxidantes que possuem um efeito antioxidante baixo mas, em combinação com outros, verifica-se um aumento considerável do seu efeito protector. Este fenómeno é denominado sinérgico[17]. Os tocoferóis, o BHT e o BHA têm contribuído no aumento do poder antioxidante de outros compostos.

O mecanismo de sinérgico depende sobretudo da natureza do composto sinérgico, do antioxidante e do substrato. Um exemplo deste efeito é o das quinonas com o ácido ascórbico. Na presença deste último, a quinona é reduzida à semi-quinona e a actividade deste, cria estabilidade nas moléculas da gordura.

Um outro exemplo é encontrado num extracto da batata doce, que tem um efeito antioxidante reduzido quando só em ácido linoléico mas, em combinação com uma mistura de cinco amino-ácidos observa-se um aumento significativo do efeito protector.

1.6. Teoria de oxidação do ácido linoléico

Estrutura:

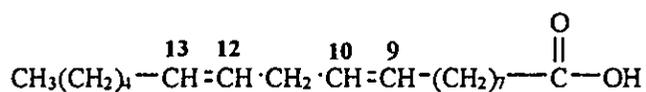


Fig.6- Estrutura do ácido linoléico

PM:280gr/mol

O ácido linoléico é um dos ácidos graxos insaturados obtido por hidrólise de gorduras e óleos. Contém dezoito átomos de carbono e as suas ligações olefinicas têm a configuração *cis*[21].

Possui um grupo metileno a intercalar as duas ligações duplas, o que faz com que a sua velocidade de oxidação seja maior que a dos sistemas que contêm apenas uma ligação dupla.

Numa etapa inicial de oxidação, todo oxigénio absorvido transforma este ácido num hidroperóxido e a sua saturação original não é afectada[19].

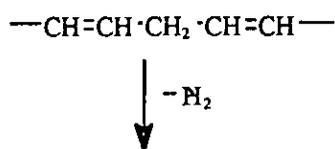
A oxidação do ácido linoléico e de outros dienos 1,4 tem um número de peculiaridades que merecem discussão:

- Inicialmente dá hidroperóxidos em altos rendimentos, mas estes podem subsequentemente atacar a dupla ligação de outras moléculas por processos polar radicalares. Como resultado de prolongada oxidação, pode formar-se uma mistura complexa de produtos muitas vezes contendo vários resíduos de olefinas por molécula em adição do hidroperóxido. Tais reacções são aparentemente a base da formação de películas ou membranas insolúveis na autoxidação de óleos e tintas.

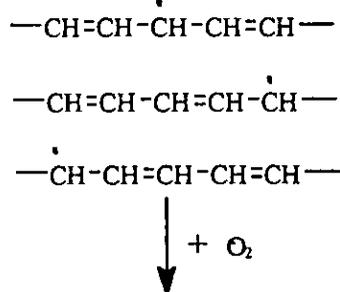
- O radical intermédio alílico, por ser um híbrido de duas estruturas, pode adicionar oxigénio nas duas extremidades da cadeia do seu sistema electrónico e conduzir a uma mistura de produtos[9].

A oxidação do ácido linoléico pode ocorrer segundo o mecanismo seguinte:

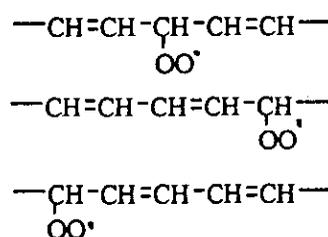
1- Subtracção do átomo de hidrogénio



2- Formação de radicais livres (híbridos de ressonância)



3- Formação de três radicais peroxi



4- Formação de três hidroperóxidos , dois dos quais são conjugados

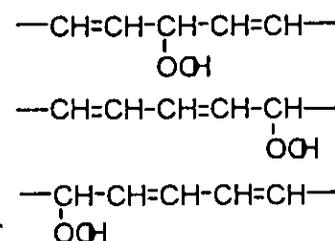


Fig.7- Mecanismo de oxidação do ácido linoléico

4 - A solubilidade do iodo em água é fraca. Deve-se usar excesso de iodeto de potássio. Tal facto, favorece a dissolução do iodo que se liberta durante a reacção, formando com o iodeto um sal completo e instável.

5 - A reacção entre a amostra e o iodeto deve ser realizada no escuro, pelo facto de a luz acelerar a reacção secundária de oxidação de iodeto pelo oxigénio do ar.

2. Metodologia

Existem vários métodos que tentam interligar os processos químicos e físicos decorrentes na degradação dos ácidos gordos insaturados com a alteração da qualidade organolética dos produtos. Há diferença entre as medições práticas sobre o próprio produto nas condições normais de envelhecimento do mesmo, e os testes acelerados destinados a avaliar o comportamento da matéria gorda ou do antioxidante. Para este último caso, o produto é submetido a uma oxidação a temperaturas relativamente elevadas. Este processo pode conduzir a duas grandes desvantagens:

1 - Põe-se em jogo o mecanismo reaccional e os produtos formados podem ser diferentes.

2 - Há antioxidantes que não resistem a altas temperaturas ou são voláteis, podendo obter-se resultados inferiores aos reais.

Não existe um sistema de envelhecimento acelerado que seja ideal, o importante é que cada teste seja adaptado ao tipo de meio e se aproxime tanto quanto possível das condições nas quais se conservam os produtos.

As condições válidas da estabilidade dos sistemas lipídicos ou da eficácia de um antioxidante são obtidos a 40-60°C. O grau de eficácia de um antioxidante deve ser determinado por vários métodos que permitam medir os produtos iniciais e os finais, na presença de um iniciador de radicais, sendo os compostos azóicos os mais usados (exemplo: AIBN-Azo-Izo-Butil-Nitrilo) e outros que necessitam de pouca energia para se decompor em radicais.

Os principais métodos são:

1. Índice de hidroperóxidos - Iodometria

Consiste na reação entre os hidroperóxidos produzidos com o iodeto. O teor em hidroperóxidos pode ser determinado por titulação do iodo que se liberta com o tiosulfato de sódio.

2. Medição do oxigénio consumido - Polarografia

O oxigénio consumido pode ser determinado pelo eléctrodo de Clark.

3. Extração dos ácidos gordos residuais - Cromatografia de gás

A redução na concentração dos ácidos gordos pode ser medida por HPLC, ou após uma modificação química por GC. O método requer uma hidrólise inicial para a libertação dos ácidos gordos.

4. Determinação dos dienos conjugados - Espectrofotometria

A oxidação conduz à formação de dienos conjugados que absorvem a radiação UV na região 230-235nm. A concentração do dieno pode ser determinada espectrofotometricamente, preferivelmente após uma separação sobre HPLC.

5. Doseamento dos compostos voláteis - Conductimetria

Os ácidos voláteis resultantes da oxidação podem ser determinados por conductimetria.

6. Teste com o TBA - Espectrofotometria

Um dos aldeídos que se forma durante a oxidação é o aldeído malónico e que, por ser instável encontra-se na forma enólica, sendo este último que reage com o ácido tiobarbitúrico resultando na formação de um complexo corado que absorve a 532nm.

2.1. Desvantagens dos métodos

De uma forma geral, os métodos descritos são aplicáveis, mas têm as suas desvantagens:

- Nos métodos espectrofotométricos muitas vezes registam-se interferências.
- Os hidroperóxidos que se formam no primeiro método são instáveis e decompõem-se com calor.

- O segundo método é válido na ausência de reacções paralelas que também consomem oxigénio.
- O terceiro método é desvantajoso pelo facto de existirem dificuldades para a realização de uma extracção quantitativa.
- Para realizar o doseamento de compostos voláteis é necessário que a oxidação seja forte.

2.2. Critérios para a escolha de um antioxidante

A escolha de um antioxidante deve ser feita segundo alguns critérios[5]:

- 1 - Origem: Natural ou sintético
- 2 - Custo
- 3 - Natureza: Puro ou misturado
- 4 - Aplicações: Na alimentação humana, animal e em cosméticos
- 5 - Meio: Líquido, sólido ou emulsão
- 6 - Eficácia: Termoresistência, persistência na actividade, no decurso de tratamentos tecnológicos e na conservação. A eficácia deve ser testada por métodos de envelhecimento ou oxidação acelerada e medida por testes reais validando a escolha do antioxidante.

2.3. Incorporação dos antioxidantes

Para a incorporação de um antioxidante deve se ter em conta a sua solubilidade no substrato ao qual irá proteger. Os métodos de incorporação dependem do procedimento de fabricação, que por sua vez diferem segundo se trate de substâncias aromatizantes, de carnes, de alimentos desidratados ou de produtos do mar.

A incorporação pode ser feita por:

- Adição directa na matéria gorda.
- Disperção numa mistura de condimentos.
- Pulverização

- Dispersão numa solução aquosa (P.ex.:solução de polifosfatos)
- Injecção no produto.
- Adição na fase aquosa antes da emulsão.

O antioxidante deve ser introduzido o mais cedo possível, antes do tratamento térmico.

Objectivos

Como objectivos principais do trabalho, pretende-se:

- Criar um método simples de pesquisa de compostos com propriedades antioxidantes de origem vegetal
- Extraír e separar os compostos fenólicos nas plantas;
- Testar o poder antioxidante de extractos vegetais;
- Comparar o poder antioxidante dos extractos com o de um antioxidante conhecido.

3. Parte Experimental

3.1 Extração dos fenóis

Material necessário:

- Banho- Maria
- Balança analítica
- Balão de uma boca com a capacidade de 250ml

Descrição: Pesa-se a planta seca e devidamente triturada, mistura-se com metanol na proporção de 1gr para 10ml de metanol. Aquece-se esta mistura durante 5mn a uma temperatura de 60°C, em seguida filtra-se. Repete-se esta operação até que se obtenha um filtrado límpido.

Esta técnica é simples e rápida, é usada na extração de flavanóides em plantas superiores (compostos que se relacionam estruturalmente com muitos fenóis) e, extrai tanto os compostos lipofílicos assim como os hidrofílicos.

3.2. Identificação dos fenóis nos extractos vegetais

Para a identificação de compostos fenólicos, inicialmente concentram-se os extractos até um volume tal que permita a obtenção de resultados bem nítidos, i.e. até volumes reduzidos. São usadas soluções de cloreto férrico (1-5%) em diferentes meios e de reagente cérico amoniacal também em diferentes meios[15].

3.2.1. Identificação com cloreto férrico em :

- Água
- Álcool
- Ácido clorídrico (0,5N)
- Piridina e clorofórmio

A autoxidação do linoleato de metil a 0°C, conduz à formação de 90% de hidroperóxidos *cis-trans* octadecadienoato. A temperaturas elevadas, uma quantidade considerável de hidroperóxidos encontra-se exclusivamente na forma *trans*.

Na autoxidação de substâncias insaturadas, o periodo de indução é o tempo inicial durante o qual não ocorre uma oxidação apreciável e durante o qual não existe uma acumulação rápida de hidroperóxidos.

Para o doseamento de hidroperóxidos, usa-se a iodometria baseada na reacção entre o hidroperóxido que se forma durante a oxidação e o iodeto. A química desta reacção ainda não é perfeitamente conhecida. Os iões iodeto reduzem os hidroperóxidos. O esquema do doseamento iodométrico é o seguinte[1]:

a) $KI + \text{ácido em excesso} + \text{Amostra a dosear} \rightarrow \text{Aparição de } I_2 \text{ em repouso}$

b) $I_2 + 2 Na_2S_2O_3 \rightarrow 2 NaI + Na_2S_4O_6$

Durante os doseamentos iodométricos, deve-se tomar em conta alguns aspectos importantes:

1 - O potencial do par conjugado I_2/I^- não é elevado, por isso muitas reacções são reversíveis, só criando condições convenientes é que se consegue que as reacções sejam completas.

2 - O iodo é uma substância volátil, efectua-se a titulação a frio. Esta condição é indispensável, pois se a temperatura for elevada, a sensibilidade do amido como indicador diminui.

3 - É impossível efectuar uma titulação iodométrica em meio fortemente alcalino, pois o iodo reage com bases formando iões hipiodito e estes, são oxidantes mais fortes que o iodeto e tendem a oxidar parcialmente os iões tiosulfato, transformando-os em iões sulfato. Quanto maior for a quantidade de iões hidroxí no meio, maior será a quantidade de iões tiosulfato que se transformarão em iões sulfato. O cálculo rigoroso do resultado da análise é impossível, devido a esta reacção secundária. Deve-se, por isso, evitar que o pH ultrapasse o valor 9.

3.2.2. Identificação com reagente cérico-amoniaco (Hexanitratato cerato(4) de amónio) em:

- Água (substâncias solúveis em água)
- Dioxano (substâncias insolúveis em água)

3.2.3. Cromatografia em camada fina (TLC)

A TLC, é realizada sobre uma placa fina, que pode ser de alumínio ou de vidro, e é revestida de sílica gel que serve de adsorvente.

Usa-se um eluente para separar os constituintes de uma dada substância e, a eluição ocorre numa câmara fechada e saturada com mesmo eluente.

O objectivo principal da TLC é separar, identificar e isolar componentes das substâncias.

Faz-se uma TLC aos extractos que deram teste positivo nos testes de fenóis nas seguintes condições:

Fase móvel:

- 1 - Tolueno/Metanol/Ácido acético (45:8:4)
- 2 - Tolueno/Dioxano/Ácido acético (90:25:4)
- 3 - Tolueno/Clorofórmio/Acetona (40:25:35)
- 4 - Tolueno
- 5 - Tolueno/Metanol (95:5)

Fase estacionária: Placas de alumínio revestidas de sílica gel

Reveladores: Vapores de iodo e vanilina/ácido sulfúrico

3.3. Isolamento dos compostos

3.3.1. Adsorção em alumina

Faz-se a adsorção da amostra em alumina na proporção de 1:3 (alumina 90; 0,063 - 0,200mm; 70-230 mesh) seguida de uma secagem sob vácuo e por uma extracção sucessiva com n-hexano, clorofórmio e acetona e faz-se o teste de fenóis nestas fracções.

3.3.2. Cromatografia em coluna de média pressão (MPLC)

Fase estacionária: Sílica gel 60, 70-230 mesh, 0,063 - 0,200mm, numa coluna de vidro com uma altura aproximadamente de 7cm.

Fase móvel: Metanol/Tolueno

Preparação da amostra: Mistura-se a amostra com sílica gel 60, 230-400 mesh na proporção de 1:3. Esta mistura é introduzida no topo da coluna.

3.3.3. Isolamento por TLC - preparativa

Fase estacionária: Placas de vidro revestidas de sílica gel 60; 230-400 mesh.

Fase móvel: Clorofórmio/Metanol/Ácido acético (70:30 +20 gotas).

Revelador: Vanilina/ácido sulfúrico

3.4. Criação de condições óptimas para a oxidação do ácido linoléico

Solução reaccional: Ácido linoléico (substrato oxidável), 1,1 di-fenil-2-picril hidrazil (DPPH), como iniciador de oxidação e carbonato de sódio a 2%.

Procedimento para a autoxidação do ácido linoléico

Aparelho: Balão de três bocas com agitador, refrigerante de refluxo, tubo de injeção de oxigénio e frasco lavador de segurança munido de uma placa filtrante.

Aquece-se em banho -Maria uma mistura de 1 mol de ácido linoléico, 350ml de uma solução aquosa de carbonato de sódio a 2% e 10ml de uma solução alcoólica de iniciador de oxidação (DPPH), injectando na solução uma corrente de oxigénio.

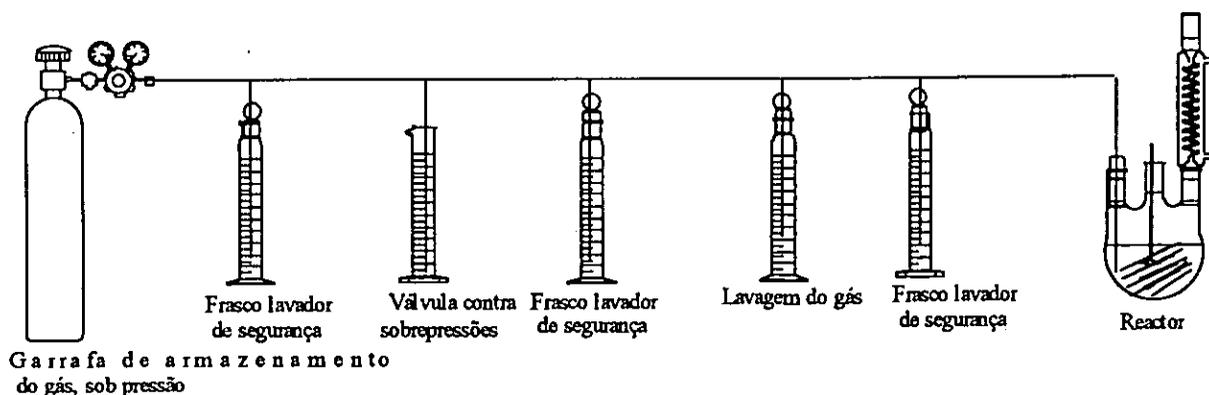


Fig. 8- Montagem para a introdução de gás oxigénio no reactor

Determinação do teor em hidroperóxidos

O doseamento de hidroperóxidos é feito de hora em hora procedendo-se da forma seguinte: Retiram-se cerca de 2ml da solução reaccional, juntam-se-lhe 2gr de cloreto de sódio e separa-se a fase orgânica. Desta retira-se uma toma de 0,2 a 1gr para um balão de erlenmeyer com rolha esmerilada.

Adicionam-se 10ml de clorofórmio, 15ml de ácido acético glacial e 1ml de uma solução saturada de iodeto de potássio. Deixa-se em repouso por cinco minutos no escuro. Passado este tempo, adicionam-se 70ml de água e agita-se fortemente. O iodo libertado é titulado com uma solução de tiosulfato de sódio a 0,01N usando o amido como indicador.

A percentagem em hidroperóxidos é calculada segundo a fórmula:

$$\%Hp = \frac{Na_2S_2O_3 \text{ gasto (ml)} \times \text{Peso molecular do hidroperóxido}}{\text{Toma (gr)} \times 200}$$

3.4.1 MODELO A - Autoxidação por injeção directa de oxigénio a 100°C

Procede-se à autoxidação do ácido linoléico a 100°C injectando na solução uma corrente forte de oxigénio.

3.4.2. MODELO B.- Autoxidação em condições normais de temperatura e pressão (CNTP)

Prepara-se uma solução reaccional num copo de precipitação e deixa-se exposta ao ar livre. A autoxidação ocorre em condições normais de temperatura e pressão.

3.4.3. MODELO C- Autoxidação por injeção directa de oxigénio a temperatura ambiente

Procede-se à autoxidação do ácido linoléico injectando na solução uma corrente fraca de oxigénio sem aquecimento.

3.4.4. Método de autoxidação- Injeção directa de oxigénio a 40°C

Com base nos resultados obtidos nos modelos atrás descritos, procede-se à autoxidação do ácido linoléico a 40°C injectando na solução reaccional uma corrente fraca de oxigénio.

São realizados dois ensaios, doseando-se os hidroperóxidos produzidos com base em iodometria, num periodo de cinco a seis horas.

3.4.4.1. Aplicação do ácido gálico a diferentes concentrações

O ácido gálico é um composto com poder antioxidante, não dissolve completamente em gorduras, mas dissolve o suficiente para exercer um bom efeito protector.

Prepara-se uma solução aquosa de ácido gálico nas seguintes concentrações:

- 0,06%

- 1%

Prepara-se uma solução reaccional, adiciona-se-lhe 1 a 2ml de uma solução aquosa de ácido gálico nas concentrações atrás referidas e procede-se à autoxidação doseando-se os hidroperóxidos produzidos com base em iodometria.

3.4.5. Medição do poder antioxidante dos extractos vegetais

Determina-se a concentração aproximada do extracto da planta e, a partir desta, prepara-se uma solução metanólica ou, aquosa a 0,06% ou a 1%.

3.4.5.1. Determinação do poder antioxidante duma solução metanólica de raízes da *Erythrina Huheana*

De uma solução metanólica de raízes da *Erythrina* a 0,06%, retiram-se 2ml que são adicionados à solução reaccional e procede-se à autoxidação.

3.4.5.2. Determinação do poder antioxidante dos hidrolatos das folhas de *Eucalypto Camaldulensis*.

De uma solução aquosa de folhas de *Eucalypto* a 0,06%, retiram-se 2ml que são adicionados à solução reaccional e procede-se à autoxidação.

3.4.6. Controle do método em óleo alimentar

Solução reaccional: 15ml de óleo de cozinha, 0,5ml de DPPH e 20ml de carbonato de sódio a 2%.

- Realiza-se a oxidação a 89°C.

Fazem-se dois ensaios em branco e um introduzindo no meio 2ml de extracto de *Erythrina* a 0,06%.

4. Resultados

Os resultados da primeira fase da parte experimental, que é a fase do isolamento dos compostos fenólicos, onde são aplicadas algumas técnicas como a TLC, MPLC e adsorção em alumina, acompanhadas por testes com o cloreto férrico e reagente cérico amoniacal, vêm apresentados na forma de fluxograma.

A segunda fase contempla os ensaios realizados para o estabelecimento de condições óptimas para a oxidação do ácido linoléico, os ensaios realizados depois do estabelecimento do método e os que foram realizados com o óleo alimentar. Os resultados vêm apresentados em tabelas.

1. Extracção de compostos fenólicos

a) Quantidade de planta pesada e concentração do extracto

Para o calculo da concentração do extracto, parte-se do volume total do extracto onde se retira 1ml, evapora-se à secura num cadinho de porcelana seco na estufa e pesado até peso constante. Depois da evaporação, arrefece-se o cadinho e pesa-se novamente.

Calcula-se a diferença entre o peso do cadinho com o extracto evaporado e, o peso do cadinho vazio, que será igual à quantidade de substância dissovida em 1ml de extracto, e que corresponde à concentração do extracto, expresso em gramas por mililitro de extracto.

TABELA 1

Planta (nome)	Massa (gr)	Volume total (ml)	Concentração (gr/ml)
Folhas de Ipomoea Carnea	5,0004	213	0,0018
Raizes de Spyrostachis Africanus	5,0030	130	0,0023
Raizes de Ipomoea Carnea	5,0022	103	0,0090
Raizes de Solanum Sondomeum	5,6081	124	0,0183
Raizes de Eythrina Huheana	5,1647	112	0,0051
Folhas de Eucalipto Camaldulensis	Mais que 5	50	0,0149

b) Padrões preparados em metanol a uma concentração de 0,05%

Padrão-1 (P₁)- Fenol

Padrão-2 (P₂)- P-Cresol

Padrão-3 (P₃)- Resorcinol

Padrão-4 (P₄)- Catecol

2. Identificação de fenóis

TABELA 2

Amostra	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Folhas de Ipomoea Camea	negat.	negat.	negat.	negat.	negat.	negat.
Raízes Spyrostachi Africanus	negat.	negat.	negat.	negat.	negat.	negat.
Raízes de Ipomoea Camea	negat.	negat.	negat.	negat.	negat.	negat.
Raízes de Solanum Sodemeu	negat.	negat.	negat.	negat.	negat.	negat.
Raízes de Erytrina Huheana	posit.	posit.	posit.	negat.	posit.	posit.
Folhas de Eucalipto Camaldulensis	posit.	posit.	posit.	negat.	posit.	posit.
P ₁	posit.	posit.	posit.	negat.	posit.	negat.
P ₂	posit.	posit.	posit.	negat.	posit.	negat.
P ₃	preto	posit.	posit.	negat.	posit.	negat.
P ₄	preto	posit.	posit.	negat.	posit.	negat.

Sendo: R₁ - FeCl₃(2%) em HCl (0,5N)

R₂ - FeCl₃(1%) em álcool

R₃ - FeCl₃(5%) em água

R₄ - FeCl₃(5%) + Piridina + Clorofórmio

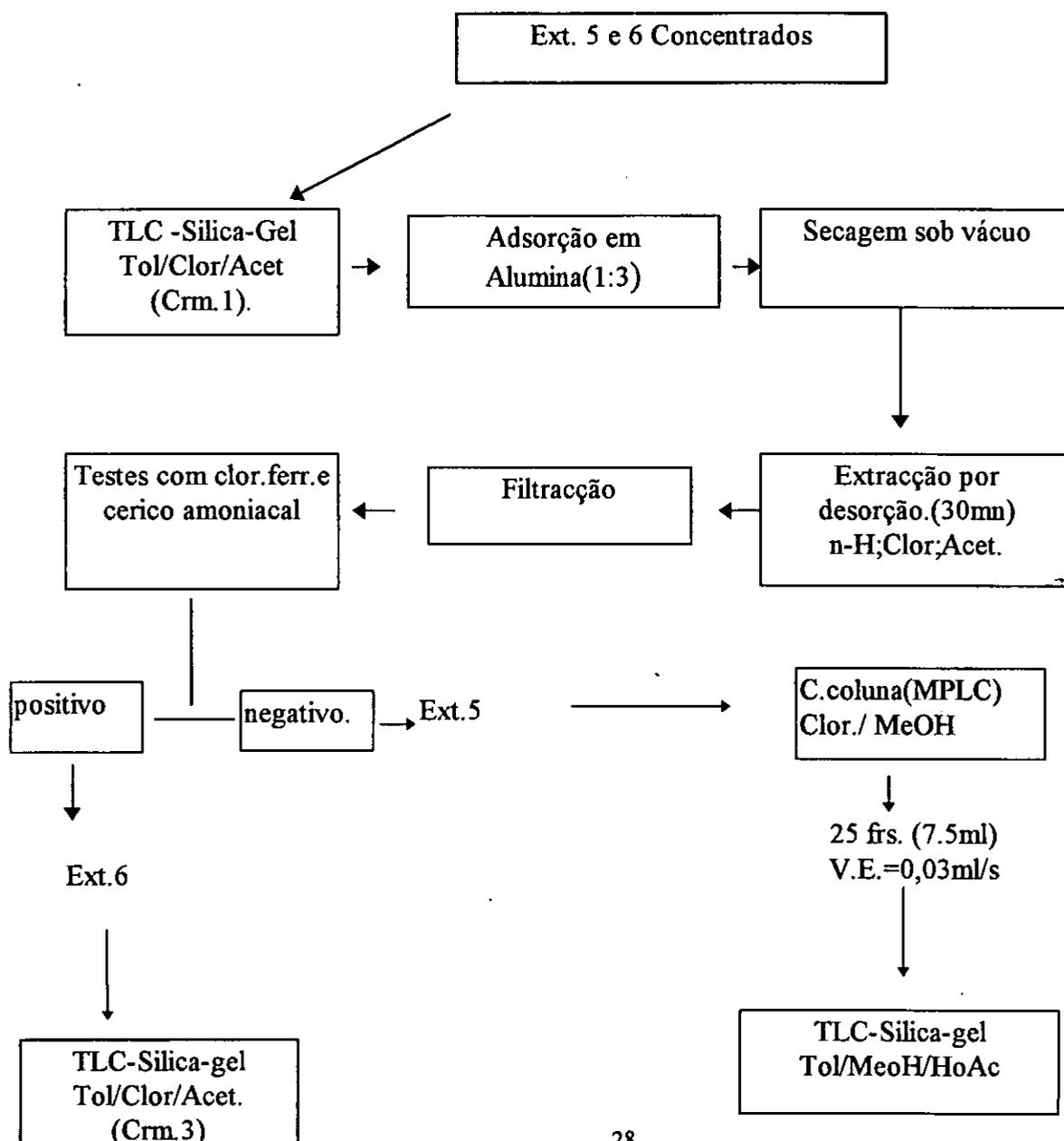
R₅ . Reagente cérico amoniacal em água

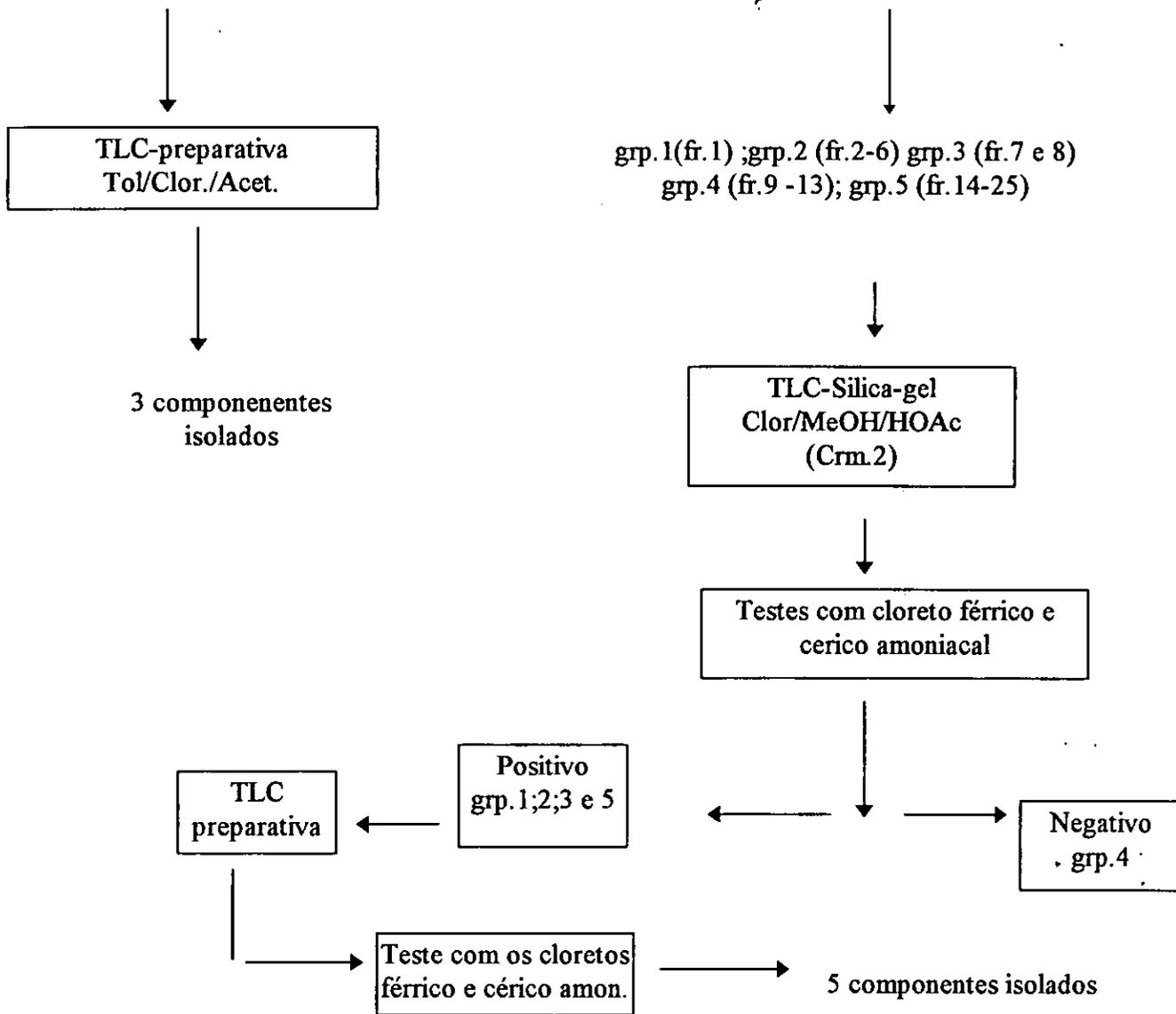
R₆ - Reagente cérico amoniacal em ditizona

3. Separação e isolamento dos componentes fenólicos

Apresentaram resultados satisfatórios nos testes de fenóis, os extractos das plantas 5 e 6 (Erythrina Huheana e Eucalipto Camaldulensis respectivamente)

Fluxograma





4. Criação de condições óptimas para a oxidação do ácido linoléico

a) MODELO A-Autooxidação a 100°C

Ensaio-1

A esta temperatura não se conseguiu dosear os hidroperóxidos formados. Fez-se um teste de identificação de aldeídos, com reagente de Fehling, e este foi positivo, o que mostra que a oxidação ocorreu, mas as condições escolhidas são violentas para este substracto, pois os hidroperóxidos formados decompõe-se facilmente com o calor.

b) MODELO B- Autooxidação em CNTP

Ensaio - 2

Data de preparação: 17/08/95 (Quinta feira)

Temperaturas registadas durante o periodo de reacção (em °C):

Data	Máxima	Mínima
17/8	24,1	16,5
18/8	24,7	15,5
19/8	26,7	16,0
20/8	31,1	16,2
21/8	32,6	17,2

TABELA 3

Tempo (horas)	Temp.(°C)	Toma (gr)	V.Tioss. (ml)	%Hp
18	máx.:24,7 mín.:15,50	0,3173	4,8	23,6
19		0,3176	6,0	29,5
20		0,3106	6,6	33,1
21		0,3152	6,0	29,7
22		0,3150	6,0	29,7
23		0,3556	6,6	29,0
90	máx.:32,6 mín.:17,2	0,3466	8,8	39,6
91		0,3176	8,2	40,3
92		0,3164	8,0	39,4
93		0,3270	8,0	38,2
94		0,3354	8,2	38,1

Ensaio -3

Data de preparação: 18/08/95 (Sexta feira)

Temperaturas registadas durante o periodo de reacção (em °C):

Data	Máxima	mínima
18/8	24,7	15,5
19/8	26,7	16,0
20/8	31,1	16,2
21/8	32,6	17,2
22/8	35,7	19,7
23/8	24,2	16,6

TABELA 4

Tempo (horas)	Temp.(°C)	Toma (gr)	V. Tioss. (ml)	%Hp
65	máx.:32,6 mín.:17,2	0,3177	2,2	10,8
66		0,3075	2,0	10,1
67		0,3069	2,2	11,2
68		0,3110	2,4	12,0
69		0,3155	2,6	12,9
70		0,3110	3,0	15,0
88	máx.:35,7 mín.:19,7	0,3218	7,0	33,9
89		0,3183	8,0	39,2
90		0,3240	4,2	20,2
115	máx.:24,2 mín.:16,6	0,3072	6,0	30,5
116		0,3035	5,4	27,8
117		0,3200	5,8	28,3
118		0,3195	5,4	26,4

c) MODELO C - Autoxidação do ácido linoléico por injeção directa de oxigénio, sem calor.

Ensaio -4

Data de preparação: 24/08/95

Temperaturas registadas durante o periodo de reacção (em °C):

Data	Máxima	Mínima
24/8	23,0	17,1
25/8	26,4	16,6

TABELA 5

Tempo (horas)	Temp.(°C)	Toma(gr)	V.Tioss. (ml)	%Hp
1	máx.:23,0 mín.:17,1	0,4290	3,2	11,6
2		0,4181	2,6	9,7
3		0,4229	2,6	9,6
4		0,4415	3,6	12,7
5		0,4167	3,6	13,5
23	máx.:26,4 mín.:16,6	0,4369	6,8	24,3
24		0,4237	6,2	22,8
25		0,4353	8,0	28,7
26		0,4259	6,8	24,9
27		0,4776	8,0	26,1
28		0,4357	9,4	33,7

5. Método de autoxidação do ácido linoléico - Autoxidação por injeção directa de oxigénio a 40°C injectando uma corrente fraca de oxigénio

Ensaio -5

TABELA 6

Tempo (horas)	Toma(gr)	V. Tioiss.(ml)	%Hp	%Hp (média)
1	0,3151	2,0	9,9	10,0
	0,3138	2,0	9,9	
	0,3388	2,2	10,1	
2	0,3315	3,4	16,0	15,2
	0,3033	2,8	14,4	
	0,3477	3,4	15,3	
3	0,3110	3,6	18,1	18,1
	0,3168	3,6	17,7	
	0,2195	2,6	18,5	
4	0,3094	5,4	27,2	23,7
	0,3145	4,6	22,8	
	0,2941	4,0	21,2	
5	0,3043	6,0	30,8	29,2
	0,3209	5,6	27,2	
	0,3163	6,0	29,6	

Ensaio -6

TABELA 7

Tempo(horas)	Toma(gr)	V. Tioiss.(ml)	%Hp	%Hp.(média)
1	0,3129	1,8	8,9	10,4
	0,3224	2,2	10,6	
	0,3176	2,4	11,8	
2	0,3065	3,0	15,3	14,8
	0,3074	2,8	14,2	
	0,3147	3,0	14,9	
3	0,3193	3,8	18,6	18,9
	0,3195	3,8	18,6	
	0,2902	3,6	19,4	
4	0,3060	5,2	26,5	26,8
	0,3123	5,6	28,0	
	0,3143	5,2	25,8	
5	0,3471	6,8	30,6	31,3
	0,3458	6,8	30,7	
	0,3442	7,2	32,6	

6. Autoxidação por injeção directa de oxigénio a 40°C, na solução reaccional contendo 2ml de ácido gálico (0,06%) como um antioxidante

Ensaio -7

TABELA 8

Tempo (horas)	Toma(gr)	V. Tioss.(ml)	%Hp	%Hp (média)
1	0,3026	1,8	9,3	9,4
	0,3315	2,0	9,4	
2	0,3213	2,0	9,7	10,0
	0,3280	2,2	10,4	
3	0,3070	4,8	24,4	22,8
	0,3069	4,2	21,3	
4	0,3407	5,8	26,6	27,4
	0,3090	5,6	28,3	
5	0,3185	6,2	30,4	29,5
	0,3160	5,8	28,6	
6	0,3325	7,0	32,8	32,4
	0,2659	6,8	31,9	

7. Autoxidação por injeção directa de oxigénio a 40°C, na solução reaccional contendo 2ml de ácido gálico (1%), como um antioxidante

Ensaio -8

TABELA 9

Tempo (horas)	Toma(gr)	V. Tioss.(ml)	%Hp	%Hp (média)
1	0,2997	1,6	8,3	8,8
	0,3001	1,8	9,4	
2	0,2792	1,8	10,0	10,0
	0,2830	1,8	9,9	
3	0,3051	2,2	11,2	11,6
	0,2585	2,0	12,1	
4	0,2972	2,8	14,7	15,0
	0,2675	2,6	15,2	
5	0,3325	5,6	26,3	25,6
	0,3150	5,0	24,8	

8. Autoxidação por injeção directa de oxigénio a 40°C, na solução reaccional contendo 2ml de uma solução alcoólica do extracto de Erytrina Huheana a 0,06%

Ensaio -9

O ensaio foi realizado durante cinco horas, tendo sido feita a titulação iodométrica para a determinação dos hidroperóxidos produzidos, nela gastou-se uma gota de titulante e não se verificou um aumento significativo no volume de tiosulfato de sódio gasto durante todo o ensaio.

9. Autoxidação por injeção directa de oxigénio a 40°C, na solução reaccional contendo 2ml de uma solução aquosa do extracto de Eucalipto Camaldulensis a 0,06%

Ensaio -10

TABELA 10

Tempo (horas)	Toma (gr)	V. Tioiss.(ml)	%Hp	%Hp (média)
1	0,2434	2,0	12,8	12,1
	0,2997	2,2	11,4	
2	0,2792	2,0	11,2	11,4
	0,2955	2,2	11,6	
3	0,2630	1,8	10,7	10,6
	0,3010	2,0	10,4	
4	0,2999	2,0	10,4	10,8
	0,2815	2,0	11,1	

10. Controle do método em óleo alimentar -Autoxidação por injeção directa de oxigénio a 89°C, numa solução contendo óleo alimentar como substracto oxidável

Ensaio -11

TABELA 11

Tempo (horas)	Toma (gr)	V. Tioiss.(ml)	V. Tioiss.(média)
2	0,3001	0,6	0,7
	0,3554	0,8	
4	0,3726	0,8	1,1
	0,3796	1,4	
6	0,3604	1,8	1,5
	0,3156	1,2	

Ensaio -12

TABELA 12

Tempo (horas)	Toma (gr)	V. Tioiss.(ml)	V. Tioiss.(média)
2	0,2927	0,6	0,6
	0,3140	0,6	
4	0,2895	1,0	1,1
	0,3250	1,2	
6	0,3325	1,8	1,7
	0,3233	1,6	

11. Autoxidação por injeção directa de oxigénio, no óleo alimentar a 89°C, contendo 2ml de solução alcóolica de Erytrina Huheana a 0,06%

Ensaio -13

TABELA 13

Tempo (horas)	Toma (gr)	V. Tioiss.(ml)	V. Tioiss.(média)
2	0,3285	0,2	0,2
	0,2957	0,2	
4	0,3020	0,2	0,2
	0,3125	0,2	
6	0,3340	0,4	0,3
	0,2930	0,2	

6. Tratamento estatístico dos resultados

Para realizar o tratamento estatístico dos resultados, opta-se pela aplicação dos testes de significância, concretamente pelo teste t, onde é feita a comparação dos valores médios das percentagens dos hidroperóxidos[20].

Com estes testes, torna-se possível concluir se os desvios obtidos se devem a erros acidentais ou aos sistemáticos.

Quando se testa uma significância, testa-se também uma hipótese nula (H_0) ou uma hipótese alternativa (H_1). Nestes testes é adoptado o nível de significância de 95%, ou a probabilidade de 0.05 para um teste bilateral.

Os testes de significância, não abrangem os resultados obtidos durante os vários modelos criados para a obtenção de condições óptimas para a oxidação do ácido linoléico (modelo A a C), abrangem apenas os resultados obtidos no método de pesquisa de antioxidantes de origem vegetal. Eles são realizados na seguinte ordem:

- 1- Comparação entre os ensaios realizados em branco, i.e., realizados sem antioxidante (ensaios 5 e 6).
- 2- Comparação entre os ensaios realizados na presença do ácido gálico a diferentes concentrações (ensaios 7 e 8)
- 3- Comparação entre um ensaio realizado em branco e um realizado na presença de ácido gálico (ensaios 5 e 7)
- 4- Comparação entre o ensaio realizado na presença do ácido gálico e na presença do eucalipto (ensaios 7 e 10)

Todos os testes incluem a média dos resultados e o desvio padrão dos mesmos.

1 - Comparação entre os ensaios realizados em branco, na autoxidação do ácido linoléico (ensaios-5 e 6).

Primeira hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
5	10,0	0,1	10,0 \pm 0,1
6	10,4	1,4	10,4 \pm 1,4

$n_1 = n_2 = 3$

$S^2 = 0,98$

$S = 0,99$

$t_{obs.} = 0,49$

$v = 4$

$t_{crit.} = 2,78$

$t_{obs.} < t_{crit.}$

Segunda hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S$
5	15,2	0,8	15,2 \pm 0,8
6	14,8	0,6	14,8 \pm 0,6

$S^2 = 0,50$

$S = 0,71$

$t_{obs.} = 0,69$

$t_{crit.} = 2,78$

$t_{obs.} < t_{crit.}$

Terceira hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
5	18,1	0,4	18,1 \pm 0,1
6	18,9	0,5	18,9 \pm 0,5

$S^2 = 0,20$

$S = 0,45$

$t_{crit.} = 2,78$

$t_{obs.} = 2,18$

$t_{obs.} < t_{crit.}$

Quarta hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
5	23,7	3,1	23,7 \pm 3,1
6	26,8	1,1	26,8 \pm 1,1

$$S^2 = 5,41$$

$$t_{obs.} = 1,64$$

$$t_{obs.} < t_{crit.}$$

$$S = 2,32$$

$$t_{crit.} = 2,78$$

Quinta hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
5	29,2	1,8	29,2 \pm 1,8
6	31,3	1,1	31,3 \pm 1,1

$$S^2 = 2,22$$

$$t_{obs.} = 1,73$$

$$t_{obs.} < t_{crit.}$$

$$S = 1,49$$

$$t_{crit.} = 2,78$$

2- Comparação entre os ensaios realizados na presença do ácido gálico a diferentes concentrações (ensaios 7 e 8)

Primeira hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
7	9,4	0,1	9,4 \pm 0,1
8	8,8	0,8	8,8 \pm 0,8

$$S^2 = 0,45$$

$$t_{obs.} = 0,89$$

$$t_{crit.} = 4,30$$

$$n_1 = n_2 = 2$$

$$S = 0,67$$

$$v = 2$$

$$t_{obs.} < t_{crit.}$$

Segunda hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
7	10,0	0,5	10,0 \pm 0,5
8	10,0	0,1	10,0 \pm 0,1

$S^2=0,09$

$S=0,03$

$t_{obs.}=0$

$t_{crit.}=4,30$

$t_{obs.} < t_{crit.}$

Terceira hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
7	22,8	2,2	22,8 \pm 2,2
8	11,6	0,6	11,6 \pm 0,6

$S^2=1,40$

$S=1,18$

$t_{obs.}=9,48$

$t_{crit.}=4,30$

$t_{obs.} > t_{crit.}$

Quarta hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
7	27,4	1,2	27,4 \pm 1,2
8	15,0	0,4	15,0 \pm 0,4

$S^2=0,53$

$S=0,73$

$t_{obs.}=17,0$

$t_{crit.}=4,30$

$t_{obs.} > t_{crit.}$

Quinta hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
7	29,5	1,3	29,5 \pm 1,3
8	25,6	1,1	25,6 \pm 1,1

$S^2=1,20$
 $t_{obs.}=3,43$
 $t_{obs.} < t_{crit.}$

$S= 1,10$
 $t_{crit.}=4,30$

3. Comparação entre o ensaio realizado em branco (ensaio 5), e o realizado na presença do ácido gálico (ensaio 8).

Primeira hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
5	10,0	0,1	10,0 \pm 0,1
8	8,8	0,1	8,8 \pm 0,1

$n_1=3$
 $v=3$
 $S=0,10$
 $t_{obs.}=9,18$

$n_2=2$
 $S^2=0,01$
 $t_{crit.}=3,18$
 $t_{obs.} > t_{crit.}$

Segunda hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
5	15,2	0,8	15,2 \pm 0,8
8	10,0	0,1	10,0 \pm 0,1

$S^2=0,64$
 $t_{crit.}=3,18$
 $t_{obs.} > t_{crit.}$

$S=0,80$
 $t_{obs.}=5,13$

Terceira hora.

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
5	18,1	0,4	18,1 \pm 0,4
8	11,6	0,6	11,6 \pm 0,6

$S^2=0,23$
 $t_{crit.}=3,18$
 $t_{obs.}>t_{crit.}$

$S=0,48$
 $t_{obs.}=11,0$

Quarta hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
5	23,7	3,1	23,7 \pm 3,1
8	15,0	0,4	15,0 \pm 0,4

$S^2=6,46$
 $t_{crit.}=3,18$
 $t_{obs.}<t_{crit.}$

$S=2,54$
 $t_{obs.}=2,18$

Quinta hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
5	29,2	1,8	29,2 \pm 1,8
8	25,6	1,1	25,6 \pm 1,1

$S^2=2,56$
 $t_{crit.}=3,18$
 $t_{obs.}<t_{crit.}$

$S=1,60$
 $t_{obs.}=1,74$

4- Comparação entre o ensaio realizado na presença do ácido gálico (ensaio7) e o realizado na presença do eucalipto(ensaio 10).

Primeira hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
7	9,4	0,1	9,4 \pm 0,1
10	12,1	1,0	12,1 \pm 1,0

$S^2=0,55$
 $v=2$
 $t_{crit.}=4,30$

$n_1=n_2=2$
 $S=0,74$
 $t_{obs.}=3,65$

Segunda hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
7	10,0	0,5	10,0 \pm 0,5
10	11,4	0,3	11,4 \pm 0,3

$S^2=0,40$
 $t_{crit.}=4,30$
 $t_{obs.} < t_{crit.}$

$S=0,63$
 $t_{obs.}=2,22$

Terceira hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
7	22,8	2,2	22,8 \pm 2,2
8	10,6	0,2	10,6 \pm 0,2

$S^2=1,20$
 $t_{crit.}=4,30$
 $t_{obs.} > t_{crit.}$

$S=1,09$
 $t_{obs.}=11,2$

Quarta hora

Ensaio	\bar{x}	S*	$\bar{x} \pm S^*$
7	27,4	1,2	27,4 \pm 1,2
10	10,8	0,5	10,8 \pm 0,5

$S^2=0,85$
 $t_{crit.}=4,30$
 $t_{obs.}>t_{crit.}$

$S=0,92$
 $t_{obs.}=18,04$

6. Discussão dos resultados

1. Extracção e isolamento dos fenóis.

- Os resultados obtidos na pesquisa de compostos fenólicos, não podem ser considerados absolutos, uma vez que com o cloreto férrico nem todos os fenóis dão reacção corada e com o reagente cérico amoniacal, obtêm-se cores nítidas em compostos com menos de dez átomos de carbono. Estes reagentes tem a desvantagem de não servirem apenas para a identificação de fenóis, mas também para identificar alguns amino-ácidos, ácidos hidroxâmicos, pelo que podem surgir interferências.

- Para o caso de produtos naturais, a comparação dos valores de Rf torna-se pouco prestativa pois, os fenóis encontram-se muitas vezes combinados na forma de glicosídeos e o ácido necessário para a hidrólise destes compostos, afecta seriamente a detecção de fenóis. Sobre sílica gel, pode obter-se resultados satisfatórios se se usar uma concentração de ácido menor que 0,01%, mas uma concentração que seja maior provoca alterações profundas no valor de Rf.

- Um outro factor que deve ser levado em consideração, é o da presença de substituintes no anel. O Rf dos fenóis depende do número e da posição de grupos hidroxilo no anel. Ele diminue com o aumento de grupos hidroxilo no anel e, é afectado pela posição destes grupos.

Substituintes *orto* que sejam desactivantes, tais como o grupo nitro, reduzem consideravelmente a afinidade de adsorção e, conseqüentemente tendem a aumentar o valor de Rf. Este fenómeno deve-se provavelmente à formação de ligações intramoleculares entre o grupo hidroxilo e o substituinte *orto*.

2. Criação de condições óptimas para a oxidação do ácido linoléico.

- Nesta etapa, foi possível observar que a temperatura e a pressão de oxigénio são dois factores importantes e devem ser rigorosamente controlados.

- No primeiro modelo criado (Modelo A), a temperatura de 100°C e alta pressão de oxigénio, não favoreceram o doseamento de hidroperóxidos formados, pois nestas condições eles formam-se com muita rapidez e facilmente se decompõem pela acção do calor.

- No segundo modelo (Modelo B), pode observar-se que à temperatura ambiente, não se consegue obter uma linearidade na produção de hidroperóxidos mesmo após várias repetições. Observa-se alta produção em dias quentes, podendo-se ver que em algumas horas há uma descida mostrando uma degradação dos hidroperóxidos produzidos. Durante o dia verifica-se uma produção ascendente na parte da manhã até ao meio da tarde, enquanto que ao fim da tarde não se verifica uma produção significativa.

- No terceiro modelo (Modelo C), apesar de se realizar a autoxidação por injeção directa de oxigénio e sem calor, a produção de hidroperóxidos é influenciada pela temperatura do ambiente.

Com base nos resultados obtidos nos três modelos, concluiu-se que o importante é de facto eliminar o efeito da temperatura realizando os ensaios a uma temperatura fixa e a baixa pressão de oxigénio.

3. Método de autoxidação do ácido linoléico a 40°C por injeção directa de oxigénio.

-Os resultados obtidos nos ensaios em branco, são satisfatórios, verifica-se uma linearidade na produção de hidroperóxidos nos dois ensaios realizados em branco i.e sem antioxidante e, os testes de significância, mostram que não há diferença significativa na produção e que os desvios obtidos devem-se apenas a erros acidentais.

-Realizando o ensaio na presença do ácido gálico, verifica-se uma redução na produção, não interpretando estes resultados apenas teóricamente, assim como estatisticamente pois, o teste de significância, mostra a existência de diferença significativa da primeira a terceira hora, enquanto que da quarta à quinta hora verifica-se o contrário. Teóricamente pode-se afirmar que o ácido gálico a 1% tem um período de indução de três horas ou seja, na presença deste ácido a esta concentração não se verifica uma acumulação rápida de hidroperóxidos durante três horas.

- O efeito antioxidante dos hidrolatos do eucalipto comparativamente ao do ácido gálico, pode ser considerado maior pois, prestando atenção a terceira e a quarta hora, a diferença na produção é maior apesar de não se verificar o mesmo durante as três primeiras horas. Os compostos antioxidantes presentes nos hidrolatos do eucalipto conseguem inibir por mais duas horas a produção de hidroperóxidos.

-Em relação ao ensaio realizado na presença do extracto metanólico de erytrina, uma gota é suficiente para descorar o azul do iodo durante todo ensaio, mostrando uma inibição maior que a dos hidrolatos do eucalipto, portando maior poder antioxidante.

-Controlando o método em óleo alimentar, só é possível a comparação dos volumes pois, quanto maior este fôr, maior é a percentagem de hidroperóxidos produzidos. Estes não podem ser calculados como no caso do ácido linoléico, porque o óleo é uma mistura de glicéridos e ácidos insaturados e os produtos de oxidação, são provavelmente uma mistura de hidroperóxidos o que dificulta o cálculo. Com a introdução dos hidrolatos de eucalipto, fazendo uma interpretação teórica, a redução verificada no volume do titulante, mostra a actuação dos hidrolatos de eucalipto como inibidores de oxidação.



7. Conclusões e recomendações.

De uma forma geral, pode concluir-se que os objectivos do trabalho foram alcançados, criou-se um método simples de pesquisa de antioxidantes de origem vegetal. Os resultados obtidos durante todos os ensaios realizados, aliados às interpretações estatísticas, condizem com o que se espera teóricamente da actuação de um antioxidante, que é o aumento do tempo de vida das matérias orgânicas, por retardamento na formação das substâncias resultantes da oxidação (hidroperóxidos), responsáveis pela alteração das características organolépticas e perda da qualidade nutricional dos alimentos.

Não se pode afirmar com segurança que, as plantas que apresentaram poder antioxidante têm de facto compostos fenólicos pois, os testes realizados não são suficientes para sustentar tal afirmação mas, o importante é que elas provaram que possuem compostos com propriedades antioxidantes, sejam eles fenólicos ou não.

Os ensaios realizados com o óleo alimentar, mostraram que esta substância dificilmente sofre oxidação a 40°C como o ácido linoléico. Foi necessário oxidá-lo em condições mais violentas e, mesmo assim não se verificou uma oxidação significativa. Tratando-se de um óleo vegetal, ele pode possuir antioxidantes naturalmente presentes (conhece-se o caso dos tocoferóis nos óleos vegetais). Na indústria não se introduz antioxidante para conservar o óleo de cozinha, pois sabe-se que ele deteriora-se a temperaturas superiores a 85°C o que não se atinge em condições normais.

O método criado para a pesquisa de compostos com propriedades antioxidantes de origem vegetal, tem as seguintes vantagens:

- É simples e de fácil aplicação.
- Emprega equipamento simples e que pode ser encontrado em qualquer laboratório minimamente equipado.
- Não tem interferências.

Desvantagem:

- É necessário que se escolha cuidadosamente o substrato a oxidar, deve-se conhecer os produtos resultantes da oxidação uma vez que, para calcular a percentagem de hidroperóxidos produzidos introduz-se na fórmula o valor do peso molecular do hidroperóxido.

Recomenda-se em pesquisas desta natureza, a utilização de maior número de plantas que as usadas neste trabalho, para que se determine o poder antioxidante dos componentes isolados, que existirem em quantidades aceitáveis para testes quantitativos, e não só a utilização de extractos brutos que, em outras situações podem actuar como próoxidantes porque, muitas vezes representam uma mistura de compostos.

Às plantas que apresentaram poder antioxidante, recomenda-se um estudo detalhado de solubilidade, toxicidade, termoresistência, compatibilidade com a cor, cheiro e sabor dos alimentos, para que posteriormente possam ser úteis na indústria.

8. Bibliografia

1. Alexeév, V. (1979). Análise Quantitativa, 2ª ed. pp.: 405-422. Porto. Livraria Lopes da Silva.
2. Amimud, K.P. (1970). Quality Control for the Food Industry, 3ª ed. pp. 218-219, NY. Avi publishing company INC.
3. Berset, C. (1995). Mesure de L'Efficacité des Antioxydantes, 91: 1-7.
4. Burton, G.W. e Ingold, K.U. (1981). J. Am. Chem. Soc., 103: 6472-6477.
5. Cuvilier, M.E. (1995). Choix et Utilisation des Antioxydants, 91: 1-4.
6. Dados obtidos no herbário do INIA.
7. Deby (1995). Toxicité Comparée des antioxydants usuels, 91: 1-4.
8. Desrosier, N.W. (1970). The Technology of Food Preservation, 3ª ed. pp. 301-303. N.Y., The Avi publishing Company. INC.
9. Devel, J. e Harry, J. (1951). The Lipids, Vol. 1, pp. 294, N.Y. Interscience Publishers. INC.
10. Dufuor, J.P. (1990). Reactions Chimiques et Enzymatiques, 2ªed. pp. 19-29. Paris, Université Catholique de Louvain.
11. Fuson, R.C. (1964). Reactions of Organic Compounds, 2ª ed. pp. 617. N.Y., John Wiley & Sons. INC.
12. Gardner, H.W. (1989). Free Rad. Biol. Med., 12. pp. 7-65. London., Academic press.
13. Geissman, T.A. (1962). The Chemistry of Flavanoids Compounds, 1ª ed. pp. 1-34, N.Y., Pergamon Press INC.

14. Graw, G. (1959). Organic Chemistry, 2ª ed. pp. 525-685, N.Y., Mc-Graw Hill Book Company.
15. Grupo de autores (1965). Organikum, 5ª ed. pp. 202-214. R.J., Editora guanabara dois,S.A.
16. Howard, J.A. e Yamada, T. (1981). J. Am. Chem. Soc., 103: 7102-7106.
17. Hudson, J.F. e Mahgoud, E.O. (1980). J. Sci. Food Agric., 31: 646-650.
18. Larson, R.A. (1988). Photochemistry, 27 (4) :969-978.
19. Marley, K.S. (1961). Fatty Acids, 2ª ed. pp: 1399-1404. N.Y., Interscience Publishers. INC.
20. Miller, J.C. e Miller, J.N. (1988). Statistics for analitical Chemistry, 2ª ed. pp.: 1-55, N.Y., John Wiley and Sons.
21. Norman, L.A. (1978). Quimica Orgânica, 2ª ed. pp. 1721. R.J. Editora guanabara dois. S.A.
22. Scoot, G. (1985). Chemistry in Britain, 21, pp 648. London, Academic Press.
23. Vigo, P.C. (1990). Membrane Lipid Oxidation, 1, pp. 7. Florida, CRC Press.

ANEXOS

ANEXO-1 Formulário para o tratamento estatístico dos resultados

$$1) \bar{x} = \sum X_i / n$$

$$2) S^* = \sum \{ (X_i - \bar{x}) / n - 1 \}$$

$$3) \bar{x} \pm S^*$$

$$4) S^2 = \{ (n_1 - 1) S^{*1} + (n_2 - 1) S^{*2} \} / (n_1 + n_2 - 2)$$

$$5) S = \sqrt{S^2}$$

$$6) t_{\text{obs.}} = \{ \bar{x}_1 - \bar{x}_2 \} / S \sqrt{n_1 + n_2}$$

$$7) \nu = n_1 + n_2 - 2.$$

ANEXO-2- SIMBOLOGIA

X_i → % de hidroperóxidos

\bar{x} → Média da % de hidroperóxidos

n → nº de medições

S^* → Desvio padrão de cada ensaio

$\bar{x} \pm S^*$ → Intervalo de confiança

S^2 → Desvio padrão de dois ensaios

S → Variância de dois ensaios

ν → Graus de liberdade

t_{obs} → Valor de t observado nos dois ensaios

t_{crit} → Valor de t critico retirado da tabela

Ext. → Extracto

TLC → Cromatografia de camada fina

Tol → Tolueno

Clor. → Clorofórmio

Acet. → Acetona

n-H → normal hexano

MeOH → Metanol

H0AC → Ácido acético

Grp. → Grupo

Fr. → Fracção

V.E. → Velocidade de eluição

MPLC → Cromatografia líquida de média pressão

Crn → Cromatograma

ANEXO-3 -Tabela de distribuição de t

A TABELA A1, apresenta os valores de t crítico que foram comparados com os valores de t observado, calculados durante o tratamento estatístico dos resultados. Cada valor de t crítico corresponde a um certo número de graus de liberdade.

TABELA A.1 -Distribuição de t.

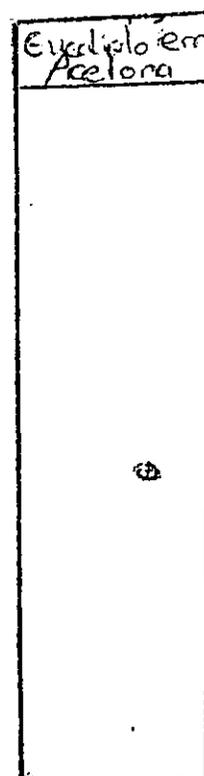
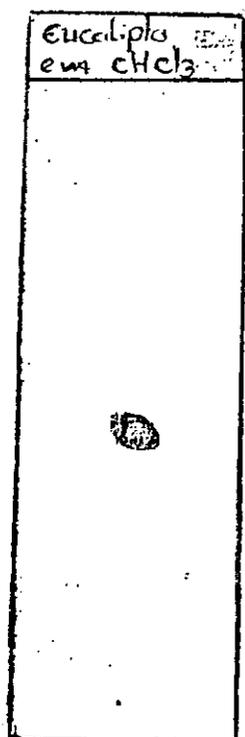
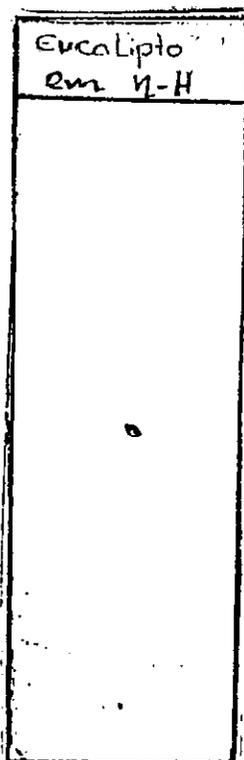
v	90%(0,10)	95%(0,05)	98%(0,02)	99%(0,01)
1	6,31	12,71	31,82	63,66
2	2,92	4,30	6,96	9,92
3	2,35	3,18	4,54	5,84
4	2,13	2,78	3,75	4,60
5	2,02	2,57	3,36	4,03
6	1,94	2,45	3,14	3,71
7	1,89	2,36	3,00	3,50
8	1,86	2,31	2,90	3,36
9	1,83	2,26	2,82	3,25
10	1,81	2,23	2,76	3,17
12	1,78	2,18	2,68	3,05
14	1,76	2,14	2,62	2,98
16	1,75	2,12	2,58	2,92
18	1,73	2,10	2,55	2,88
20	1,72	2,09	2,53	2,85
30	1,70	2,04	2,46	2,75
50	1,68	2,01	2,40	2,68
Infinito	1,64	1,96	2,33	2,58

ANEXO-4 - Cromatogramas relativos ao isolamento dos compostos fenólicos , referenciados no fluxograma



Crn 2

Crn 3



ANEXO- 5 - Glossário

Antioxidante- Substância que retarda a deterioração das matérias orgânicas.

Carcinogéneo- Relativo a cancro; que gera cancro

Condimentos- Substância que realça o sabor da comida; tempero

Deteriorar- Adulterar; estragar

Diabetogéticos- Que gera diabetes

Fotosensitizante- Colorante; preparado químico que ao ser atirado na água se dissolve rapidamente, espalhando-se em cores, de modo a tornar o local facilmente identificável pelo do ar

Organolépticas- Propriedades dos corpos que impressionam os órgãos dos sentidos, sendo apreciados por estes

Prooxidante- Substância que acelera a oxidação

Rancidez- Estado de rancido; ranço (decomposição ou alteração das substâncias gordas, em contacto com o ar)

Sinergético- Efeito resultante da acção de diferentes agentes que actuam de modo semelhante e independente