

Aplicação de antioxidantes para prevenir a oxidação lipídica em sistemas alimentares emulsionados

Mafalda Beatriz Mariano Meireles

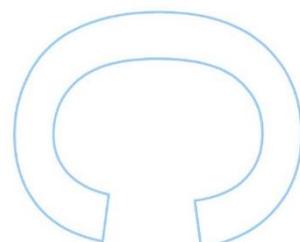
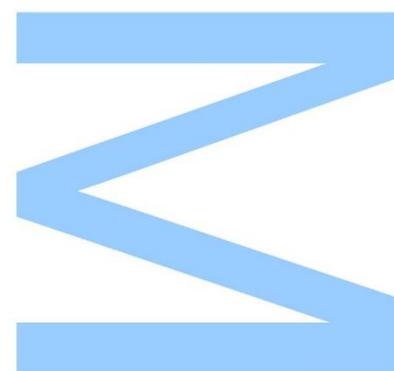
Mestrado em Química
Departamento de Química e Bioquímica
2015/2016

Orientador

Maria de Fátima Azevedo Brandão Amaral Paiva Martins, Professora Auxiliar no Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Coorientador

Carlos Bravo-Díaz, Departamento de Química Física da Faculdade de Química da Universidade de Vigo



Mafalda Beatriz Mariano Meireles

**APLICAÇÃO DE ANTIOXIDANTES PARA
PREVENIR A OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM SISTEMAS
ALIMENTARES EMULSIONADOS**



Mestrado em Química

Dissertação

Departamento de Química e Bioquímica
Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

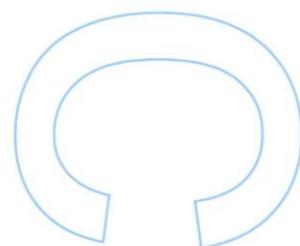
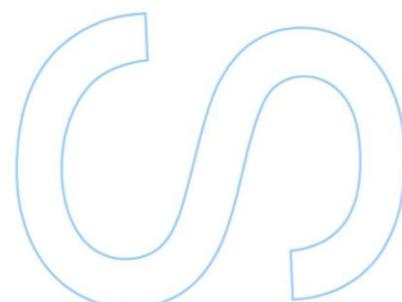
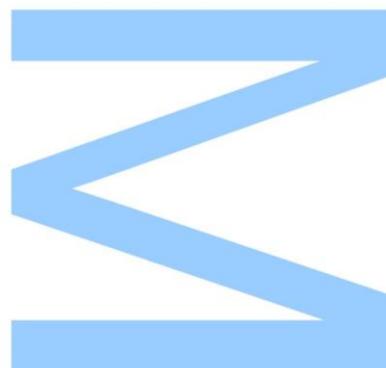
Departamento de Química Física
Faculdade de Química da Universidade de Vigo

Porto, setembro de 2016



Todas as correções determinadas pelo júri, e só essas, foram efetuadas. O Presidente do Júri,

Porto, ____/____/____



Agradecimentos

Gostaria de agradecer:

À professora **Doutora Fátima Paiva Martins**, orientadora deste projeto, pela enorme ajuda e apoio, pela paciência e pela disponibilidade que prestou comigo ao longo deste último ano. Por toda a dedicação que apresentou para que o trabalho fosse desenvolvido da melhor forma, um enorme obrigado.

Ao professor **Doutor Carlos Bravo-Díaz**, da Faculdade de Química da Universidade de Vigo, coorientador deste projeto, por me ter proporcionado a fantástica oportunidade de desenvolver uma parte deste trabalho na Faculdade de Química da Universidade de Vigo. Agradeço também por todos os ensinamentos e o incansável apoio transmitido no decorrer deste trabalho.

À Sónia, por toda a incansável ajuda que prestou desde o início deste projeto e por toda a disponibilidade que sempre demonstrou.

À minha amiga Inês Ferreira, por me ter acompanhado neste último ano e me ter ajudado a realizar este trabalho.

À minha amiga Andreia, por toda a preocupação e apoio que demonstrou.

À minha colega de laboratório, Marlene Costa, por toda a ajuda que me deu a integrar-me no laboratório e no tema de trabalho.

À minha família e namorado por sempre acreditarem em mim, incentivarem-me e apoiarem todas as decisões, por toda a paciência e carinho que sempre tiveram para comigo, por tudo que fizeram por mim e ajudaram, pois, sem eles nunca teria alcançado as minhas metas.

Resumo

Uma vez que a oxidação lipídica em emulsões é iniciada na região interfacial, a localização de um antioxidante num determinado sistema emulsionado é crucial para a sua eficácia na inibição da oxidação dos lípidos. Desta forma, um aumento da concentração dos antioxidantes na interface da emulsão deveria ter como consequência uma melhoria na estabilidade oxidativa das emulsões. Assim, visando otimizar a atividade de moléculas com propriedades antioxidantes em sistemas emulsionados, tem surgindo a necessidade da modulação da sua hidrofobicidade por modificação covalente mantendo uma atividade antiradicalar idêntica. Com base nisto, pretendeu-se, neste projeto, sintetizar antioxidantes polifenólicos de diferentes hidrofobicidades, de modo a obter compostos fenólicos funcionalizados com afinidade para a região interfacial da emulsão.

Deste modo, neste trabalho foram sintetizados vários ésteres do ácido clorogénico (C1-C16) por esterificação, com catálise ácida ou enzimática. Os rendimentos obtidos situaram-se entre 16 e 72 %, após purificação, dependendo do composto sintetizado.

Determinou-se a distribuição do ácido clorogénico e seus ésteres nas emulsões utilizando um método cinético que não requer o isolamento das fases que constituem a emulsão, e que fornece uma boa estimativa das duas constantes de partição que descrevem a distribuição do antioxidante entre as regiões oleosa / interfacial (P_{O}^I) e regiões aquosa / interfacial (P_{A}^I) de emulsões azeite/ Tween 20/ água preparadas. O método cinético utilizado é baseado na reação entre o ião 4-hexadecilbenzenodiazónio, localizado exclusivamente na interface, e o antioxidante, e os resultados assim obtidos foram interpretados com base no modelo cinético da pseudofase aplicado a emulsões. Determinou-se a constante de velocidade observada (k_{obs}) para a reação através de uma metodologia de derivatização baseada na reação dos iões arenodiazónio, que não reagem com o antioxidante, com um agente copulante (NED.2HCl), que produz um corante azóico estável cuja concentração pode ser determinada por espectrofotometria do visível.

Os valores das constantes de partição P_{A}^O determinados em sistemas binários azeite/água mostram que, para os ésteres do ácido clorogénico, a hidrofobicidade aumenta com o aumento da cadeia alquílica ao mesmo tempo que aumenta a sua solubilidade no azeite, consequência do aumento das constantes de partição P_{A}^O .

Num sistema emulsionado, os resultados obtidos mostram que o ácido clorogénico distribui-se apenas nas regiões aquosa e interfacial, apresentando uma constante de partição com um valor de $P_{A}^I = 40,58$. O mesmo acontece para os

clorogenatos de etilo e butilo que se distribuem apenas pelas regiões aquosa e interfacial apresentando constantes de partição maiores que para o ácido clorogénico com valor de $P_A^I = 78,36$ e $P_A^I = 140,60$, respetivamente. Por outro lado, os derivados clorogenato de octilo, decilo, dodecilo e hexadecilo encontram-se distribuídos nas regiões oleosa e interfacial, tendo-se obtido um valor de P_O^I de 110,71, 124,31, 158,51 e 89,28, respetivamente. Com o aumento da cadeia alquílica, observou-se um aumento do valor de P_O^I até alcançar um máximo, sendo este máximo para o clorogenato de dodecilo, diminuindo para o clorogenato de hexadecilo. Determinados os valores de P_A^I e P_O^I , foi possível calcular as percentagens do ácido clorogénico e seus ésteres em cada região das emulsões azeite/ Tween 20/ água. Dependendo da fração de emulsionante utilizada, a percentagem de ácido clorogénico na interface variou entre 25-72 %, encontrando-se a restante quantidade de composto apenas na fase aquosa. Relativamente aos clorogenatos de etilo e butilo, os valores percentuais na interface variaram entre 40-85 % e 54-91 %, respetivamente, distribuindo-se o restante dos compostos na fase aquosa. Para os clorogenatos de octilo, decilo, dodecilo e hexadecilo, as percentagens na interface variaram entre 59-92 %, 62-93 %, 67-95 % e 53-91 %, respetivamente, com a restante quantidade de cada composto localizado apenas na fase oleosa.

A atividade antioxidante destes compostos foi estudada através do teste do DPPH^{*} e do teste da estufa de Schaal. Determinou-se a capacidade antiradicalar em solução metanólica pelo método do DPPH^{*} verificando-se que, ao fim de 5 minutos de reação não existem diferenças significativas na atividade antiradicalar do ácido clorogénico e seus derivados frente a este radical, consequência da estrutura catecólica comum a todos eles. Esta semelhança na reatividade mostra que a possível diferença na atividade antioxidante destes compostos em emulsões poderá dever-se à diferente distribuição destes nas mesmas.

Avaliou-se posteriormente a eficácia antioxidante dos diversos compostos em emulsões através do teste da estufa de Schaal, verificando-se que esta aumentou acentuadamente com a esterificação do ácido clorogénico. A capacidade antioxidante aumentou do clorogenato de metilo até ao clorogenato de dodecilo, diminuindo para o clorogenato de hexadecilo. Dado que o derivado mais hidrofóbico não é o que apresenta maior eficácia nas emulsões estudadas, estes resultados não obedecem à teoria do paradoxo polar. Verificou-se também que a atividade antioxidante é superior para o composto que apresentou a maior percentagem na interface.

Avaliou-se o efeito da concentração de emulsionante na estabilidade oxidativa das emulsões. Verificou-se que pode ocorrer uma diminuição da estabilidade com o

aumento da percentagem de emulsionante. Embora ocorra um aumento da quantidade do antioxidante na interface com o aumento da quantidade de emulsionante, ocorre igualmente uma diluição do antioxidante que se encontra na interface. O resultado da atividade antioxidante dependerá assim de um balanço entre o aumento da quantidade do antioxidante na interface e da diluição que ocorre.

Foi possível comparar diretamente os resultados de distribuição dos antioxidantes nas emulsões com a sua eficácia antioxidante. Os resultados mostram variações paralelas dos parâmetros, encontrando-se um máximo para o derivado C12, proporcionando-se uma explicação convincente e natural para o “efeito *cut-off*” observado, baseado na distribuição dos antioxidantes nas emulsões.

Os resultados obtidos indicam que antioxidantes que apresentam uma maior concentração na região interfacial são os mais eficazes na inibição a oxidação lipídica.

Verificou-se igualmente que quando os AOs estão presentes na mesma percentagem na interface, o AO que se encontra em maior percentagem na fase oleosa tem melhor atividade antioxidante.

Palavras-chave: Oxidação lipídica; antioxidantes; ácido clorogénico; emulsão; método cinético; constantes de partição; distribuição; emulsionante; DPPH^{*}; teste de estufa de Schaal; eficácia antioxidante.

Abstract

Since the lipid oxidation in emulsions is initiated at the interfacial region, the location of an antioxidant in a given emulsified system is crucial for its efficiency on inhibiting lipid oxidation. Therefore, an increase in the amount of antioxidants in the emulsion's interfacial should give, as a consequence, an improved oxidative stability to the emulsion. In order to optimise the activity of molecules with antioxidant properties in emulsions covalente modification of phenols has been done to modulate their hydrophobicity and to obtain functionalised phenolic compounds with affinity to the interfacial region of the emulsion.

Therefore, in this work a number of chlorogenic acid esters (C1-C16) were synthesized by esterification, catalized by acid or enzymatic. Yields ranged between 16 % and 72 %, depending on the synthesized compound.

The distribution of chlorogenic acid and its esters in emulsions was determined using a kinetic method, that did not require the isolation of the three regions of emulsions, thus providing a good estimate of the two partition constants that describe the distribution of the antioxidant between the regions oil/interfacial (P_O^I) and aqueous/interfacial (P_W^I) of emulsions olive oil/tween 20/water. The kinetic method used is based on the reaction of ion 4 - hexadecyl benzenediazonium, located exclusively at the interfacial region, and the antioxidant. The obtained results were then interpreted by on the pseudophase kinetic model applied to emulsions. The observed rate constant (k_{obs}) for the reaction was determined through a derivatization method based on the reaction of unreacted arenediazonium ions, with a suitable coupling agent (NED.2HCl) that produces a stable azo dye whose absorbance can be measured by spectrophotometry.

The partition constants P_W^O determined in a binary system of olive oil/water show that, for the chlorogenic acid esters, the hydrophobicity increases with the increase of the alkyl chain and therefore its solubility in olive oil also increases.

In an emulsified system, the results show that chlorogenic acid distribute only between the aqueous and interfacial regions, with a $P_W^I = 40,58$. Methyl and butyl chlorogenates are distributed between the aqueous and interfacial regions having partition constants higher than the one for chlorogenic acid, with values of $P_W^I = 78,36$ and $P_W^I = 140,60$ respectively. The derivatives octyl, decyl, dodecyl and hexadecyl chlorogenates are distributed only between the oil and interfacial regions, having therefore a single partition constant, being the obtained value of P_O^I of 110,71, 124,31, 158,51 and 89,28 respectively. With the increase of the alkyl chain, the P_O^I increased until a maximum for the dodecyl chlorogenate, decreasing then for the hexadecyl

chlorogenate. With the values of P_A^I and P_O^I determined, it was then possible to calculate the percentage of chlorogenic acid and its esters in each region of the emulsions olive oil/Tween 20/water. Depending of the emulsifier fraction used, the percentage of chlorogenic acid in the interfacial region ranged between 25 % and 72 %, being the remaining quantity of the compound only in the aqueous phase. For the methyl and butyl chlorogenates, the percentage presente at the interfacial ranged between 40 % and 85 % and 54 % and 91 %, respectively, being the remaining quantity distributed in the aqueous phase. For octyl, decyl, dodecyl and hexadecyl chlorogenates, the percentages at the interface ranged between 59% and 92 %, 62 % and 93 %, 67 % and 95 % and 53 % and 91 %, respectively, with the remaining compounds found only in the oil phase.

The antioxidant activity of these compounds was studied through the DPPH test and Schaal Oven Test. The antiradicalar activity in a methanolic solution was determined through the DPPH method, where it was found that after 5 minutes of reaction there were no substantial differences in the antiradicalar activity of the chlorogenic acid and its derivatives, as a consequence of their similar phenolic moiety. The similarity in reactivity shows that the possible difference in antioxidant activity between these compounds in emulsions may be due to their different distribution within them.

Furthermore, the antioxidant efficiency of the various compounds in emulsions was evaluated through Schaal's Oven test, where it was found that it is greatly increased with chlorogenic acid's esterification. The antioxidant capacity increased from the methyl chlorogenate to the dodecyl chlorogenate, decreasing for hexadecyl chlorogenate. Since the most hydrophobic derivative is not the one that presents the greatest efficiency in the studied emulsions, these results do not fit into the polar paradox theory. It was also found that the antioxidant activity is higher for the compounds that are present at the interface with the highest value of P_O^I .

The effect of emulsifier concentration in the emulsion oxidative stability was evaluated. It was confirmed that the stability may decreases with the increase in the emulsifier percentage. With increase of the emulsifier volume an increase of the amount of emulsifier occurs in the interfacial region. However it also occurs a dilution of the antioxidant that is present at the interfacial region. Therefore the result of the antioxidant activity will depend, on the balance between the increase in antioxidant quantity in the interfacial region and the dilution that occurs. It was possible to directly compare the results of the antioxidants distribution in the emulsions along with their antioxidant efficiency. The results show parallel variations of the parameters, with a maximum found for the derivative C12, thus providing a realistic and convincing explanation for the noticed "cut off effect", based on the distribution of antioxidants in emulsions.

The results show that antioxidants that are present at higher concentration at the interfacial region are the most effective ones in inhibiting lipid oxidation.

It was also observed that when two antioxidants are present at the interface in the same concentration, the one that also distributes into the oil phase will have the best antioxidant activity.

Keywords: Lipid oxidation; antioxidants; chlorogenic acid; emulsion; kinetic method; partition constant; distribution; emulsifier; DPPH[•]; schaal's Oven test; antioxidant efficiency.

Índice geral

Agradecimentos	V
Resumo	VII
Abstract	XI
Índice de esquemas	XIX
Índice de figuras	XXI
Índice de tabelas	XXV
Lista de abreviaturas e símbolos	XXVII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Lípidos	3
1.2 Oxidação lipídica	3
1.2.1 Mecanismos de oxidação	4
1.2.2 Decomposição dos hidroperóxidos	6
1.2.3 Fatores que influenciam a velocidade da oxidação lipídica nos alimentos	8
1.3 Antioxidantes: inibidores da oxidação lipídica	9
1.3.1 Ácido clorogénico	12
1.4 Previsão da eficácia dos antioxidantes em sistemas emulsionados: importância da região interfacial	13
1.5 Distribuição de antioxidantes em emulsões alimentares modelo	16
1.5.1 A partição de antioxidantes em emulsões	16
1.5.2 Método cinético utilizado para determinar a distribuição de antioxidantes em emulsões	18
1.6 Avaliação da capacidade antioxidante	28
1.6.1 Avaliação da capacidade antiradicalar pelo método do DPPH*	28
1.6.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método da estufa de Schaal	29
2. OBJETIVO	3
3. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	35

3.1 Síntese dos ésteres derivados do ácido clorogénico	39
3.1.1 Métodos e reagentes	39
3.1.2 Procedimento experimental	39
3.1.3 Caracterização espectroscópica dos ésteres derivados do ácido clorogénico	41
3.2 Obtenção de azeite sem antioxidantes (tocoferóis e outros compostos fenólicos) a utilizar na preparação das emulsões modelo.....	46
3.2.1 Remoção de compostos fenólicos.....	47
3.2.2 Remoção de tocoferóis	47
3.3 Avaliação do grau de insaturação do azeite	48
3.3.1 Procedimento experimental	49
3.3.2 Determinação do índice de iodo	49
3.4 Determinação da constante de partição de antioxidantes em sistemas binários azeite/água.....	50
3.5 Determinação da distribuição dos antioxidantes em emulsões modelo.....	52
3.5.1 Preparação da solução de agente copulante dicloridrato de N-(Naft-1-il) etilenodiamina (NED.2HCl)	52
3.5.2 Preparação do sal de arenodiazónio	52
3.5.3 Preparação de emulsões	53
3.5.4 Determinação das constantes de velocidade k_{obs} das emulsões	53
3.6 Determinação da atividade antiradicalar	54
3.6.1 Método do DPPH• (meios homogéneos).....	54
3.6.2 Teste da estufa de Schaal (meios heterogéneos)	55
3.7 Análise estatística	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
4.1 Síntese dos derivados do ácido clorogénico	59
4.2 Distribuição do ácido clorogénico e dos seus derivados em sistemas binários azeite/ água.....	60
4.2.1 Determinação da Constante de Partição P_A^O	60
4.3 Distribuição do ácido clorogénico em emulsões azeite/ tampão citrato (o/a)	62

4.3.1 Determinação de k_{obs} mediante o método de derivatização e cálculo de P_A^I do ácido clorogénico	62
4.3.2 Determinação da distribuição do ácido clorogénico entre a região aquosa e interfacial	64
4.4 Distribuição do clorogenato de etilo e butilo em emulsões azeite/ tampão citrato (o/a).....	65
4.4.1 Determinação de k_{obs} mediante o método de derivatização e cálculo de P_A^I	65
4.4.2 Determinação da distribuição do clorogenato de etilo e butilo pelas regiões aquosa e interfacial	67
4.5 Distribuição do clorogenato de octilo, decilo, dodecilo e hexadecilo em emulsões azeite/ tampão citrato (o/a)	68
4.5.1 Determinação de k_{obs} mediante o método de derivatização e cálculo de P_O^I	68
4.5.2 Determinação da distribuição do clorogenato de octilo, decilo, dodecilo e hexadecilo pelas regiões oleosa e interfacial	72
4.6 Análise comparativa da distribuição do ácido clorogénico e seus derivados	73
4.7 Avaliação da atividade antioxidante	76
4.7.1 Avaliação da atividade antiradicalar – Método do DPPH•	76
4.7.2 Teste da estufa de Schaal	79
4.8 Avaliação do grau de insaturação do azeite	83
4.9 Correlação entre a distribuição dos antioxidantes na emulsão com a eficácia antioxidante	84
5. CONCLUSÕES	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

Índice de esquemas

Esquema 1 - Possíveis reações no processo de autoxidação, nas etapas de iniciação e propagação.....	5
Esquema 2 - Possíveis reações no processo de autoxidação, na etapa de terminação.	5
Esquema 3 - Reações de fotoxidação, para sensibilizadores do Tipo I.	6
Esquema 4 - Reações de fotoxidação, para sensibilizadores do Tipo II.	6

Índice de figuras

Figura 1 - Estrutura química do ácido linoleico.....	3
Figura 2 - Decomposição dos hidroperóxidos em compostos secundários voláteis ^[11] .	7
Figura 3 - Produção do radical fenoxilo estabilizado por ressonância.....	10
Figura 4 – Estabilização do radical fenoxilo por ponte de hidrogénio.....	10
Figura 5 - Estrutura química dos derivados do ácido benzoico ^[19] .	12
Figura 6 - Estrutura química do ácido clorogénico.	12
Figura 7 - Emulsões O/A e A/O.....	13
Figura 8 - Fenómeno de interface para explicar a ação antioxidante em óleo, em emulsões O/A e emulsões A/O.	14
Figura 9 - Influência do aumento da cadeia alquílica dos ésteres derivados do ácido rosmarinico na atividade antioxidante ^[28]	15
Figura 10 - Representação esquemática da partição de um antioxidante (AO) numa mistura binária (esquerda) e num sistema multifásico (direita).....	17
Figura 11 – Estrutura química sal de arenodiazónio.	18
Figura 12 - Reação de derivatização utilizada.....	19
Figura 13 - Representação das três regiões de uma emulsão que contém um substrato AO, cuja distribuição vem definida pelas constantes de partição P_O^I e P_A^I	20
Figura 14 - Representação esquemática de uma emulsão: Φ indica a fração de volume para cada uma das regiões, AO é o antioxidante, P é a constante de partição, k_i é a constante de velocidade para a reação dos iões 16-ArN_2^+ na interface e os índices O, I e A referem-se às regiões orgânica, interfacial e aquosa, respetivamente.	21
Figura 15 - Representação esquemática da região interfacial de uma emulsão com base no modelo cinético da pseudofase que mostra a partição do antioxidante, AO, entre as regiões interfacial e oleosa.....	25
Figura 16 - Representação esquemática da região interfacial de uma emulsão com base no modelo cinético da pseudofase que mostra a partição do antioxidante, AO, entre as regiões interfacial e aquosa.	27
Figura 17 - Estrutura química do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•).....	28
Figura 18 - Vários mecanismos da reação que ocorre entre o DPPH• e o antioxidante.	29
Figura 19 - Reação do radical DPPH• com o antioxidante.....	29
Figura 20 - Curva típica de oxidação lipídica. a) Sem adição de antioxidante; b) e c) com adição de antioxidante. Atividade antioxidante de c) é maior que b). PI 1, PI 2 e PI 3 são os períodos de indução em horas ou dias.	30

Figura 21 – Mecanismos de oxidação lipídica do ácido linoleico.....	32
Figura 22 - Síntese dos ésteres derivados do ácido clorogénico.	40
Figura 23 - Estrutura numerada do éster clorogenato de metilo.....	41
Figura 24 - Estrutura numerada do éster clorogenato de etilo.....	42
Figura 25 - Estrutura numerada do éster clorogenato de propilo.	42
Figura 26 - Estrutura numerada do éster clorogenato de butilo.....	43
Figura 27 - Estrutura numerada do éster clorogenato de octilo.....	43
Figura 28 - Estrutura numerada do éster clorogenato de decilo.....	44
Figura 29 - Estrutura numerada do éster clorogenato de dodecilo.....	45
Figura 30 - Estrutura numerada do éster clorogenato de hexadecilo.....	45
Figura 31 - Esquema do procedimento experimental seguido para a remoção dos polifenóis e tocoferóis presentes no azeite.....	48
Figura 32 - Espectro de UV-vis de absorção máxima do ácido clorogénico, em concentrações crescentes.....	50
Figura 33 - Procedimento experimental seguido para a obtenção de P_A^O	51
Figura 34 - Síntese do sal de arenodiazónio.	52
Figura 35 – Tubos de ensaio em que se observa a coloração púrpura devida à formação do corante azóico.	53
Figura 37 - Placa de 96 poços utilizada no método de DPPH• com as soluções metanólicas de DPPH• e soluções metanólicas para dois antioxidantes, realizadas em quadruplicado.	55
Figura 37 - Síntese dos derivados do ácido clorogénico.....	59
Figura 38 - Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [Abs_t - Abs_{inf}]$ vs tempo. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $\Phi_1 = 0,0281$, $[16-ArN_2^+] = 2,90 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 2,8 \times 10^{-3}$ M, $[NED.2HCl] = 0,019$ M e $T = 25,5$ °C.....	62
Figura 39 - Representação de k_{obs} e $1/k_{obs}$ vs fração de emulsionante (Φ_1) com os respetivos ajustes às equações 46 e 47. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $[16-ArN_2^+] = 2,90 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 2,8 \times 10^{-3}$ M, $[NED.2HCl] = 0,019$ M e $T = 25,5$ °C.	63
Figura 40 - Variação da percentagem de ácido clorogénico nas fases aquosa e interfacial do sistema emulsionado. emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65/ Tween 20), $[16-ArN_2^+] = 2,90 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 2,8 \times 10^{-3}$ M, $[NED.2HCl] = 0,019$ M e $T = 25,5$ °C.	64
Figura 41 - Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [Abs_t - Abs_{inf}]$ vs tempo. Condições experimentais: emulsão 4:6	

- (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $\Phi_1 = 0,0154$, $[16\text{-ArN}_2^+] = 1,93 \times 10^{-4}$ M, $[C2] = 2,04 \times 10^{-3}$ M, $[\text{NED.2HCl}] = 0,019$ M e $T = 25,5^\circ\text{C}$ 65
- Figura 42 - Representação de k_{obs} e $1/k_{\text{obs}}$ vs fração de emulsificante (Φ_1) com os respectivos ajustes às equações 46 e 47. Condições experimentais são emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $[\text{NED.2HCl}] = 0,019$ M e $T = 25,0^\circ\text{C}$; para C2: $[16\text{-ArN}_2^+] = 1,93 \times 10^{-4}$ M, $[\text{AO}] = 2,00 \times 10^{-3}$ M, para C4: $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,81 \times 10^{-4}$ M, $[\text{AO}] = 3,00 \times 10^{-3}$ M. 66
- Figura 43 - Variação da percentagem do clorogenato de etilo (preto) e butilo (verde) nas regiões aquosa e interfacial do sistema emulsionado. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $T = 25^\circ\text{C}$ 67
- Figura 44 - Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [\text{Abs}_t - \text{Abs}_{\text{inf}}]$ vs tempo. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $\Phi_1 = 0,0420$, $[16\text{-ArN}_2^+] = 1,95 \times 10^{-4}$ M, $[C8] = 2,04 \times 10^{-3}$ M, $[\text{NED.2HCl}] = 0,019$ M e $T = 25,3^\circ\text{C}$ 68
- Figura 45 - Representação de k_{obs} e $1/k_{\text{obs}}$ vs fração de emulsificante (Φ_1) com os respectivos ajustes às equações 39 e 42. Condições experimentais C8-CGA: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 1,95 \times 10^{-4}$ M, $[\text{AO}] = 2,00 \times 10^{-3}$ M, $[\text{NED.2HCl}] = 0,019$ M e $T = 25,3^\circ\text{C}$; Condições experimentais C10-CGA: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 1,76 \times 10^{-4}$ M, $[\text{AO}] = 1,80 \times 10^{-3}$ M, $[\text{NED.2HCl}] = 0,019$ M e $T = 25,1^\circ\text{C}$; Condições experimentais C12-CGA: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 1,77 \times 10^{-4}$ M, $[\text{AO}] = 1,80 \times 10^{-3}$ M, $[\text{NED.2HCl}] = 0,019$ M e $T = 25,5^\circ\text{C}$; Condições experimentais C16-CGA: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 1,96 \times 10^{-4}$ M, $[\text{AO}] = 1,80 \times 10^{-3}$ M, $[\text{NED.2HCl}] = 0,019$ M e $T = 25,0^\circ\text{C}$ 69
- Figura 46 - Variação da percentagem do clorogenato de octilo (roxo), decilo (cinzento), dodecilo (azul) e hexadecilo (amarelo) nas regiões orgânica e interfacial do sistema emulsionado. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65) / Tween 20), $T = 25^\circ\text{C}$ 72
- Figura 47 - Variação da percentagem do ácido clorogénico e seus derivados nas regiões oleosa, interfacial e aquosa do sistema emulsionado. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $T = 25^\circ\text{C}$ 73
- Figura 48 - Variação da absorvância do radical DPPH \cdot ($\lambda = 515$ nm) em função do tempo, na presença de diferentes concentrações do clorogenato de metilo -○- 0,0400 mol AO / mol DPPH \cdot , -●- 0,0801 mol AO / mol DPPH \cdot , -■- 0,1201 mol AO / mol DPPH \cdot , -□- 0,1602 mol AO / mol DPPH \cdot , -▼- 0,2002 mol AO / mol DPPH \cdot , -▲- 0,2402 mol AO / mol DPPH \cdot 77

Figura 49 - Representação da variação da percentagem de DPPH• com a concentração de antioxidante (ex: clorogenato de metilo), expressa em mol AO/ mol DPPH•, para os diferentes tempos de reação, com o correspondente ajuste linear. (-●- 5 min, -●- 15 min, -■- 30 min, -■- 60 min).....	77
Figura 50 - A) Percentagem de dienos conjugados atingida em dias, para emulsões contendo 1% de emulsionante. B) Tempo (dias) para que as emulsões contendo 1% de emulsionante, atingissem o conteúdo em DC de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados. Condições experimentais de A) e B): emulsões 4:6 (Azeite/Tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), [AO] = 0,6 mM no azeite, T = 60 °C.	80
Figura 51 – Diferença observada entre o tempo (dias) para que as emulsões com antioxidante e as emulsões controlo, contendo 0,5%, 1% e 2% de emulsionante, atingissem o conteúdo em DC de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão) Condições experimentais: emulsões 4:6 (Azeite/ Tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20) e [AO] = 0,6 mM no azeite, T = 60 °C.	82
Figura 52 - Correlação da distribuição e da eficácia antioxidante com a hidrofobicidade dos AOs para $\Phi_i=0,01$	85

Índice de tabelas

Tabela 1 - Resultados experimentais das massas e rendimentos obtidos nas sínteses dos derivados do ácido clorogénico.....	59
Tabela 2 - Percentagem dos diferentes antioxidantes presentes na fase aquosa e orgânica de uma mistura binária azeite/água e o valor da constante de partição P_A^O ..	61
Tabela 3 - Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da Figura 39 à equação 47.....	63
Tabela 4 - Valores de P_A^I e k_I obtidos para a emulsão 4:6 a partir do ajuste dos dados da Figura 39 à equação 47.	63
Tabela 5 - Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da Figura 42 à equação 47.....	66
Tabela 6 - Valores de P_A^I e k_I obtidos para a emulsão 4:6 a partir do ajuste dos dados da Figura 42 à equação 47.	66
Tabela 7 - Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da Figura 45 à equação 42.....	69
Tabela 8 - Valores de P_O^I e k_I obtidos para a emulsão 4:6 a partir do ajuste dos dados da Figura 45 à equação 42.	71
Tabela 9 - Percentagem (em valor aproximado) do ácido clorogénico e dos seus derivados para as frações de emulsionante de 0,005 e 0,042, nas três regiões da emulsão.	74
Tabela 10 - Valores de P_A^I , P_O^I , k_I , e P_A^O , obtidos para o ácido clorogénico e seus derivados.	74
Tabela 11 - Valores de EC_{50} obtidos para diferentes tempos de reação.....	78
Tabela 12 - Percentagem (em valor aproximado) do ácido clorogénico e dos seus derivados para as frações de emulsionante de 0,005, 0,01 e 0,02, nas três regiões da emulsão.	83
Tabela 13 - Resultados obtidos na determinação do índice de iodo.	84

Lista de abreviaturas e símbolos

TAGs - Triacilgliceróis

AO - Antioxidante

ROOH – Hidroperóxidos

M⁺ - Iões metálicos

RO[•] - Radical alcóxido

ROO[•] - Radical peróxido

RH – Ácido gordo insaturado

R[•] - Radical livre do ácido gordo

BHA - Butilhidroxianisol

BHT- Butilhidroxitolueno

A/O - Emulsão água em óleo

O/A - Emulsão óleo em água

P_A⁰ - Constante de partição de um antioxidante entre as regiões aquosa e oleosa

AO_o – Fração de antioxidante na região oleosa

AO_A – Fração de antioxidante na região aquosa

16-ArN₂⁺ - sal de arenodiazólio

DPPH[•] - Radical 2,2'-difeníl-1-picrilhidrazilo

TAH – Transferência de um átomo de hidrogénio

TE – Transferência de um eletrão

FA – Fase aquosa

FO – Fase oleosa

IF - Interface

P_A^I - Constante de partição de um antioxidante entre as regiões aquosa e interfacial

P_O^I - Constante de partição de um antioxidante entre as regiões oleosa e interfacial

AO_I – Fração de antioxidante na região interfacial

MCP - Modelo cinético da pseudofase

MCPS - Modelo cinético da pseudofase simplificado

¹H-RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Protão

¹³C-RMN - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

TLC - Cromatografia em camada fina

UV-Vis- Espectrofotometria do Ultravioleta Visível

CGA - Ácido Clorogénico

C1 – Clorogenato de metilo

C2 – Clorogenato de etilo

C3 – Clorogenato de propilo

C4 – Clorogenato de butilo

C8 – Clorogenato de octilo

C10 – Clorogenato de decilo

C12 – Clorogenato de dodecilo

C16 – Clorogenato de hexadecilo

IP - Índice de peróxidos

PI - Período de indução

NED.2HCl – dicloridrato de N-(Naft-1-il) etilenodiamina

BF₃.Et₂O – Eterato de trifluoreto de boro

BuONO – nitrito de n-butilo

THF – Tetrahidrofurano

DC - Dienos Conjugados

Abs - Absorvância

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lípidos

Os lípidos são um grupo heterogêneo de moléculas orgânicas, componentes de sistemas vivos, geralmente solúveis em solventes pouco polares e insolúveis em água. Incluídos nesta classe de compostos estão os triacilgliceróis (TAGs) presentes nos óleos ou gorduras alimentares e também os fosfolípidos, que estão associados às membranas celulares ^[1]. São os componentes principais do tecido adiposo, e em conjunto com as proteínas e hidratos de carbono, constituem os principais componentes estruturais de todas as células vivas ^[2].

Os lípidos alimentares desempenham um papel fundamental quanto à qualidade de determinados produtos alimentares, particularmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis. Estas propriedades incluem o sabor, o aroma, a cor, a textura e o paladar. Por outro lado, os lípidos alimentares também conferem valor nutritivo aos alimentos, fornecendo uma fonte de energia metabólica, de vitaminas lipossolúveis (ex: A, D, E e K) e ácidos gordos essenciais (ácidos linoleico, figura 1, e linolénico). Estes compostos são uma fonte de combustível para os organismos vivos, tanto de origem animal e vegetal, fornecendo cerca de 9 kcal/g, ou um pouco mais de duas vezes, o conteúdo calórico de proteínas e hidratos de carbono ^[1].

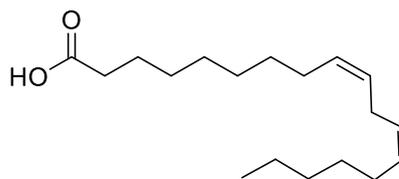


Figura 1 - Estrutura química do ácido linoleico.

Quando oxidados, os lípidos podem gerar produtos primários e secundários de oxidação que podem afetar negativamente as suas funções surgindo assim a necessidade de proteger a integridade biológica e química destas moléculas ^[1].

1.2 Oxidação lipídica

A oxidação de lípidos insaturados tem sido uma área de extrema importância, uma vez que está relacionada com a alteração dos alimentos, através da produção de substâncias tóxicas e/ou substâncias que conferem sabor e cor indesejáveis ^[3]. Este fenómeno químico inevitável e espontâneo, tem uma implicação direta no valor

comercial e funcional quer das matérias primas lipídicas quer de todos os produtos que a partir destas são formulados, sejam eles alimentares, cosméticos ou farmacêuticos [4].

A oxidação lipídica tem o seu início quando os lípidos perdem a sua proteção natural antioxidante, sofrendo uma série de modificações do tipo oxidativo, resultantes de processos de transformação e armazenamento, e tem como principal consequência a modificação da sua cor original e o aparecimento de odores e gostos característicos a ranço. Estas características representam, naturalmente, para a indústria e para o consumidor uma forte causa de depreciação e rejeição. No entanto este fenómeno oxidativo pode ser diminuído de tal forma que se pode obter um aumento significativo da sua estabilidade e da vida útil do produto final [4, 5].

Os fenómenos de oxidação lipídica ocorrem através de diversos mecanismos reacionais e extremamente complexos, que dependem do tipo de estrutura lipídica e o meio onde esta se encontra. O tipo de interface entre os lípidos e o oxigénio, o grau de insaturação presente, a exposição à luz e ao calor, a presença de agentes pró-oxidantes (ex: iões metálicos de transição) ou de antioxidantes, são fatores determinantes na estabilidade oxidativa dos lípidos [4].

A degradação dos lípidos, normalmente denominada por ranço no que diz respeito a produtos alimentares, pode ser devida a:

- Reações hidrolíticas (ranço hidrolítico ou lipólise)
- Reações com o oxigénio atmosférico (autooxidação e fotooxidação)
- Oxidação por lipoxigenases

1.2.1 Mecanismos de oxidação

Oxidação lipídica é um termo geralmente utilizado para descrever uma complexa sequência de interações químicas entre os grupos acilo dos ácidos gordos insaturados dos lípidos com o oxigénio, e pode ocorrer de duas formas diferentes: autooxidação e fotooxidação [6].

- **Autooxidação**

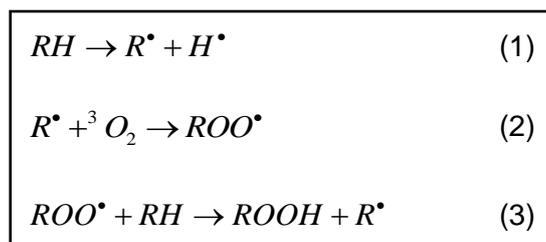
A autooxidação é o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras, sendo caracterizada pela deterioração oxidativa de ácidos gordos insaturados, por meio de um mecanismo radicalar complexo em cadeia. Esta cadeia inclui reações de iniciação, propagação e terminação [7].

A etapa de iniciação gera radicais livres a partir do substrato. Ocorre a perda de um radical hidrogénio ($H\bullet$) no carbono α da molécula de ácidos gordos insaturados (RH)

formando um radical lipídico (R^\bullet). Este radical altamente reativo pode reagir com o oxigénio atmosférico (3O_2), produzindo um radical peroxilo (ROO^\bullet) [7].

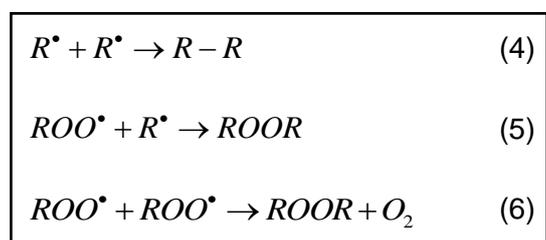
Na etapa de propagação, os radicais alquilperoxilo reagem com outras moléculas de lípidos insaturados para formar hidroperóxidos ($ROOH$), e um novo radical lipídico instável. Como um novo radical livre é formado a cada passo, maior será o número destas espécies acumuladas na gordura ao longo do tempo, gastando-se quantidades consideráveis de oxigénio a partir do ar [8]. O radical lipídico assim propagado, vai reagir com o oxigénio para produzir um outro radical alcóxilo (RO^\bullet), resultando assim num processo autocatalítico [7].

As reações anteriormente descritas para o mecanismo de autoxidação encontram-se representadas no esquema 1.



Esquema 1 - Possíveis reações no processo de autoxidação, nas etapas de iniciação e propagação.

Esta cadeia de reações prossegue até se esgotarem os ácidos gordos insaturados ou até radicais livres se combinarem para formar um produto não radicalar. Isto compreende a etapa de terminação, que é representada no esquema 2 [7].



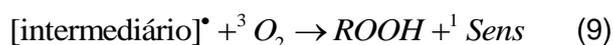
Esquema 2 - Possíveis reações no processo de autoxidação, na etapa de terminação.

- **Fotoxidação**

O mecanismo de fotoxidação de lípidos insaturados é promovido essencialmente pela radiação ultravioleta com a presença de foto-sensibilizadores e do oxigénio atmosférico, produzindo-se oxigénio singleto, 1O_2 , que reage diretamente com os lípidos formando-se hidroperóxidos [4]. Pigmentos existentes em alguns alimentos, como a clorofila e a rivoflavina, servem como foto-sensibilizadores.

Existem dois tipos de sensibilizadores a considerar na fotoxidação: Tipo I e Tipo II.

Sensibilizadores do Tipo I: sensibilizadores que atuam como radicais, quando ativados pela luz ($^3\text{Sens}^*$), reagindo diretamente com o substrato lipídico (RH) através do átomo de hidrogénio ou por transferência eletrónica, dando origem a intermediários radicalares, que por sua vez reagem com o oxigénio (esquema 3) [7].



Esquema 3 - Reações de fotoxidação, para sensibilizadores do Tipo I.

Sensibilizadores do Tipo II: sensibilizadores que, estando no estado tripleto, interagem com o oxigénio por transferência eletrónica originando o oxigénio singleto ($^1\text{O}_2^*$), que por sua vez reage com lípidos insaturados (esquema 4) [7].



Esquema 4 - Reações de fotoxidação, para sensibilizadores do Tipo II.

Os hidroperóxidos formados na fotoxidação são decompostos por mecanismos semelhantes daqueles formados na autoxidação [7].

1.2.2 Decomposição dos hidroperóxidos

Os hidroperóxidos são os produtos primários resultantes dos processos de oxidação lipídica [9]. Estes compostos, por terem características inodoras e insípidas, não têm consequência direta no aroma dos alimentos. No entanto, dado que são muito instáveis, facilmente se decompõem originando compostos voláteis (aldeídos, álcoois e cetonas) - principais responsáveis pelo odor a ranço, e compostos não voláteis (compostos poliméricos) - produtos secundários da oxidação [10, 11]. Por isso, com a

formação destes compostos, a qualidade dos alimentos decresce consideravelmente, tanto do ponto de vista organolético como nutricional.

A figura 2 é um esquema representativo da decomposição dos hidroperóxidos em compostos voláteis.

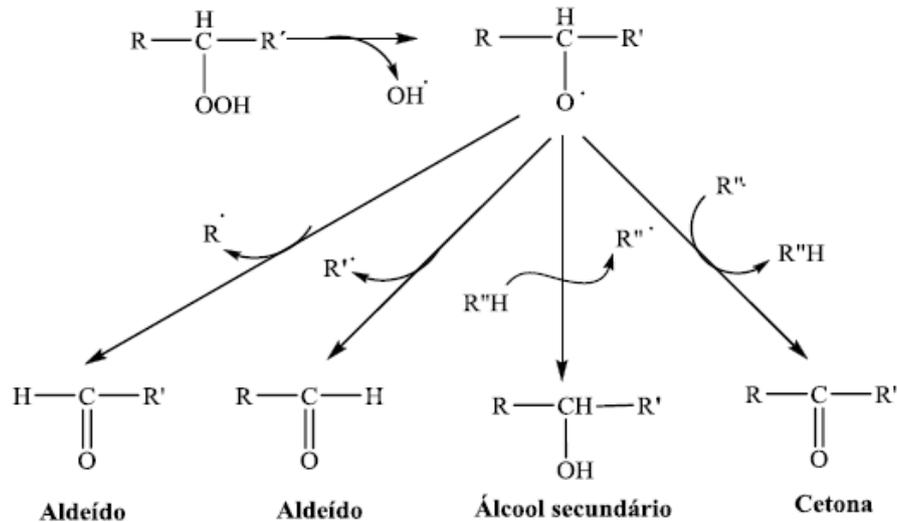
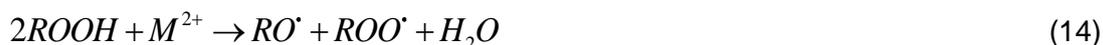


Figura 2 - Decomposição dos hidroperóxidos em compostos secundários voláteis ^[11].

A rutura homolítica da ligação O-O do hidroperóxido origina radicais alcoilo (RO•) e hidroxilo (HO•) muito reativos desencadeando a formação de aldeídos. Dependendo do local onde a rutura na cadeia do radical ocorre, pode formar-se um aldeído volátil de cadeia mais curta, ou ficar unido à parte glicérica da molécula, originando neste caso, aldeídos glicéricos não voláteis e não aromáticos. Os aldeídos voláteis (ex: hexanal) são considerados produtos de oxidação secundários muito importantes, pois são compostos associados ao cheiro a ranço ^[11, 12].

Os álcoois secundários formam-se quando o radical alcoilo ataca um átomo de hidrogénio de outro ácido gordo insaturado (R''H), originando um novo radical (R''•). Em alternativa pode ocorrer a transferência de um hidrogénio para outro radical livre, terminando a reação em cadeia e dando lugar ao aparecimento de cetonas ^[11, 12].

Os metais de transição como o ferro e o cobre, presentes nos óleos e gorduras, catalisam a decomposição dos hidroperóxidos. Esta decomposição origina novos radicais livres ^[11].



1.2.3 Fatores que influenciam a velocidade da oxidação lipídica nos alimentos

Como referido anteriormente, a oxidação dos lípidos ocorre por diversos e complexos mecanismos reacionais, os quais se relacionam com o tipo de estrutura e o meio onde esta se encontra [11, 12].

A velocidade de autooxidação depende do número de ligações duplas presentes no lípido. Devido a este fator, seria de esperar que os óleos vegetais que possuem níveis mais elevados de ésteres de ácidos gordos insaturados, exibissem maior suscetibilidade à deterioração relativamente às gorduras de origem animal que, por sua vez, apresentam níveis de ésteres de ácidos gordos saturados mais elevados. No entanto, verifica-se que os óleos tendem muitas vezes a oxidar mais lentamente isto porque contêm quantidades significativas maiores de tocoferóis, que atuam como antioxidantes naturais [11, 12].

O mecanismo de oxidação varia também com a temperatura. A temperaturas mais elevadas as reações de polimerização e ciclização são mais importantes, uma vez que a solubilidade do oxigénio diminui com a temperatura, tornando-se num fator limitante durante a formação de hidroperóxidos. Deste modo, o aumento da pressão de oxigénio só se torna importante a altas temperaturas. O aumento da temperatura provoca também muitas vezes um aumento da contaminação por metais e destrói possíveis compostos antioxidantes existentes na gordura.

A luz é também um fator determinante na estabilidade oxidativa dos lípidos. Sabe-se que compostos minoritários como a clorofila (sensibilizador) no azeite virgem, podem ser excitados eletronicamente devido à absorção da luz. Consequentemente, a molécula excitada é capaz de transferir o seu excesso de energia a uma molécula de 3O_2 (oxigénio no seu estado fundamental), originando o oxigénio singleto (1O_2) que reage com as ligações olefínicas. A prevenção da fotooxidação durante o armazenamento dos alimentos é, deste modo, importante para assegurar a sua elevada estabilidade oxidativa [13].

1.3 Antioxidantes: inibidores da oxidação lipídica

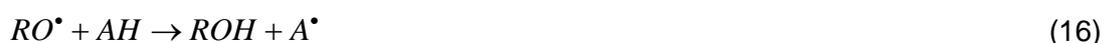
Existe uma variedade de géneros alimentícios que são suscetíveis à oxidação, quando em contato com o ar. As gorduras, especialmente as insaturadas, (óleos e margarinas), e os derivados de frutos (sumos, conservas de frutos e refrigerantes), constituem os dois principais grupos de alimentos que necessitam de proteção contra a oxidação [14]. Conseguir retardar a oxidação tornou-se numa tarefa de grande importância na indústria alimentar e, claro, para o consumidor.

Atualmente existem vários métodos que são capazes de retardar ou mesmo inibir a oxidação lipídica, como impedir o contato com o oxigénio, diminuir a temperatura de armazenamento e processamento, recorrer à inativação das enzimas que catalisam a oxidação, reduzir a pressão de oxigénio, etc...[15]. De todos os métodos de proteção, o mais eficaz e simples contra a oxidação lipídica é, sem dúvida alguma, o uso de antioxidantes (AOs).

Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes em sistemas lipídicos em pequenas quantidades, impedem ou retardam a sua oxidação, através de reações com os radicais livres. Este tipo de substâncias podem ocorrer como constituintes naturais de alimentos, ou podem ser intencionalmente adicionados aos produtos ou ainda formados durante o processamento [15].

Os antioxidantes podem ser agrupados de acordo com o seu mecanismo de ação:

A. Antioxidantes primários ou “chain-breaking”: são normalmente dadores de hidrogénio (H) que retardam ou inibem a etapa de iniciação ou interrompem a etapa de propagação da autooxidação. Estes antioxidantes (AH) reagem com os lípidos e com os radicais peróxido e alcóxido e convertem-nos em produtos não-radicalares mais estáveis. Doam um átomo de hidrogénio aos radicais lipídicos produzindo derivados lipídicos e um radical do antioxidante (A[•]) que é, no entanto, mais estável e menos reativo que o radical lipídico [16].



A maioria dos antioxidantes primários são fenóis mono e polihidroxilados. Os fenóis monohidroxilados são moléculas que por si só não são ativas, mas a substituição

com grupos alquilo nas posições 2, 4 ou 6 aumenta a densidade eletrónica no grupo hidroxilo por um efeito indutivo, aumentando deste modo a sua reatividade com o radical lipídico.

O radical formado a partir do antioxidante é pouco reativo pois encontra-se estabilizado por deslocalização do eletrão desemparelhado por todo o anel aromático, como mostra a figura 3 [12, 16].

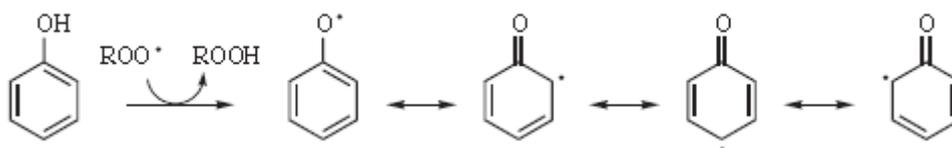


Figura 3 - Produção do radical fenoxilo estabilizado por ressonância.

Assim, a eficácia do antioxidante vai depender da estabilidade por ressonância dos radicais fenoxilo.

Em geral, a introdução de um segundo grupo hidroxilo na posição 2 ou 4 de um fenol aumenta a sua atividade antioxidante.

Os catecóis, 1,2-dihidroxibenzeno, e os seus derivados apresentam atividade antioxidante mais acentuada em comparação aos orto-metoxifenóis uma vez que podem doar dois hidrogénios e originar produtos não radicalares, normalmente quinonas.

O que faz variar a atividade verificada no catecol daquela observada nos orto-metoxifenóis é a elevada estabilização do radical formado a partir do catecol. A eficácia dos catecóis é aumentada pela estabilização do radical fenoxilo através de uma ligação de hidrogénio intramolecular (figura 4), que não é possível ocorrer nos orto-metoxifenóis. Por outro lado, ao contrário dos catecóis, os orto-metoxifenóis apenas conseguem ceder um hidrogénio para neutralizar o radical [17].

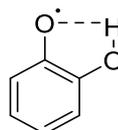


Figura 4 – Estabilização do radical fenoxilo por ponte de hidrogénio.

Como referido anteriormente, os antioxidantes primários reagem com os radicais lipídicos, tornando-os em produtos mais estáveis.

Os antioxidantes (AH) inibem a oxidação reagindo não só com os radicais peróxilo (ROO^\bullet) terminando assim a propagação da cadeia, como também com radicais alcóxilo (RO^\bullet) inibindo a sua decomposição e deste modo a formação de compostos indesejáveis, como os aldeídos [12].

B. Antioxidantes secundários ou preventivos: reduzem a velocidade do processo de iniciação da oxidação, impedindo ou retardando a formação de radicais livres resultantes da decomposição dos hidroperóxidos através de vários mecanismos tais como a complexação de metais e absorção de radiação UV [12, 18].

A maioria dos antioxidantes usados comercialmente são compostos fenólicos que podem ser sintéticos ou naturais, atuando de uma forma geral como antioxidantes primários.

Antioxidantes de origem sintética como o butilhidroxianisol (BHA) e butilhidroxitolueno (BHT), têm revelado grande capacidade de proteção contra os fenómenos oxidativos. No entanto, questões que se relacionam diretamente com a toxicidade de alguns desses compostos (ex: suspeita de atuação do BHT como promotor da carcinogénese) conduziram à sua rejeição generalizada, independentemente das sua alta estabilidade, baixo custo e outras vantagens tecnológicas [5, 12].

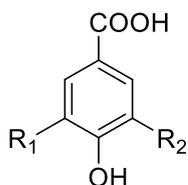
O uso de plantas e dos seus extratos para preservar os alimentos tem sido efetuada desde a pré-história e, recentemente, tem sido alvo de uma investigação intensiva, pelo facto de se querer reduzir o uso de compostos sintéticos como aditivos alimentares, devido aos seus potenciais efeitos tóxicos [18].

Assim, devido à insatisfação existente quanto à segurança dos compostos antioxidantes atualmente usados em produtos alimentares, cosméticos ou farmacêuticos, têm sido realizadas investigações visando o desenvolvimento de novos antioxidantes, obtidos não só a partir de fontes naturais, mas também por síntese química total ou por modificação molecular [5].

Os ácidos fenólicos do tipo benzoico (figura 5) encontram-se nas plantas, fazendo parte do seu sistema antioxidante endógeno. Estes compostos encontram-se em muitos alimentos sobretudo na forma de ésteres de ácidos orgânicos ou de glicosídeos, e raramente como ácidos livres, influenciando de modo significativo as propriedades organolépticas, de estabilidade e o valor nutricional destes alimentos [5, 12].

A bioatividade verificada neste grupo de compostos, nomeadamente anti-inflamatória, antiviral, anticarcinogénica, antimutagénica e antioxidante, justificam o

potencial interesse da sua aplicação em diferentes áreas, nomeadamente alimentar e farmacêutica [5].



R ₁	R ₂	ÁCIDO FENÓLICO
OCH ₃	H	Ácido vanílico
OCH ₃	OCH ₃	Ácido siríngico

Figura 5 - Estrutura química dos derivados do ácido benzoico [19].

1.3.1 Ácido clorogénico

De entre uma enorme variedade de antioxidantes existentes na natureza, este trabalho utilizou como objeto de estudo o ácido clorogénico, cuja estrutura química se encontra representada na figura 6.

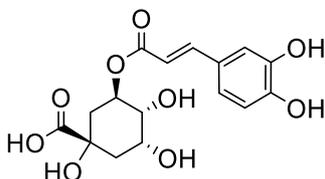


Figura 6 - Estrutura química do ácido clorogénico.

O ácido clorogénico é uma molécula que se encontra presente no café verde e, que devido às suas propriedades antibacterianas, terapêuticas e antioxidantes revela ter uma enorme aplicabilidade [20].

Como é possível observar pela sua estrutura química (figura 6), este antioxidante derivado do ácido cafeico, é muito hidrofílico devido à presença de cinco grupos hidroxilo. De modo a aumentar a hidrofobicidade do ácido clorogénico é possível proceder à sua esterificação com álcoois de cadeia alquílica linear de vários tamanhos.

1.4 Previsão da eficácia dos antioxidantes em sistemas emulsionados: importância da região interfacial

Uma emulsão pode ser definida como uma dispersão coloidal formada por dois líquidos imiscíveis (geralmente óleo e água) com um dos líquidos dispersos no outro sob a forma de gotas de dimensões entre 0,1 e 100 μm . Se o sistema emulsionado consiste na dispersão de gotículas de óleo em água, trata-se de uma emulsão óleo-em-água (O/A) (ex: maionese, leite). Se se tratar de gotículas de água dispersas em óleo estamos na presença de uma emulsão água-em-óleo (A/O) (ex: margarinas, manteiga) [14, 21]. A figura 7 ilustra os dois tipos de emulsões mencionados.

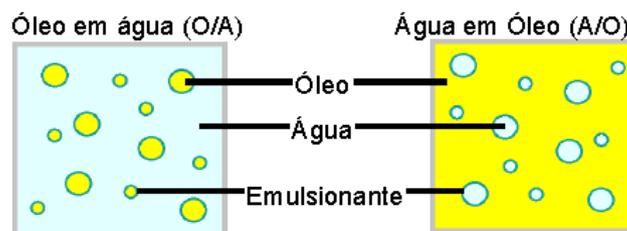


Figura 7 - Emulsões O/A e A/O.

As emulsões podem ser divididas em três diferentes regiões: a fase contínua, a região interfacial, e o interior das gotículas e a sua estabilidade física depende da composição destas três fases [21]. As emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis pelo que requerem a utilização de emulsionantes, substâncias que atuam na interface óleo/água reduzindo a tensão superficial e permitindo a formação de uma emulsão de menor energia interna, aumentando assim a sua estabilidade [12].

A estrutura química de um agente emulsionante, em geral, inclui uma porção hidrofóbica (tal como uma longa cadeia alquílica) e uma parte hidrofílica (iónica ou polar). A porção hidrofóbica fica normalmente em contato com o óleo enquanto a porção hidrofílica com a fase aquosa, formando uma dispersão de micro-gotas. Estas substâncias são igualmente usadas em emulsões para facilitar a dispersão de aromatizantes hidrofóbicos, prevenir a formação de cristais de gelo em produtos congelados e melhorar o volume e uniformidade de alguns produtos [14].

A oxidação lipídica em emulsões é bastante complexa e é afetada pelo fenómeno interfacial, assim como pelos constituintes antioxidantes e pró-oxidantes presentes tanto nas duas fases, como na sua interface [22]. Assim, diversos fatores tais como, a presença de metais e outras substâncias, o pH, a pressão de O_2 , o tamanho das gotículas, a concentração e a natureza dos emulsionantes, afetam a velocidade de oxidação das

emulsões [23]. A composição da fase aquosa é igualmente importante na oxidação de emulsões, pois nesta fase podem existir tanto antioxidantes como pró-oxidantes, dependendo das suas propriedades químicas, das condições ambientais e da sua interação com os componentes lipídicos [12].

Os antioxidantes que apresentam atividade antioxidante nos óleos vegetais apresentam normalmente atividade antioxidante em emulsões. No entanto, esta atividade poderá ser maior ou menor uma vez que podem exibir afinidades diferentes para as interfaces ar-óleo e óleo-água, o que irá afetar significativamente a sua atividade antioxidante nestes sistemas lipídicos. O “paradoxo polar” descreve o contraste que normalmente ocorre no comportamento de antioxidantes de diferentes lipossolubilidades quando usados em óleo ou em emulsões. Em emulsões O/A, os antioxidantes hidrofílicos (polares) são, geralmente, menos eficazes do que os antioxidantes lipofílicos, ao contrário do que acontece nas emulsões A/O ou em óleos, em que os antioxidantes hidrofílicos apresentam maior eficácia [24]. Assim, os antioxidantes lipofílicos, como o α -tocoferol e o palmitato de ascorbilo, mostraram ser mais eficazes em emulsões O/A do que só em óleos, enquanto o oposto se verifica para os antioxidantes hidrofílicos, trolox e ácido ascórbico.[25] Estas diferenças observadas na eficácia dos antioxidantes a que se denominou de paradoxo polar, foram posteriormente justificadas pelas suas afinidades à interface ar-óleo, ao óleo e à interface O/A ou A/O das emulsões, como se observa na figura 8 [25].



Figura 8 - Fenómeno de interface para explicar a ação antioxidante em óleo, em emulsões O/A e emulsões A/O.

Em sistemas compostos simplesmente por óleo, imaginou-se que os antioxidantes hidrofílicos, como os fenóis polares, estariam orientados para a interface ar-óleo e, por isso, confeririam uma maior proteção face à oxidação, comparativamente aos antioxidantes lipofílicos, como os tocoferóis, que se encontram em solução e dispersos no óleo. Do mesmo modo, nas emulsões O/A, os antioxidantes mais lipofílicos (mas também com propriedades anfífilicas), como o tocoferol, deveriam estar orientados na interface O/A podendo conferir uma maior proteção à fase oleosa face à oxidação.

Já os antioxidantes hidrofílicos, dissolvendo-se e diluindo-se na fase aquosa, estariam mais afastados da interface e da fase oleosa. Desta forma, a formação e decomposição dos hidroperóxidos em emulsões é influenciada pelas concentrações dos antioxidantes nas três fases que constituem a emulsão [12].

Estudos recentes, mostram que a atividade dos antioxidantes não depende apenas da lipofilia das moléculas antioxidantes. Vários estudos mostram existir um máximo de eficácia antioxidante, à medida que aumenta a sua lipofilia, mas só até determinado ponto, a partir do qual ocorre uma diminuição significativa da atividade para os antioxidantes mais hidrofóbicos. A este fenómeno denominou-se “*cut-off*”. Então, para um mesmo poder antiradicalar, a eficácia do antioxidante não tem uma dependência linear com a sua hidrofobicidade [26, 27].

Na figura 9, a título de exemplo, é possível observar o efeito “*cut-off*” observado para os ésteres derivados do ácido rosmarínico [28].

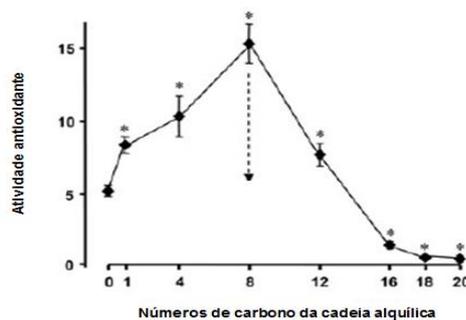


Figura 9 - Influência do aumento da cadeia alquílica dos ésteres derivados do ácido rosmarínico na atividade antioxidante [28].

Foram propostos três mecanismos para explicar este efeito: 1) Redução da mobilidade dos AOs devida a uma diminuição dos coeficientes de difusão; 2) Incorporação dos AOs no óleo, devido à sua lipossolubilidade; 3) auto-associação devida à formação de agregados micelares que reduzem a concentração de antioxidante na região interfacial. No entanto, nenhum destes mecanismos é capaz de explicar o efeito denominado “*cut-off*”.

Parte do problema que existia para estabelecer correlações entre a estrutura de um antioxidante e a sua eficácia na inibição da oxidação lipídica residia na completa falta de métodos para determinar a distribuição dos AOs em emulsões, que é um parâmetro chave para a interpretação destas observações experimentais [28].

De modo a ultrapassar este problema foi desenvolvido um método cinético que permite determinar a distribuição dos AOs em emulsões.

1.5 Distribuição de antioxidantes em emulsões alimentares modelo

1.5.1 A partição de antioxidantes em emulsões

O estudo da distribuição dos antioxidantes em sistemas emulsionados é bastante complexo, devido à impossibilidade física de separação da região interfacial das regiões aquosa e oleosa [21]. Em sistemas binários azeite/água com a ausência de emulsionante, a distribuição do AO pode ser determinada através da determinação da sua concentração nas fases aquosa e oleosa, por técnicas analíticas adequadas. A razão entre estas concentrações corresponde então à constante de partição P_A^O (coeficiente adimensional das concentrações do antioxidante em cada fase):

$$P_A^O = \frac{(AO_o)}{(AO_A)} \quad (17)$$

onde AO_o corresponde à concentração do antioxidante na fase oleosa, AO_A à concentração do antioxidante na fase aquosa e V_A o volume da fase aquosa e V_o o volume da fase oleosa.

Após a adição de um agente emulsionante para preparar emulsões, uma nova região interfacial é formada entre as regiões oleosa e aquosa e desta forma, os antioxidantes e outros componentes da emulsão irão distribuir-se pelas três regiões referidas, dependendo da sua solubilidade. Por conseguinte, duas constantes de partição são necessárias para descrever a distribuição de um AO num sistema emulsionado, uma entre a fase aquosa e a região interfacial, P_A^I (equação 18), e outra entre a fase oleosa e a região interfacial, P_o^I (equação 19). Note-se que quociente $\frac{P_A^I}{P_o^I}$ corresponde à constante de partição de um sistema binário (equação 20):

$$P_A^I = \frac{(AO_I)}{(AO_A)} \quad (18)$$

$$P_o^I = \frac{(AO_I)}{(AO_o)} \quad (19)$$

$$P_A^O = \frac{P_A^I}{P_o^I} = \frac{(AO_I)/(AO_A)}{(AO_I)/(AO_o)} = \frac{(AO_o)}{(AO_A)} \quad (20)$$

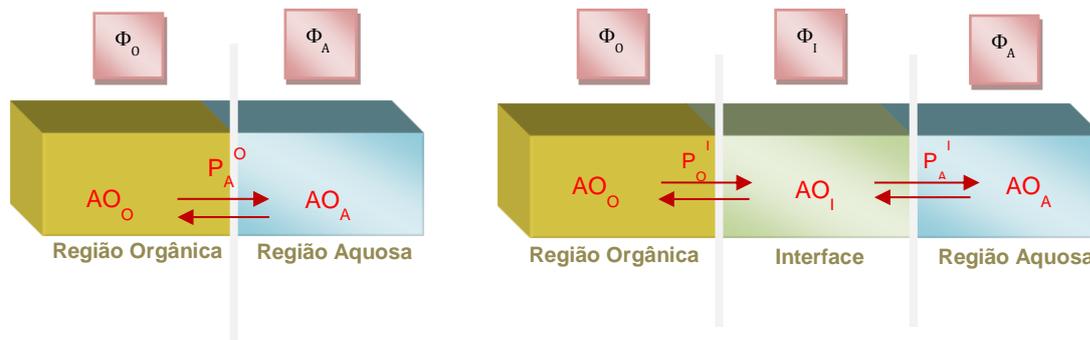


Figura 10 - Representação esquemática da partição de um antioxidante (AO) numa mistura binária (esquerda) e num sistema multifásico (direita).

Uma vez que a região interfacial não pode ser fisicamente separada das outras duas regiões, as constantes P_A^I e P_O^I não podem ser calculadas independentemente a partir da determinação da concentração do antioxidante em cada uma das fases. Assim, a determinação das constantes de partição P_A^I e P_O^I dos antioxidantes em emulsões requer que a determinação da concentração do AO nas três regiões seja feita na própria emulsão [29].

Inúmeras tentativas têm sido realizadas para determinar a distribuição de antioxidantes em sistemas emulsionados através do isolamento das regiões aquosa e oleosa, com uma análise posterior da concentração do antioxidante em cada uma das regiões. Até há pouco tempo, não era possível encontrar um método disponível que fosse aceite e eficaz para determinar a fração de antioxidante na região interfacial de emulsões óleo-em-água. É verdade que a medição das concentrações de antioxidante nas fases aquosa e oleosa pode ser utilizada para estimar P_A^O , mas esta aproximação não nos dá informação nenhuma relativamente à concentração de antioxidante na região interfacial [29].

Sanchez et al. [23] desenvolveram um método cinético, que não requer o isolamento de cada uma das fases da emulsão, para estimar as constantes de partição de antioxidantes entre as regiões oleosa e interfacial, P_O^I , e entre as regiões aquosa e interfacial, P_A^I , em emulsões opacas. Este método baseia-se no modelo da pseudofase para emulsões termodinamicamente estáveis onde, uma sonda química, neste caso os catiões hexadecilbenzenodiazólio, 16-ArN_2^+ , reagem com os antioxidantes presentes na emulsão [23].

1.5.2 Método cinético utilizado para determinar a distribuição de antioxidantes em emulsões

O método cinético utilizado para determinar a distribuição dos antioxidantes num sistema emulsionado baseia-se na determinação das constantes de reação observada, k_{obs} , da reação entre o catião de arenodiazónio, 4-hexadecilbenzenodiazónio (figura 11), e um determinado antioxidante, fazendo variar as frações de emulsionante na emulsão [30].

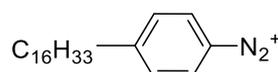


Figura 11 – Estrutura química sal de arenodiazónio.

A seleção deste catião arenodiazónio deveu-se não só ao facto de este reagir facilmente com compostos fenólicos, ao facto de existir uma elevada quantidade de estudos sobre a química complexa destes sais, mas também devido à sua localização física na região interfacial da emulsão, ao facto da reação de decomposição espontânea dos catiões 16-ArN_2^+ ser desprezável em relação às reações com os AOs, e ao facto das suas reações, tanto na presença como na ausência de nucleófilos, poderem ser estudadas mediante variadas técnicas comuns em cinética química como a espectrofotometria [12, 21, 31].

Dado que as emulsões utilizadas neste estudo são opacas, determinou-se a k_{obs} da reação, pelo método da derivatização que consistiu em parar a reação entre o sal de arenodiazónio e o antioxidante, a determinado intervalo de tempo, fazendo reagir o sal que ainda não reagiu, com um agente copulante, o dicloridrato de N-(Naft-1-il) etilenodiamina (figura 12). Nesta reação forma-se um corante azóico de cor púrpura cuja concentração pode ser determinada a $\lambda = 572 \text{ nm}$ [26].

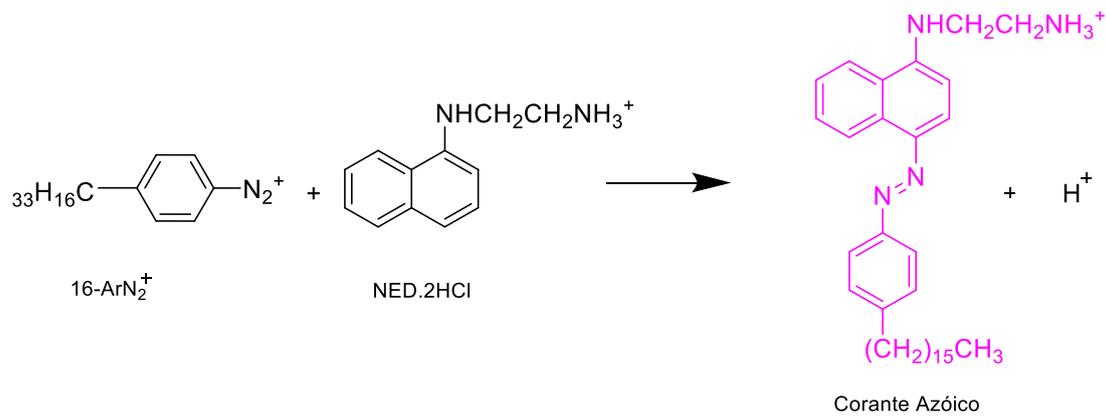


Figura 12 - Reação de derivatização utilizada.

1.5.2.1 Modelo cinético da pseudofase (MCP)

O modelo cinético de pseudofase (MCP), na sua formulação inicial, foi desenvolvido para sistemas micelares. No entanto, as emulsões, microemulsões e as soluções micelares apresentam características semelhantes ^[21].

Nas soluções micelares, a totalidade das gotículas é tratada como uma região reativa separada ou "pseudofase", uniformemente distribuída em toda a região aquosa ^[21]. Assim, o MCP pressupõe a existência de duas pseudofases distintas: a pseudofase micelar e a pseudofase aquosa.

Qualquer emulsão, na sua forma mais simples, é constituída por três regiões distintas: a região aquosa, a oleosa e a interfacial, contendo o emulsionante (no caso concreto deste estudo utilizou-se o tween 20) (figura 13).

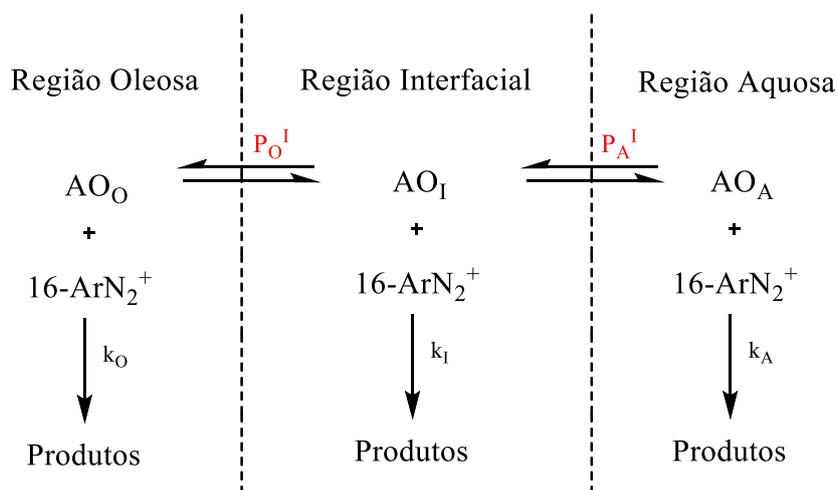


Figura 13 - Representação das três regiões de uma emulsão que contém um substrato AO, cuja distribuição vem definida pelas constantes de partição P_O^I e P_A^I .

A aplicação das ideias básicas do MCP a sistemas emulsionados pressupõe a aplicação das seguintes hipóteses:

- ✓ A velocidade de reação de qualquer antioxidante nas diferentes regiões da emulsão não está limitada pela velocidade de transporte entre as referidas regiões. Esta hipótese supõe, na prática, considerar que os antioxidantes se encontram em equilíbrio dinâmico durante o decorrer de qualquer reação química a que estejam sujeitos;
- ✓ A distribuição do antioxidante entre as várias regiões só depende da sua solubilidade relativa em cada uma delas (sempre e quando não se atinja o limite de solubilidade) e é independente de a emulsão ser O/A ou A/O e do tamanho das gotas que compõem a emulsão ^[12, 21].

Deste modo, a distribuição de um determinado antioxidante num sistema emulsionado é dada a partir de duas constantes de partição, uma entre as regiões oleosa e interfacial, P_O^I , e outra entre as regiões interfacial e aquosa, P_A^I . Estas constantes de partição são definidas através do quociente entre as concentrações dos antioxidantes nas diferentes regiões, como mostram as equações 18 e 19 ^[32].

$$P_A^I = \frac{(AO_I)}{(AO_A)} \quad (18)$$

$$P_O^I = \frac{(AO_I)}{(AO_O)} \quad (19)$$

onde os parêntesis indicam as concentrações em moles por litro no volume da região considerada, e os índices I, O, A representam as regiões interfacial, oleosa e aquosa, respetivamente.

De acordo com o modelo cinético, a velocidade de reação entre os iões 16-ArN_2^+ e o antioxidante pode expressar-se pelo somatório das velocidades em cada uma das regiões da emulsão, como mostra a equação 21:

$$v = k \cdot [16\text{-ArN}_2^+] [AO_T] = \quad (21)$$

$$= k_O \cdot (16\text{-ArN}_2^+_O) \cdot (AO_O) \cdot \Phi_O + k_I \cdot (16\text{-ArN}_2^+_I) \cdot (AO_I) \cdot \Phi_I + k_A \cdot (16\text{-ArN}_2^+_A) \cdot (AO_A) \cdot \Phi_A$$

onde k representa a constante de velocidade, as expressões com parêntesis retos [...] referem-se às concentrações em mol L^{-1} no volume total da emulsão e as expressões com parêntesis curvos (...) mencionam concentrações em mol L^{-1} em cada uma das regiões, o índice T indica a quantidade estequiométrica ou total, os índices O, I e A referem-se às regiões orgânica, interfacial e aquosa respetivamente, Φ é a fração de volume de cada região e AO é o antioxidante [33].

Os iões 16-ArN_2^+ são insolúveis tanto no óleo como na água e como o seu local reativo se situa na região interfacial da emulsão, a sua concentração nas regiões orgânica e aquosa é desprezável e, em consequência disso, a reação com o AO terá lugar preferencialmente na região interfacial (figura 14).

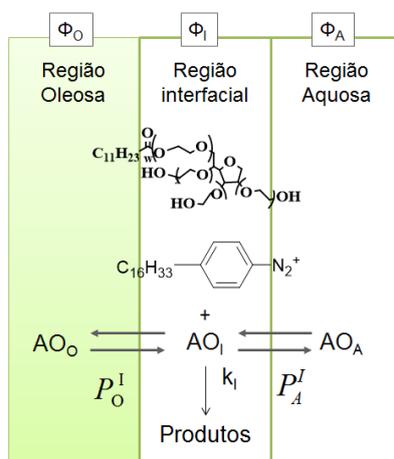


Figura 14 - Representação esquemática de uma emulsão: Φ indica a fração de volume para cada uma das regiões, AO é o antioxidante, P é a constante de partição, k_i é a constante de velocidade para a reação dos iões 16-ArN_2^+ na interface e os índices O, I e A referem-se às regiões orgânica, interfacial e aquosa, respetivamente.

Assim, a equação 21 pode ser simplificada à equação 22:

$$v = k \cdot [16 - \text{ArN}_2^+] [\text{AO}_T] = k_I \cdot [16 - \text{ArN}_2^+] \cdot (\text{AO}_I) \cdot \Phi_I \quad (22)$$

A fração de volume de emulsionante é dada pela equação:

$$\Phi_I = \frac{V_I}{V_O + V_I + V_A} \quad (23)$$

onde, V_I , V_A e V_O representam o volume das regiões interfacial, aquosa e oleosa, respetivamente.

As frações de volume de fase orgânica, Φ_O e a aquosa, Φ_A definem-se de forma idêntica, de modo que:

$$\Phi_O + \Phi_A + \Phi_I = 1 \quad (24)$$

O balanço de massas do antioxidante e dos iões arenodiazónio é dado pelas equações 25 e 26:

$$[\text{AO}_T] = \Phi_O(\text{AO}_O) + \Phi_I(\text{AO}_I) + \Phi_A(\text{AO}_A) \quad (25)$$

$$[16 - \text{ArN}_2^+] = \Phi_I(16 - \text{ArN}_2^+)_I \quad (26)$$

Combinando as equações 18, 19 e 25, obtém-se a seguinte expressão:

$$(\text{AO}_I) = [\text{AO}_T] \cdot \frac{P_O^I P_A^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_O^I P_A^I + \Phi_A P_O^I} \quad (27)$$

Combinando as equações 22, 25 e 26 e tendo presente que se está perante condições de pseudo-primeira ordem (em que $[\text{AO}] \gg [16 - \text{ArN}_2^+]$), a constante de velocidade observada virá dada pela equação 28.

$$k_{obs} = k[\text{AO}_T] = k_I(\text{AO}_I) = \frac{[\text{AO}_T] k_I P_A^I P_O^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_O^I P_A^I + \Phi_A P_O^I} \quad (28)$$

Esta equação elucida que ao aumentar a fração de emulsionante na emulsão, o valor de k_{obs} tende a diminuir, porque o termo Φ apenas aparece no denominador ^[31].

Matematicamente, a equação 28 é equivalente á equação 29, e o inverso de k_{obs} corresponde à equação 30, onde a e b vêm dados pelas equações 31 e 32:

$$k_{obs} = \frac{a}{1 + b\Phi_I} \quad (29)$$

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{a} + \frac{b}{a} \Phi_I \quad (30)$$

$$b = \frac{P_A^I P_O^I (1 + \Phi_A / \Phi_O)}{P_A^I + \Phi_A / \Phi_O P_O^I} - 1 \quad (31)$$

$$a = \frac{[AO_T] k_I P_A^I P_O^I (1 + \Phi_A / \Phi_O)}{P_A^I + \Phi_A / \Phi_O P_O^I} \quad (32)$$

Estas equações descrevem a dependência do k_{obs} com a concentração do emulsionante e deste modo a curva obtida por $1/k_{obs}$ vs Φ deverá ser linear, com uma ordenada na origem positiva igual a $1/a$ e um declive igual a b/a .

Como se pode observar, a equação 31 contém unicamente as constantes de partição e a equação 32 contém, para além das constantes de partição, a constante de velocidade na interface, k_I , que não se pode determinar independentemente. Como consequência, as constantes de partição P_O^I e P_A^I podem obter-se a partir da equação 31 de duas maneiras distintas:

- ✓ A partir de dois valores de **b**, para assim se resolver um sistema de duas equações a duas incógnitas, as quais são precisamente estas constantes de partição. Os valores de **b** podem obter-se a partir do estudo das variações de k_{obs} em função de Φ_I para pelo menos dois valores distintos de razão $\frac{\Phi_A}{\Phi_O}$.
- ✓ A partir do valor experimental de P_A^O e de um só valor de **b**. O quociente das constantes de partição P_O^I e P_A^I , equações 18 e 19, representa o valor da constante de partição entre as fases aquosa e oleosa (P_A^O), equação 20.

$$P_A^O = \frac{P_A^I}{P_O^I} = \frac{(AO)_I / (AO)_A}{(AO)_I / (AO)_O} = \frac{(AO)_O}{(AO)_A} \quad (20)$$

Com base em tudo isto, podem-se determinar as constantes de partição P_O^I e P_A^I a partir da medida experimental da constante de partição P_A^O que representa a constante de partição do antioxidante num sistema binário água-azeite na ausência de emulsionante, requerendo apenas o conhecimento de um valor de **b** (equação 31), que pode ser determinado a partir da variação de k_{obs} em função de Φ_I para uma determinada razão $\frac{\Phi_A}{\Phi_O}$.

Tendo as constantes de partição determinadas, pode-se determinar o valor de k_i que corresponde à constante de velocidade biomolecular para a reação que tem lugar entre 16-ArN_2^+ e o antioxidante na interface, utilizando a equação 32.

A percentagem de antioxidante presente em cada uma das fases pode ser obtida a partir das equações 33 - 35.

$$\% \text{AO}_I = \frac{100\Phi_I P_A^I P_O^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_A^I P_O^I + \Phi_A P_O^I} \quad (33)$$

$$\% \text{AO}_O = \frac{100\Phi_O P_A^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_A^I P_O^I + \Phi_A P_O^I} \quad (34)$$

$$\% \text{AO}_A = \frac{100\Phi_A P_O^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_A^I P_O^I + \Phi_A P_O^I} \quad (35)$$

1.5.2.2 Simplificação do modelo cinético de pseudofase (MCPS)

Existem antioxidantes que, num sistema emulsionado, têm baixa solubilidade para uma determinada região e nestas circunstâncias a determinação das constantes de partição pode estar sujeita a um grande erro, já que isto implica que uma das constantes de partição seja muito maior que outra.

Para contornar este problema, o modelo de pseudofase anteriormente descrito, pode ser simplificado, assumindo que a concentração de um AO numa das regiões da emulsão é praticamente nula, o que simplifica bastante o tratamento matemático e a interpretação dos resultados uma vez que só é necessária uma constante de partição.

Assim, supondo que a distribuição tem lugar fundamentalmente entre regiões oleosa e interfacial (ou seja, a solubilidade do AO na região aquosa seja nula), a concentração total de AO, definida na equação 25 reduz-se a equação 36:

$$[\text{AO}_T] = (\text{AO}_I)\Phi_I + (\text{AO}_O)\Phi_O \quad (36)$$

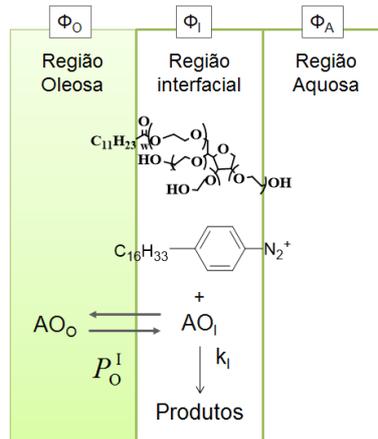


Figura 15 - Representação esquemática da região interfacial de uma emulsão com base no modelo cinético da pseudofase que mostra a partição do antioxidante, AO, entre as regiões interfacial e oleosa.

Substituindo a equação 19 na equação 36 obtém-se a equação 37:

$$(AO_I) = \frac{[AO_T]P_O^I}{\Phi_I P_O^I + \Phi_O} \quad (37)$$

Substituindo esta equação na equação 26 obtém-se a expressão que relaciona a constante de velocidade observada com a constante de partição do AO entre as regiões oleosa-interfacial, equação 38:

$$k_{obs} = \frac{k_I [AO_T] P_O^I}{\Phi_I P_O^I + \Phi_O} \quad (38)$$

Matematicamente, a equação 38 é equivalente à equação 39:

$$k_{obs} = \frac{k_I [AO_T] \frac{P_O^I}{\Phi_I}}{1 + \Phi_I \frac{P_O^I}{\Phi_O}} = \frac{ab}{1 + b\Phi_I} \quad (39)$$

onde os parâmetros a e b são definidos pelas equações 40 e 41:

$$b = \frac{P_O^I}{\Phi_O} \quad (40)$$

$$a = k_I [AO_T] \quad (41)$$

A equação 38 prevê que a variação de $1/k_{obs}$ em função de Φ_I (equação 42) seja linear, com uma ordenada na origem igual a $1/ab$ e um declive igual a $1/a$.

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{ab} + \frac{1}{a}\Phi_I \quad (42)$$

Da representação linear de $1/k_{obs}$ em função de Φ_I , pode-se obter o valor de k_I a partir do declive da reta e combinando o declive com o valor da ordenada na origem, o valor de P_O^I .

$$P_O^I = \Phi_O(\text{declive})/(\text{ordenada na origem}) \quad (43)$$

A fração de antioxidante presente na fase oleosa e na interface do sistema emulsionado vem dada pelas equações 44 e 45, respetivamente.

$$\%AO_O = \frac{100\Phi_O}{\Phi_I P_O^I + \Phi_O} \quad (44)$$

$$\%AO_I = \frac{100\Phi_I P_O^I}{\Phi_I P_O^I + \Phi_O} \quad (45)$$

Para os casos em que a distribuição tenha lugar fundamentalmente nas regiões aquosa-interfacial (figura 16), ou seja, aqueles casos em que a concentração de AO na fase oleosa é desprezável, pode-se obter seguindo o mesmo procedimento, uma expressão que relaciona a constante de velocidade observada com a constante de partição do AO entre as regiões aquosa-interfacial, equação 46. Esta equação pode ser linearizada chegando assim a equação 47.

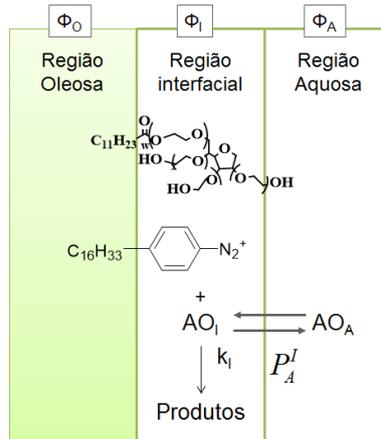


Figura 16 - Representação esquemática da região interfacial de uma emulsão com base no modelo cinético da pseudofase que mostra a partição do antioxidante, AO, entre as regiões interfacial e aquosa.

$$k_{obs} = \frac{k_I [AO_T] P_A^I}{\Phi_I P_A^I + \Phi_A} \quad (46)$$

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{\Phi_A}{k_I [AO_T] P_A^I} + \frac{\Phi_I}{k_I [AO_T]} \quad (47)$$

Da representação linear de $1/k_{obs}$ em função de Φ_I , pode-se obter o valor de k_I a partir do declive e, combinando o declive com o valor da ordenada na origem, o valor de P_A^I .

$$P_A^I = \Phi_A (\text{declive}) / (\text{ordenada na origem}) \quad (48)$$

Desta forma, a percentagem de AO nestas regiões virá dada pelas equações 49 e 50.

$$\% AO_A = \frac{100 \Phi_A}{\Phi_I P_A^I + \Phi_A} \quad (49)$$

$$\% AO_I = \frac{100 \Phi_I P_A^I}{\Phi_I P_A^I + \Phi_A} \quad (50)$$

1.6 Avaliação da capacidade antioxidante

1.6.1 Avaliação da capacidade antiradicalar pelo método do DPPH•

Um dos mecanismos mais importantes para inibir a oxidação lipídica é a reação com os radicais livres. De modo a avaliar a capacidade para esta reação, foram propostos inúmeros métodos baseados em reações entre o antioxidante e um radical que seja preferencialmente estável e comercial, ou um radical gerado no próprio meio de reação.

O método do DPPH• é um dos métodos mais utilizados para avaliar a capacidade antiradicalar dos compostos através da sua reatividade com um radical livre estável, o 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•), cuja estrutura química se encontra representada na figura 17 [34].

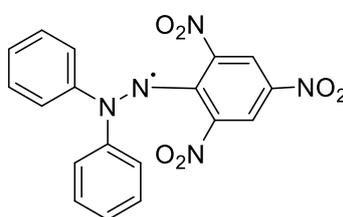


Figura 17 - Estrutura química do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH•).

A reação entre os antioxidantes e o radical DPPH• pode ocorrer por diferentes mecanismos, dependendo do solvente em que se encontra: transferência de um eletrão (TE) ou por transferência de um átomo de hidrogénio (TAH).

As investigações realizadas por *Foti et al* [35], sugerem que a reação entre o DPPH• e os antioxidantes em meios polares se comporta como uma reação TE. Estes autores descobriram que o passo determinante da velocidade para esta reação consiste num processo de TE rápido, dos aniões fenóxilo para o radical DPPH•. Assim, a remoção do átomo de hidrogénio (TAH) do antioxidante pelo DPPH• é um processo reacional menos importante em solventes que possam formar fortes pontes de hidrogénio (metanol e etanol). No entanto e qualquer que seja o mecanismo, o produto final da reação entre o antioxidante e o radical DPPH• é o mesmo [35].

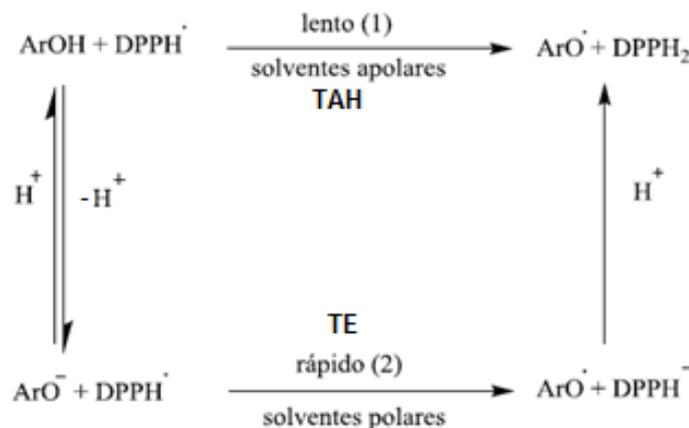


Figura 18 - Vários mecanismos da reação que ocorre entre o DPPH• e o antioxidante.

O radical DPPH• (de cor púrpura) apresenta, no espectro UV-vis, um pico de absorção máximo a 515 nm em solução metanólica [34]. Após reação com um antioxidante (AO) ocorre uma diminuição da absorvância (descoloração), proporcional à concentração de antioxidante [5, 36] (figura 19).

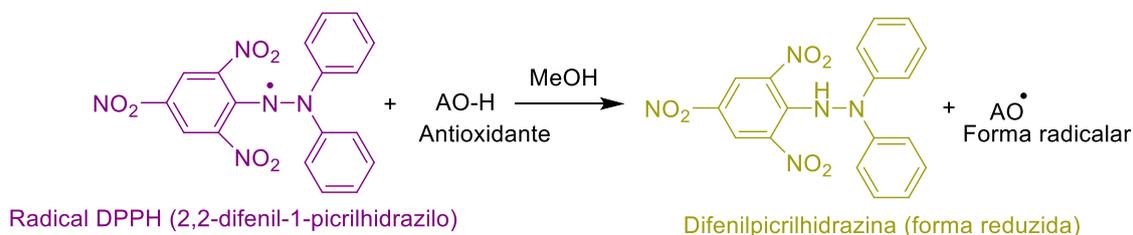


Figura 19 - Reação do radical DPPH• com o antioxidante.

A atividade antiradicalar é definida pelo parâmetro EC₅₀ que corresponde à concentração necessária de antioxidante capaz de captar 50 % dos radicais livres do DPPH• [37].

1.6.2 Avaliação da atividade antioxidante pelo método da estufa de Schaal

Os métodos que permitem muitas vezes avaliar a capacidade antiradicalar dos compostos não mostram a capacidade dos compostos para inibir a oxidação em alimentos, porque, apesar de avaliarem a reatividade destes frente aos radicais livres, muitas vezes não têm em consideração inúmeros fatores como a localização do antioxidante e a sua interação com os componentes do alimento.

Posto isto, o método de avaliação mais apropriado será aquele em que as condições de ensaio sejam o mais semelhante possíveis com o alimento onde vão ser utilizados os antioxidantes. Assim, o método utilizado neste trabalho para avaliação da atividade antioxidante dos compostos sintetizados foi o teste de Schaal aplicado a emulsões, cuja eficácia do antioxidante é revelada pelo aumento do período de indução resultante da sua adição.

O teste da estufa (“Schaal Oven Test”) é um dos métodos mais utilizados na avaliação da capacidade antioxidante. Os resultados fornecidos por este teste apresentam normalmente boa correlação com a avaliação efetuada nas condições normais de armazenamento dos óleos e gorduras. O teste da estufa de Schaal tem vindo mais recentemente a ser aplicado a emulsões [38].

Para acelerar o mecanismo de oxidação, os métodos de avaliação da estabilidade oxidativa incluem normalmente o aumento da temperatura, adição de metais, aumento da pressão de oxigénio, entre outros. Porém, o aquecimento é o meio mais utilizado, eficiente e com mecanismos de oxidação semelhantes aos que ocorrem durante o armazenamento/processamento dos alimentos [38].

Neste teste, as emulsões contendo diferentes antioxidantes são submetidas a uma temperatura de 60°C e analisadas periodicamente para avaliação do estado de oxidação. Esta avaliação pode ser efetuada recorrendo a vários métodos nomeadamente a determinação de dienos conjugados [12, 38].

A partir dos resultados obtidos, é determinado o período de indução, o qual é definido pelo tempo necessário para que a emulsão atinja um nível de oxidação detetável ou ocorra uma mudança brusca na taxa de oxidação (figura 20) [39].



Figura 20 - Curva típica de oxidação lipídica. a) Sem adição de antioxidante; b) e c) com adição de antioxidante. Atividade antioxidante de c) é maior que b). PI 1, PI 2 e PI 3 são os períodos de indução em horas ou dias.

A avaliação do estado de oxidação dos óleos e gorduras constitui um aspeto bastante importante a nível industrial. Trata-se de um meio para controlar e garantir a qualidade das matérias-primas adquiridas, bem como controlar a qualidade dos produtos comercializados ^[40].

Nenhum método, daqueles que se encontram descritos para a avaliação da estabilidade oxidativa dos lípidos, se correlaciona na perfeição com as modificações organoléticas produzidas com o avanço da oxidação. Ou seja, cada método fornece informações acerca de um momento restrito do processo oxidativo, e por isso, uma das grandes dificuldades na avaliação do grau de oxidação reside na escolha do momento mais adequado para realizar essa determinação.

Existem vários métodos para medir a extensão de oxidação de uma gordura/óleo que podem ser efetuados através da determinação dos produtos primários da oxidação, os hidroperóxidos, ou da determinação dos seus produtos secundários, normalmente compostos carbonilo. A determinação do índice de peróxidos (IP) e dos dienos conjugados (DC) são dois dos métodos mais usuais na determinação dos hidroperóxidos ^[40].

Durante a formação de hidroperóxidos a partir de ácidos gordos insaturados ocorre a formação de dienos conjugados (figura 21).

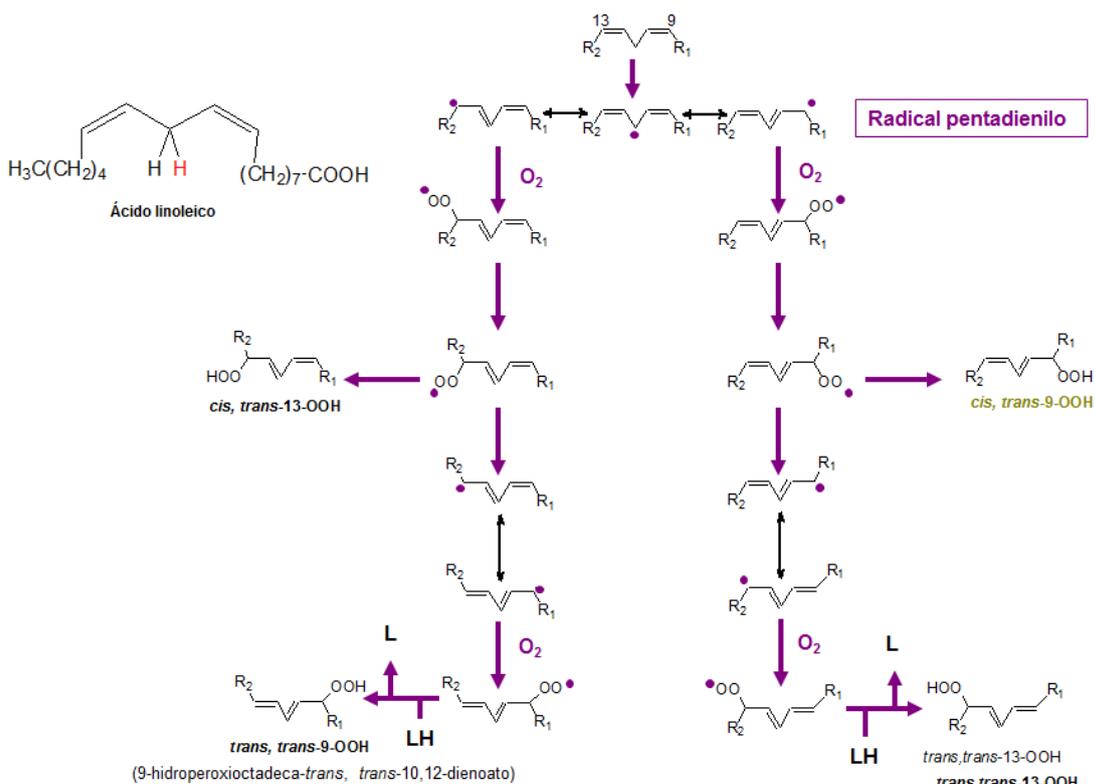


Figura 21 – Mecanismos de oxidação lipídica do ácido linoleico.

A percentagem destes compostos pode ser determinada quantitativamente por espectrofotometria devido à sua forte absorção a 233 nm. Assim, uma determinada quantidade de gordura/óleo é diluída em etanol, lendo-se de seguida a absorvância desta solução ao referido comprimento de onda (λ)^[40].

2. OBJETIVO

Muitos alimentos são constituídos por gotas de óleo dispersas em água sendo considerados emulsões de óleo em água (O/A). Essas gotas contendo lípidos, podem sofrer oxidação dando lugar ao aparecimento de odores e gostos característicos a ranço e conferir toxicidade aos alimentos, o que representa para a indústria e para o consumidor, uma forte causa de depreciação e rejeição.

De modo a retardar ou mesmo inibir estes processos de oxidação e obter alimentos mais estáveis e duradouros, a indústria alimentar recorre a alternativas como o uso de atmosfera inerte, uso de baixas temperaturas, inativação de enzimas e/ou uso de antioxidantes, que de todos os métodos utilizados é o mais eficaz e económico.

A eficácia dos antioxidantes na proteção dos alimentos contra a oxidação lipídica vai depender de vários fatores como a temperatura, pH, estrutura do antioxidante e distribuição desse antioxidante pelas várias fases da emulsão. De facto, os antioxidantes utilizados na estabilização das emulsões alimentares podem encontrar-se distribuídos, não só nas fases oleosa e aquosa da emulsão, como também na interface, que é onde ocorrem frequentemente as reações de oxidação lipídica que dão origem à formação de radicais.

Existe uma enorme variedade de compostos identificados com atividade antiradicalar, mas que têm eficácia antioxidante relativa bastante diferente. Estudos mostram que muitos potenciais antioxidantes comerciais não são eficazes na inibição da oxidação lipídica de alimentos ricos em ácidos gordos insaturados, provavelmente porque não se localizam na região interfacial da emulsão. Por isso, surge a necessidade de modelar novos antioxidantes provenientes de fontes naturais, de modo a obter assim compostos fenólicos funcionalizados com grande afinidade para a região interfacial da emulsão.

Neste trabalho pretende-se contribuir para o estabelecimento de uma base científica que permita correlacionar a hidrofobicidade dos AOs com a sua distribuição e a distribuição destes com a eficácia antioxidante, com a finalidade de desenvolver novos AOs mais eficazes. Para isso, foram propostos os seguintes objetivos iniciais: 1) Sintetizar AOs derivados do ácido clorogénico com diferentes hidrofobicidades; 2) Determinar a distribuição de AOs homólogos com diferentes hidrofobicidades em emulsões alimentares modelo de alimentos constituídas por azeite/tween 20/tampão citrato; 3) Determinar a sua eficácia antioxidantes nas mesmas emulsões; 4) Correlacionar a eficácia antioxidante com a distribuição dos AOS na emulsão, determinando assim o grau de hidrofobicidade que apresenta o máximo de eficácia.

3. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1 Síntese dos ésteres derivados do ácido clorogénico

3.1.1 Métodos e reagentes

Utilizou-se para a análise dos compostos sintetizados, a cromatografia em camada fina (TLC) e a ressonância magnética nuclear de protão (^1H -RMN) e de carbono (^{13}C -RMN).

Nas purificações por cromatografia em coluna utilizou-se gel de sílica (0,040-0,063 mm, Merck).

As placas de TLC usadas na identificação dos compostos foram de gel de sílica em suporte de alumínio (Merck 60 S254).

A revelação das placas de TLC foi efetuada de três modos: por irradiação de UV-Vis ao comprimento de onda de 254 nm, numa câmara de iodo e através da solução de Mostain (100 mL H_2SO_4 10%, 5,0 g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,22 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$).

Os espectros de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN foram traçados usando metanol deuterado e acetona deuterada como solvente, num espectrómetro digital de Ressonância Magnética Nuclear a 400 MHz (Bruker Avance III 400).

Para as determinações espectrométricas do método DPPH*, utilizou-se um espectrómetro PowerWave XS, Bio-Tek®

Os espectros UV-Vis, foram traçados num espectrofotómetro Thermo Scientific, Evolution Array, UV- Visible Spectrophotometer, Temperature controller.

Todos os solventes usados nas extrações eram de qualidade “Puro” e os usados nas cromatografias em coluna, “Para Análise (PA)” da Merck, Sigma Aldrich ou da Fluka.

3.1.2 Procedimento experimental

Sintetizaram-se os ésteres derivados do ácido clorogénico por esterificação, adicionando ao ácido clorogénico, na proporção de (1:10, mol/mol) um álcool com cadeia alquílica a variar de um a dezasseis carbonos (figura 22), de acordo com o procedimento descrito por *Giraldo et al.* ^[41] com algumas modificações.

Todos os compostos foram analisados e caracterizados por TLC, ^1H -RMN e ^{13}C -RMN.

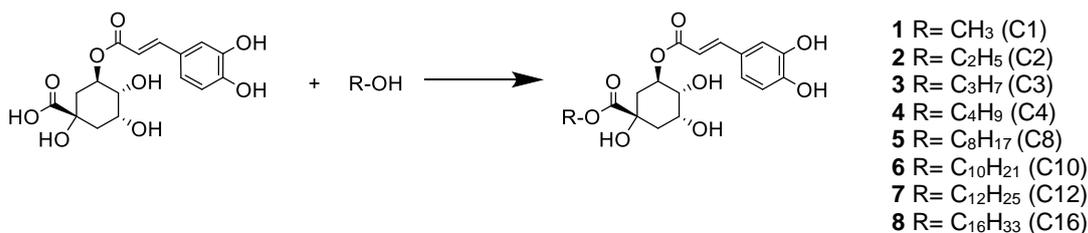


Figura 22 - Síntese dos ésteres derivados do ácido clorogénico.

3.1.2.1 Obtenção do clorogenato de metilo por esterificação com catálise ácida

Para um balão de fundo redondo contendo 120 mg de *molecular sieves*, transferiu-se 0,5 g de ácido clorogénico (Acros, 1,41 mmol), 34 mL de metanol e 2,36 g de amberlite. Deixou-se em refluxo durante 2 h. Filtrou-se a amberlite e os *molecular sieves*. Evaporou-se o metanol. Adicionou-se ao resíduo 22 mL de tetrahydrofurano e secou-se a mistura reacional com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente, obtendo-se um sólido de cor esbranquiçada.

3.1.2.2 Obtenção dos clorogenatos de cadeia curta C2-C4 por esterificação com catálise ácida

Para um balão de fundo redondo transferiu-se 0,5 g de ácido clorogénico (Acros, 1,41 mmol), 14,1 mmol de álcool pretendido e 1 mL de H₂SO₄. Deixou-se a reagir durante 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente neutralizou-se a mistura reacional com uma solução de bicarbonato de sódio 2 M e extraiu-se a camada aquosa com 3 porções de 150 mL de éter etílico. Secou-se a camada orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente, obtendo-se um sólido de cor esbranquiçada.

3.1.2.3 Obtenção dos clorogenatos de cadeia longa C8-C16 por esterificação com catálise enzimática

Para um balão de fundo redondo, transferiram-se 0,5 g de ácido clorogénico (Acros, 1,41 mmol), 0,5 g de novozym, 0,180 g de *molecular sieves*, 14,1 mmol de álcool pretendido e 2 mL de tetrahydrofurano. Deixou-se a reagir durante 7 dias a uma temperatura de 65°C. Posteriormente filtrou-se a enzima e os *molecular sieves*.

Evaporou-se o tetrahydrofurano, dissolveu-se o resíduo em 80 mL de acetato de etilo e lavou-se com 6 porções de 30 mL de bicarbonato de sódio 0,6 M. Secou-se a camada orgânica com sulfato de sódio anidro e filtrou-se. Evaporou-se o solvente, obtendo-se um sólido de cor esbranquiçada. Realizou-se a purificação por cromatografia em coluna utilizando com eluente tolueno:acetato de etilo (9:1, v/v).

3.1.3 Caracterização espectroscópica dos ésteres derivados do ácido clorogénico

3.1.3.1 Clorogenato de metilo

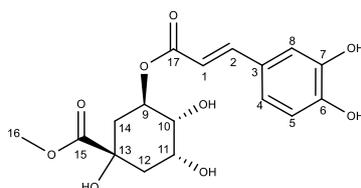


Figura 23 - Estrutura numerada do éster clorogenato de metilo.

¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz): δ 1.96-2.30 (m, 4H, H-12, 14); 3.72 (s, 3H, H-16); 3.76 (dd, J=7.5, 3.1 Hz, 1H, H-10); 4.07-4.27 (m, 1H, H-11); 5.19-5.40 (m, 1H, H-9); 6.24 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-1); 6.81 (d, J=8.2 Hz, 1H, H-5); 6.98 (dd, J=8.2, 1.9 Hz, 1H, H-4); 7.07 (d, J=1,9 Hz, 1H, H-8); 7.55 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-2).

¹³C RMN (CD₃OD, 100 MHz): δ 37.79 (C-12); 38.04 (C-14); 52.96 (C-16); 70.32 (C-11); 72.11 (C-9); 72.57 (C-10); 75.83 (C-13); 115.07 (C-8); 115.13 (C-1); 116.54 (C-5); 122.96 (C-4); 127.65 (C-3); 146.85 (C-2); 147.18 (C-7); 149.67 (C-6); 168,27 (C-17); 175.42 (C-15).

3.1.3.2 Clorogenato de etilo

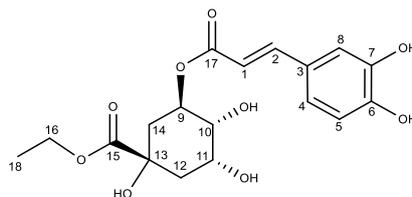


Figura 24 - Estrutura numerada do éster clorogenato de etilo.

¹H RMN (C₃D₆O, 400 MHz): δ 1.23 (t, J=7.1 Hz, 3H, H-18); 1.96-2.30 (m, 4H, H-12, 14); 3.66-3.79 (m, 1H, H-10); 4.08-4.18 (m, 3H, H-16,11); 5.28-5.41 (m, 1H, H-9); 6.25 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-1); 6.87 (d, J=8.2 Hz, 1H, H-5); 7.05 (dd, J=8.2, 2.0 Hz, 1H, H-4); 7.16 (d, J=2.0 Hz, 1H, H-8); 7.54 (d=15.9 Hz, 1H, H-2).

¹³C RMN (C₃D₆O, 100 MHz): δ 14.16 (C-18); 37.80 (C-12); 38.69 (C-14); 61.53 (C-16); 70.75 (C-11); 71.34 (C-9); 73.06 (C-10); 75.74 (C-13); 115.01 (C-8); 115.65 (C-1); 116.24 (C-5); 122.34 (C-4); 127.47 (C-3); 145.58 (C-2); 146.17 (C-7); 148.61 (C-6); 166.77 (C-17); 173.80 (C-15).

3.1.3.3 Clorogenato de propilo

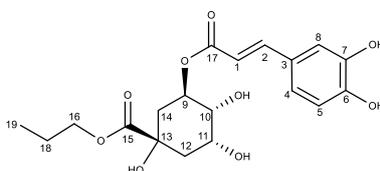


Figura 25 - Estrutura numerada do éster clorogenato de propilo.

¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz): δ 0.95 (t, J=7.4 Hz, 3H, H-19); 1.63-1.76 (m, 2H, H-18); 1.99-2.31 (m, 4H, H-12, 14); 3.78 (dd, J=7.4, 3.1 Hz, 1H, H-10); 4.02-4.14 (m, 2H, H-16); 4.14-4.23 (m, 1H, H-11); 5.27-5.37 (m, 1H, H-9); 6.26 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-1); 6.82 (d, J=8.2 Hz, 1H, H-5); 6.99 (dd, J=8.2, 2.0 Hz, 1H, H-4); 7.08 (d, J=2.0 Hz, 1H, H-8); 7.57 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-2).

¹³C RMN (CD₃OD, 100 MHz): δ 10.16 (C-19); 22.45 (C-18); 37.32 (C-12); 37.61 (C-14); 67.66 (C-16), 69.88 (C-11), 71.73 (C-9), 72.14 (C-10), 75.38 (C-13), 114.65 (C-8),

114.70 (C-1), 116.11 (C-5), 122.53 (C-4), 127.72 (C-3), 146.43 (C-2), 146.76 (C-7), 149.25 (C-6), 167.85 (C-17), 174.62 (C-15).

3.1.3.4 Clorogenato de butilo

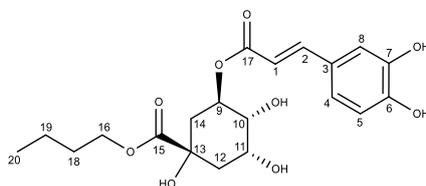


Figura 26 - Estrutura numerada do éster clorogenato de butilo.

¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz): δ 0.94 (t, J=7.4 Hz, 3H, H-20); 1.34-1.46 (m, 2H, H-19); 1.56-1.73 (m, 2H, H-18); 1.97-2.34 (m, 4H, H-12,14); 3.78 (dd, J=7.4, 3.1 Hz, 1H, H-10); 3.99-4.26 (m, 2H, H-11,16); 5.28-5.36 (m, 1H, H-9); 6.26 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-1); 6.82 (d, J=8.2 Hz, 1H, H-5); 6.99 (dd, J=8.3 Hz, 1H, H-4); 7.08 (d, J=2.0 Hz, 1H, H-8); 7.57 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-2).

¹³C RMN (CD₃OD, 100 MHz): δ 13.98 (C-20); 20.09 (C-19); 31.64 (C-18); 37.74 (C-12); 38.05 (C-14); 66.37 (C-16); 70.25 (C-11); 72.21 (C-9); 72.56 (C-10); 75.75 (C-13); 115.07 (C-8); 115.14 (C-1); 116.54 (C-5); 122.96 (C-4); 127.66 (C-3); 146.90 (C-2); 142.22 (C-7); 149.74 (C-6); 168.27 (C-17); 175.06 (C-15).

3.1.3.5 Clorogenato de octilo

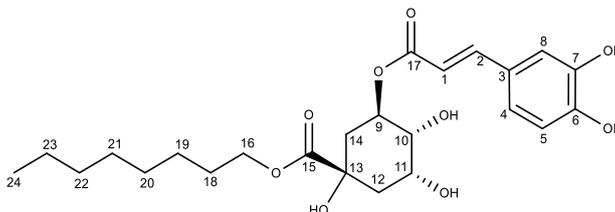


Figura 27 - Estrutura numerada do éster clorogenato de octilo.

¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz): δ 0.93 (t, J=6.9 Hz, 3H, H-24); 1.32 (d, J=19.4 Hz, 10H, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23); 1.64 (dd, J=14.3, 7.0 Hz, 2H, H-18); 1.97-2.31 (m, 4H, H-12,14); 3.77 (dd, J=7.1, 3.1 Hz, 1H, H-10); 4.05-4.14 (m, 2H, H-16); 4.14-4.22 (m, 1H,

3.1.3.7 Clorogenato de dodecilo

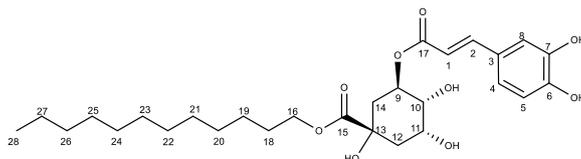


Figura 29 - Estrutura numerada do éster clorogenato de dodecilo.

¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz): δ 0.93 (t, J=6.9 Hz, 3H, H-28); 1.21-1.41 (m, 18H, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27); 1.57-1.73 (m, 2H, H-118); 1.98-2.31 (m, 4H, H-12,14); 3.75 (dd, J=7.2, 3.1 Hz, 1H, H-10); 4.07-4.15 (m, 2H, H-16); 4.21-4.15 (m, 1H, H-11); 5.40-5.23 (m, 1H, H-9); 6.24 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-1); 6.82 (d, J=8.2 Hz, 1H, H-5); 6.98 (dd, J=8.3, 2.0 Hz, 1H, H-4); 7.08 (d, J=2.0 Hz, 1H, H-8); 7.56 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-2).

¹³C RMN (CD₃OD, 100 MHz): δ 14.22 (C-28); 23.51 (C-27); 26.69 (C-19); 30.08 (C-18); 30.39 (C-20, 21, 22, 23, 24, 25); 32.84 (C-26); 37.31 (C-12); 37.80 (C-14); 66.43 (C-16); 69.88 (C-11); 72.02 (C-9); 72.13 (C-10); 75.44 (C-13); 114.80 (C-8); 114.98 (C-1); 116.31 (C-5); 122.75 (C-4); 127.41 (C-3); 146.68 (C-2); 147.03 (C-7); 149.51 (C-6); 168.00 (C-17); 174.83 (C-15).

3.1.3.8 Clorogenato de hexadecilo

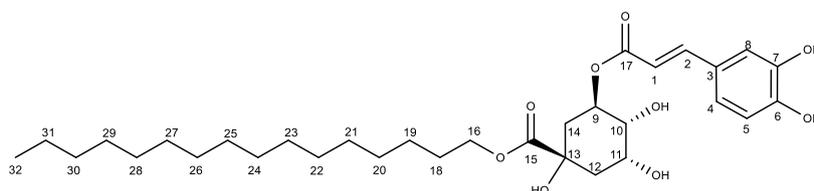


Figura 30 - Estrutura numerada do éster clorogenato de hexadecilo.

¹H RMN (CD₃OD, 400 MHz): δ 0.92 (t, J=6.8 Hz, 3H, H-32); 1.28 (d, J=13.6 Hz, 26H, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31); 1.63 (dd, J=13.5, 6.6 Hz, 2H, H-18); 1.97-2.36 (m, 4H, H-12,14); 3.76 (dd, J=7.1, 3.1 Hz, 1H, H-10); 4.02-4.13 (m, 2H, H-16); 4.13-4.19 (m, 1H, H-11); 5.23-5.36 (m, 1H, H-9); 6.23 (d,

J=15.9 Hz, 1H, H-1); 6.80 (d, J=8.2 Hz, 1H, H-5); 6.96 (dd, J=8.2, 2.0 Hz, 1H, H-4); 7.06 (d, J=2.0 Hz, 1H, H-8); 7.55 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-2).

¹³C RMN (CD₃OD, 100 MHz): δ 14.43 (C-32); 23.73 (C-31); 26.91 (C-19); 29.53 (C-18); 30.61 (C-20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29); 33.07 (C-30); 37.61 (C-12); 38.03 (C-14); 66.65 (C-16); 70.10 (C-11); 72.24 (C-9); 72.37 (C-10); 75.66 (C-13); 115.03 (C-8); 115.15 (C-1); 116.53 (C-5); 122.97 (C-4); 127.63 (C-3); 146.90 (C-2); 147.25 (C-7); 149.74 (C-6); 168.22 (C-17); 175.05 (C-15).

3.2 Obtenção de azeite sem antioxidantes (tocoferóis e outros compostos fenólicos) a utilizar na preparação das emulsões modelo

Neste trabalho utilizou-se como fase oleosa o azeite.

Os principais constituintes do azeite (cerca de 95 %) são os ácidos gordos sob a forma de triacilgliceróis (TAGs). Os ácidos gordos presentes no azeite em quantidades apreciáveis são os ácidos oléico, palmítico, palmitoleico, esteárico, linoleico e linolénico, sendo que os ácidos oleico e linoleico estão presentes em grande quantidade, variando entre 55 a 83 % e 3,5 a 21 %, respetivamente. O elevado teor em ácido oleico (55 – 83 %), confere ao azeite elevada estabilidade, em comparação com outros óleos vegetais, e leva a que este seja considerado uma gordura essencialmente monoinsaturada ^[13].

O azeite contém igualmente α, β, γ e δ tocoferóis em quantidades variáveis (normalmente 100 a 200 ppm), bem como outros compostos fenólicos como o hidroxitirosol, cuja concentração total poderá ir até cerca de 1000 ppm. De modo a que estes compostos não interferiram com as experiências da determinação da distribuição dos antioxidantes, bem como com a avaliação da sua atividade antioxidante em emulsões preparadas com azeite, tornou-se necessário proceder à remoção destes antioxidantes do seguinte modo:

- Remoção dos compostos fenólicos através de um processo de extração líquido-líquido
- Remoção dos tocoferóis através de uma coluna de alumina sob pressão de azoto

3.2.1 Remoção de compostos fenólicos

Removeram-se os compostos fenólicos do azeite por extração líquido-líquido ^[42]. Extraíram-se 3 litros com oito porções de 300 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 0,5 M. Lavou-se com porções de 200 mL de solução aquosa de ácido clorídrico 0,5 M e com cinco porções de 200 mL de solução aquosa de cloreto de sódio saturado. Centrifugou-se a camada orgânica durante 5 minutos a 20000 rotações por minuto. Secou-se a camada orgânica com sulfato de sódio anidro, filtrou-se e guardou-se a 4°C até ser efetuada a extração dos tocoferóis.

3.2.2 Remoção de tocoferóis

Para a remoção dos tocoferóis, seguiu-se o procedimento descrito por *Yoshida et al* ^[43], com algumas modificações. Desta forma preparou-se uma coluna cromatográfica contendo como fase estacionária alumina ativada. Para isso, para cada coluna efetuada, ativaram-se 300 gramas de alumina (óxido de alumina 90 ativo neutro Merck 0,063-0.200 nm) com água desionizada e posteriormente secaram-se numa mufla a 200°C durante 48 horas.

Passou-se o azeite anteriormente tratado e isento de polifenóis por esta coluna, sem utilização de eluente. Envolveram-se as colunas em papel de alumínio, procedeu-se à eluição sob pressão de azoto e recolheu-se o azeite purificado.

A figura 31 ilustra todo este procedimento para remover os polifenóis e tocoferóis presentes no azeite.

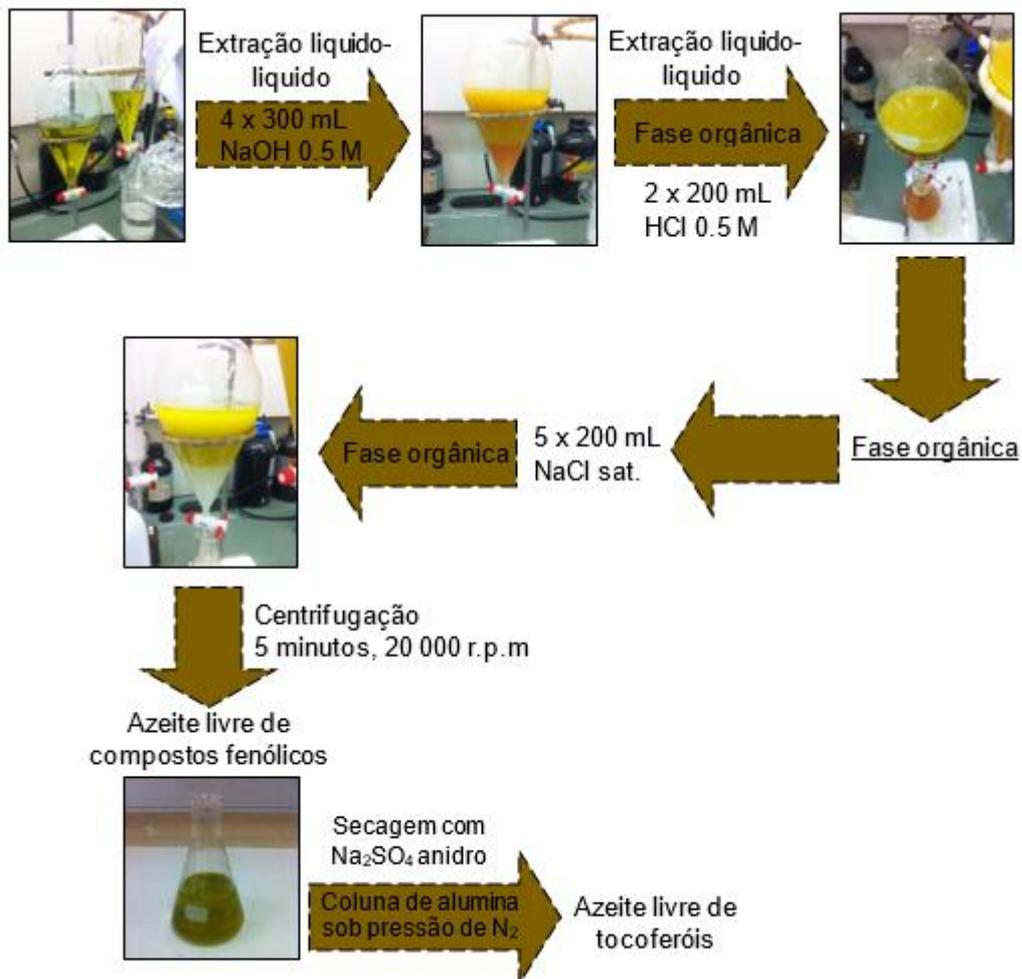


Figura 31 - Esquema do procedimento experimental seguido para a remoção dos polifenóis e tocoferóis presentes no azeite.

3.3 Avaliação do grau de insaturação do azeite

O grau de insaturação de uma gordura pode ser determinado pela quantidade de iodo molecular que é absorvido por esta. O número de moles de iodo absorvido é proporcional ao número de duplas ligações contidas nessa gordura ou óleo.

O índice de iodo define-se como o número de gramas de iodo que podem ser fixados em condições determinadas por 100 g de óleo ou gordura.

3.3.1 Procedimento experimental

Pesou-se 0,3 g a 0,5 g de azeite e colocou-se num matraz de 250 mL com rolha. Dissolveu-se a gordura em 10 mL de clorofórmio e adicionou-se 25 mL de solução de Hanus (solução de IBr). Rolhou-se o frasco e guardou-se num local escuro durante 30 minutos, agitando-se de 10 em 10 minutos. Após esse repouso, adicionou-se 30 mL de solução de KI 16,5 % e 100 mL de água e titulou-se com solução padrão de tiosulfato de sódio 0,1 M. Utilizou-se uma placa de agitação para agitar o conteúdo do matraz. Quando a coloração da solução pareceu mais esbatida, adicionou-se cerca de 1 mL de solução de cozimento de amido e continuou-se a titulação até ao desaparecimento da coloração azul acinzentada. Repetiu-se todo o procedimento com um matraz sem azeite (branco).

3.3.2 Determinação do índice de iodo



A determinação do índice de iodo foi feita utilizando a seguinte expressão:

$$\text{Índice de iodo} = \frac{m_{I_2}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (53)$$

$$\text{Índice de iodo} = \frac{\frac{1}{2}([S_2O_3^{2-}]) \times V_a \times M_{I_2}}{m_{\text{amostra}}} \times 100 \quad (54)$$

Onde m_{I_2} corresponde à massa de iodo, v_a corresponde à diferença entre o volume gasto na titulação com o branco e o volume gasto na titulação com a amostra e M_{I_2} à massa molar do iodo molecular.

3.4 Determinação da constante de partição de antioxidantes em sistemas binários azeite/água

A constante de partição, P_A^O , de um antioxidante numa mistura binária representa o quociente entre a constante de partição entre a fase orgânica e interfacial, P_O^I , e a fase aquosa e interfacial, P_A^I , de uma emulsão. Assim, ao determinar P_A^O obtém-se experimentalmente o valor da razão entre estas duas constantes de partição.

Para a sua determinação de P_A^O , preparou-se uma mistura binária 4:6 (4 mL de azeite sem antioxidantes e 6 mL de solução aquosa – tampão citrato 0,04 M e pH = 3,65 - resultando num volume total de 10 mL). Procedeu-se à dissolução dos antioxidantes (os hidrofílicos na fase aquosa e os hidrofóbicos na fase oleosa) de modo a obter uma concentração final de antioxidante de $3,0 \times 10^{-3}$ M no volume total da mistura binária. Termostatizou-se a mistura a 25 °C e agitou-se com um homogeneizador *Polytron PT 1600 E* a uma velocidade de 20 000 r.p.m. Transferiu-se a mistura para o tubo de centrífuga e procedeu-se à separação das fases por centrifugação durante 45 minutos.

Preparou-se outra mistura binária 4:6 (azeite sem antioxidantes, solução tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65), sem antioxidante, e procedeu-se do mesmo modo. Utilizou-se esta mistura como controlo.

Diluiu-se uma alíquota de 50 μ L da fase aquosa em solução tampão e uma determinada alíquota da fase orgânica (a variar de 85 μ L a 300 μ L, dependendo do antioxidante) numa mistura BuOH:EtOH (50:50, v/v).

O ácido clorogénico apresenta uma absorção máxima no espectro UV-Vis a 324 nm e por isso leram-se as absorvâncias de cada fase a este comprimento de onda (figura 32).

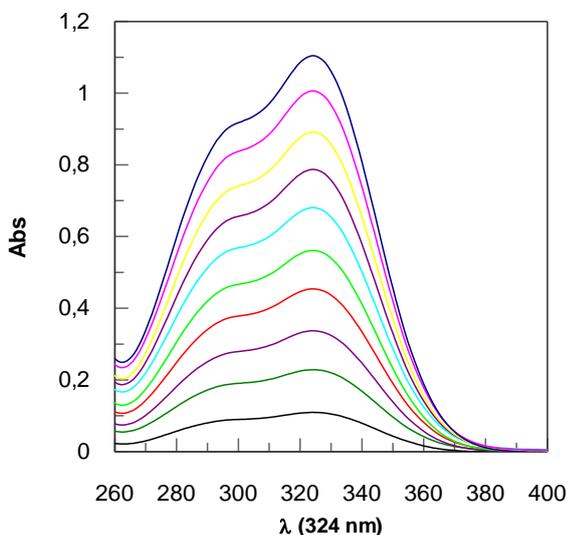


Figura 32 - Espectro de UV-vis de absorção máxima do ácido clorogénico, em concentrações crescentes.

De modo a quantificar a concentração de antioxidante em cada uma das fases, traçaram-se curvas de calibração de absorvância em função da concentração para cada antioxidante utilizando como solvente solução tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 na determinação da concentração de antioxidantes na fase aquosa, ou uma mistura BuOH:EtOH (50:50, v/v), na determinação da concentração de antioxidante na fase oleosa.

Efetuuou-se todo este procedimento para todos os antioxidantes estudados, em triplicado.

Conhecidas as concentrações de antioxidante em cada uma das fases, o valor da constante de partição P_A^O , foi determinado usando a equação 20.

A figura 33 ilustra esquematicamente o procedimento a cima referido utilizado na determinação das constantes de partição dos antioxidantes em sistemas binários azeite/água.

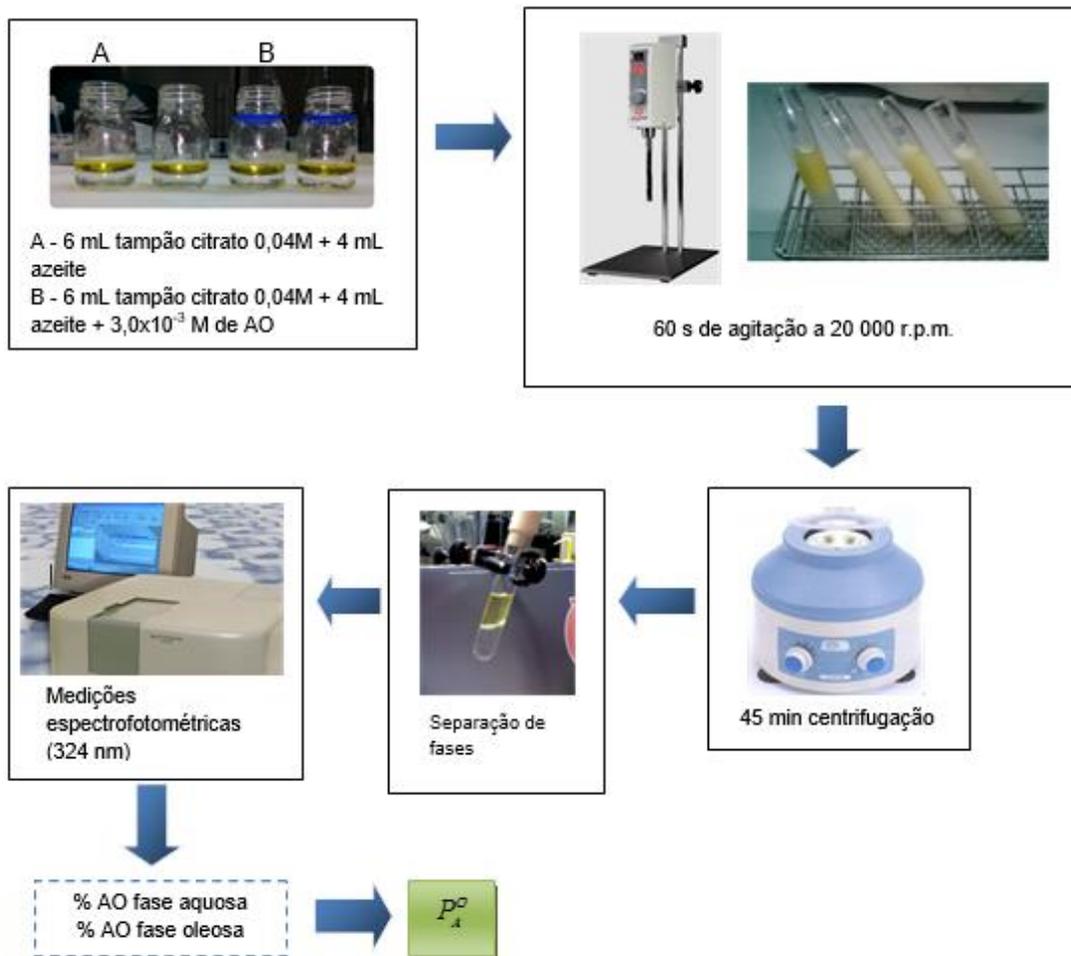


Figura 33 - Procedimento experimental seguido para a obtenção de P_A^O .

3.5 Determinação da distribuição dos antioxidantes em emulsões modelo

3.5.1 Preparação da solução de agente copulante dicloridrato de N-(Naft-1-il) etilenodiamina (NED.2HCl)

Preparou-se a solução de agente copulante dissolvendo-se 4,93 g de dicloridrato de N-(Naft-1-il) etilenodiamina (NED.2HCl) em 500 mL de etanol, perfazendo posteriormente o volume de 1 L com butanol, obtendo-se uma solução com uma concentração de 0,019 M. Armazenou-se esta solução ao abrigo da luz para minimizar a sua fotodecomposição.

3.5.2 Preparação do sal de arenodiazónio

Uma vez que o sal de arenodiazónio a utilizar não existe comercialmente, procedeu-se à sua síntese de acordo com o procedimento descrito por *Doyle* [44].



Figura 34 - Síntese do sal de arenodiazónio.

Num gobelé mantido em banho de gelo-acetona a $-15\text{ }^\circ\text{C}$, colocaram-se 4,5 mL de $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$. De seguida, dissolveram-se 2,54 g de 4-hexadecilanilina (0,024 mol) num mínimo volume possível de tetrahydrofurano (THF) e adicionou-se esta solução ao $\text{BF}_3\cdot\text{Et}_2\text{O}$ com agitação contínua. À mistura resultante e em agitação adicionaram-se gota a gota 3,3 mL de nitrito de n-butilo (BuONO) (0,029 mol) iniciando-se a reação de diazotação.

Uma vez adicionado todo o BuONO deixou-se a reagir durante 20 minutos para assegurar que a reação fosse completa. Decorrido este tempo, procedeu-se à purificação do sal obtido por cristalização, com acetonitrilo e com éter etílico. Filtrou-se o precipitado sob vácuo e recristalizou-se mais três vezes com acetonitrilo e éter etílico.

Obtiveram-se 0,8197 g de um sólido cristalino de cor esbranquiçada (rendimento de 32 %) que foi armazenado no congelador, com o objetivo de minimizar a sua decomposição.

Prepararam-se as soluções do sal tetrafluoroborato de 4-hexadecilbenzenodiazólio pesando o composto diretamente para um eppendorf opaco e dissolvendo-o posteriormente em 1 mL de acetonitrilo. Armazenaram-se estas soluções a - 20 °C, na ausência de luz.

3.5.3 Preparação de emulsões

Prepararam-se 10 mL de cada emulsão, misturando azeite livre de antioxidantes naturais com tampão citrato (0,04 M e pH = 3,65) numa proporção de 4:6 (O/A), com diferentes frações de emulsionante Tween 20, ($\Phi_1 = 0,005 - 0,040$) e contendo uma concentração de antioxidante de 3×10^{-3} M.

Para se formar a emulsão aplicou-se agitação constante durante 1 minuto com um homogeneizador Polytron PT 1600 E, a uma velocidade de 20 000 r.p.m, formando-se assim uma mistura homogénea, opaca e com aspeto leitoso. Introduziu-se esta mistura numa célula termostaticada a uma temperatura de 25 °C e em agitação constante.

3.5.4 Determinação das constantes de velocidade k_{obs} das emulsões

Uma vez alcançada a temperatura ideal de trabalho (25 °C) na célula que continha a emulsão, iniciou-se a reação do antioxidante com adição de uma alíquota da solução de 16-ArN₂⁺ 0,17 M à emulsão.

Retirou-se uma alíquota de 200 μ L da mistura reacional ao longo do tempo e adicionou-se de imediato e com agitação, a um dos tubos de ensaio contendo solução de NED.2HCl termostaticada, previamente preparados (2,5 mL solução de NED.2HCl, 0,019 M), observando-se a imediata formação do corante azóico (figuras 12 e 35).



Figura 35 – Tubos de ensaio em que se observa a coloração púrpura devida à formação do corante azóico.

Determinou-se a absorvância da solução contendo o corante obtido para cada tempo de reação a um comprimento de onda de $\lambda = 572$ nm.

Obteve-se o valor da constante de velocidade observada para cada fração de emulsionante, k_{obs} , ajustando os dados absorvância-tempo à equação 55:

$$\ln \frac{Abs_t - Abs_{inf}}{Abs_0 - Abs_{inf}} = -k_{obs}t \quad (55)$$

onde Abs_t , Abs_{inf} e Abs_0 representam a absorvância a um tempo t , a absorvância infinita e a absorvância a um tempo inicial, respetivamente e k_{obs} é a constante de velocidade observada.

3.6 Determinação da atividade antiradicalar

3.6.1 Método do DPPH• (meios homogêneos)

A atividade antiradicalar de compostos fenólicos presentes em emulsões alimentares pode ser avaliada por um método colorimétrico simples - método de DPPH•. Neste método é utilizado o radical DPPH• (apresenta uma cor púrpura muito forte), que em solução metanólica apresenta uma banda de absorção máxima característica no espectro UV-vis a 515 nm e cuja absorvância pode ser medida por espectrofotometria de UV-vis. A adição de antioxidantes ao radical DPPH• resulta numa diminuição da quantidade do radical e conseqüentemente da absorvância da solução.

A atividade antiradicalar define-se a partir do parâmetro EC_{50} , que representa a concentração de antioxidante necessária para captar 50% dos radicais iniciais do DPPH• (medida em mol AO / mol DPPH•).

Assim, efetuou-se a determinação dos valores do EC_{50} para o ácido clorogénico e seus derivados, seguindo espectrofotometricamente o desaparecimento do radical DPPH• ($\lambda = 515$ nm) para diferentes concentrações de antioxidante.

Numa placa BD Falcon de 96 poços (8x12) de poliestireno, colocaram-se 250 μ L da solução metanólica de DPPH• com uma concentração de 0,0040 M e adicionaram-se 50 μ L de uma solução metanólica de cada antioxidante (0,040 - 0,245 mol AO / mol DPPH•, concentração em cada poço).

Determinou-se a variação da absorvância a 515 nm por um período de 60 minutos, com intervalos de 5 minutos. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicado.

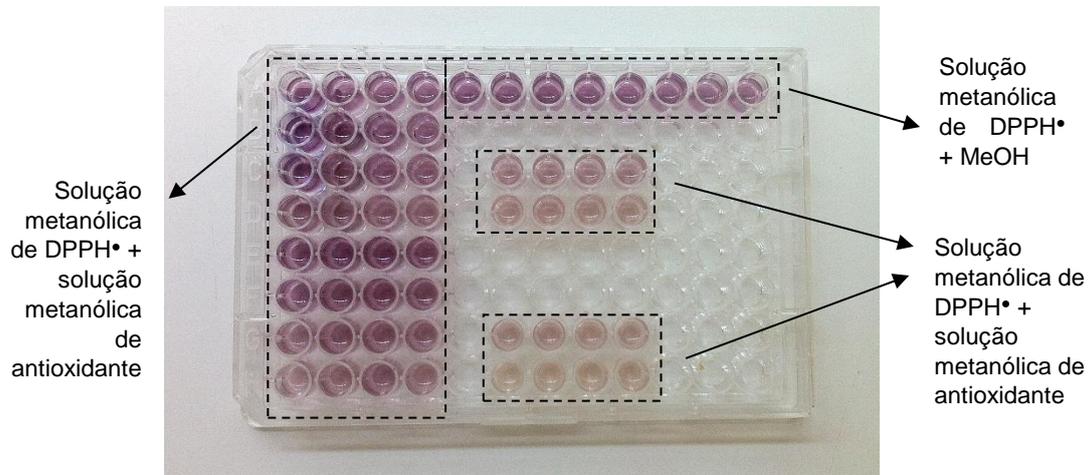


Figura 36 - Placa de 96 poços utilizada no método de DPPH• com as soluções metanólicas de DPPH• e soluções metanólicas para dois antioxidantes, realizadas em quadruplicado.

Registando a diminuição da absorvância ao longo do tempo, na presença de diferentes concentrações de antioxidantes, pode-se calcular a percentagem de DPPH• que não reagiu com o antioxidante para os diferentes tempos (5 minutos, 15 minutos, 30 minutos e 60 minutos). A percentagem de DPPH• pode ser representada para cada tempo em função de cada uma das concentrações de antioxidante expressas em mol de AO / mol DPPH•. A esta variação pode ser feito um ajuste linear, onde a ordenada na origem corresponde à percentagem de DPPH•, na ausência de antioxidante.

A partir da reta de ajuste, é possível determinar o valor do parâmetro EC_{50} , que corresponde à relação mol de AO / mol de DPPH• onde a percentagem de DPPH• é metade da inicial (com ausência de antioxidante). Os antioxidantes com menor EC_{50} são aqueles com maior atividade antiradicalar.

3.6.2 Teste da estufa de Schaal (meios heterogêneos)

3.6.2.1 Procedimento experimental

Prepararam-se emulsões 4:6 (O/A) com tampão citrato (0,04 M e pH = 3,65), azeite sem antioxidantes, uma determinada quantidade (0,5 %, 1 % e 2 %) de

emulsionante Tween 20 e 50 µL de solução metanólica de antioxidante 0,05 M. Prepararam-se estas emulsões em triplicado, em frascos previamente tratados com solução saturada de NaOH e solução de HCl 37 % com o objetivo de evitar contaminações com metais. Prepararam-se também emulsões sem a adição de antioxidante (amostras controlo). Aplicou-se a cada amostra agitação constante durante 1 minuto com um homogeneizador Polytron PT 1600 E, a uma velocidade de 20 000 r.p.m., e colocaram-se na estufa a 60 °C para acelerar o processo de oxidação lipídica.

Periodicamente retiraram-se alíquotas de 50 µL de cada amostra, analisando-se de seguida o conteúdo em dienos conjugados.

3.6.2.2 Determinação do conteúdo de dienos conjugados

Os hidroperóxidos contendo dienos conjugados que se formam durante o processo de oxidação apresentam uma forte banda de absorção a $\lambda = 233$ nm, podendo ser determinados por espectrofotometria.

Para isso, retiraram-se periodicamente alíquotas de 50 µL de cada amostra sujeita ao teste de Schaal para balões volumétricos de 10 mL. Dissolveu-se cada amostra em etanol e analisou-se o conteúdo em dienos conjugados medindo a absorvância desta solução ao comprimento de onda de $\lambda = 233$ nm.

Calculou-se a percentagem de dienos conjugados (% DC) usando a massa molecular relativa do ácido linoleico (280 g/mol) e a absorvidade molar do hidroperóxido ($\epsilon=26000$), segundo a equação 56:

$$\% DC = 1,0769 \frac{Abs_{233nm}}{C_{azeite(g/L)}} \quad (56)$$

Onde $Abs_{233\text{ nm}}$ corresponde à absorvância da solução medida e C_{azeite} corresponde à concentração de azeite na solução em g/L.

3.7 Análise estatística

Os resultados deste trabalho foram analisados estatisticamente por ANOVA (Analys of Variance) com um nível de significância $p \leq 0,05$, usando o teste de Duncan. O software utilizado foi o SPSS 20,0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese dos derivados do ácido clorogénico

Sintetizaram-se vários ésteres derivados do ácido clorogénico por esterificação, adicionando ao ácido clorogénico, um álcool com cadeia alquílica a variar de um carbono a 16 carbonos, de acordo com o procedimento descrito por *Giraldo et al.* [41] com algumas modificações.

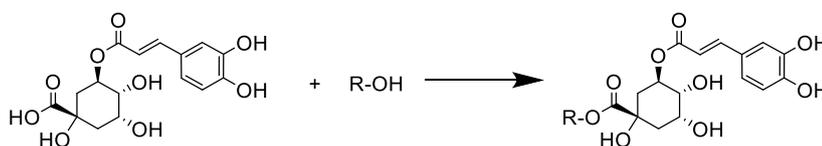


Figura 37 - Síntese dos derivados do ácido clorogénico.

Os rendimentos obtidos, após purificação variaram de 16 % a 72 % (tabela 1).

Tabela 1 - Resultados experimentais das massas e rendimentos obtidos nas sínteses dos derivados do ácido clorogénico.

Derivados	R	m _{obtida} /g	Rendimento (%)
C1	CH ₃	0,08	16
C2	C ₂ H ₅	0,36	72
C3	C ₃ H ₇	0,35	59
C4	C ₄ H ₉	0,40	68
C8	C ₈ H ₁₇	0,26	61
C10	C ₁₀ H ₂₁	0,34	36
C12	C ₁₂ H ₂₅	0,16	46
C16	C ₁₆ H ₃₃	0,39	48

Verificou-se que o baixo rendimento obtido para o derivado C1 se deve ao facto de se ter perdido composto na fase aquosa nas extrações líquido-líquido, devido ao facto de este antioxidante ser bastante hidrofílico.

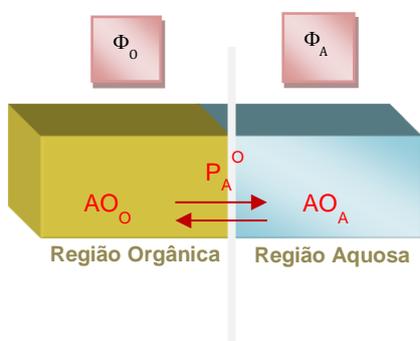
Relativamente aos rendimentos obtidos para os derivados de cadeia longa, verificou-se que a purificação por extração líquido-líquido era dificultada pelo facto dos sais destes compostos apresentarem propriedades tensoativas consideráveis. Assim, aquando da extração dos derivados da mistura reacional com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio, formavam-se emulsões de difícil separação bem como espuma abundante, o que poderá justificar os rendimentos mais baixos obtidos para estes compostos.

4.2 Distribuição do ácido clorogénico e dos seus derivados em sistemas binários azeite/ água

4.2.1 Determinação da Constante de Partição P_A^O

O valor da constante de partição, P_A^O , do ácido clorogénico e dos derivados foi determinada numa mistura binária constituída por 4 mL de azeite e 6 mL de tampão citrato (0,04 M e pH = 3,65), contendo uma concentração de $3,0 \times 10^{-3}$ M do antioxidante, de acordo com o procedimento descrito na secção experimental.

Para que isso fosse possível, fez-se a quantificação espectrofotométrica dos vários antioxidantes nas fases oleosa e aquosa, e calculou-se a constante de partição baseado no seguinte esquema e utilizando a seguinte equação:



$$P_A^O = \frac{P_A^I}{P_O^I} = \frac{(AO_O)}{(AO_A)} = \frac{\% AO_O \cdot V_A}{\% AO_A \cdot V_O}$$

Na tabela 2 encontram-se os valores obtidos para os diferentes antioxidantes.

Tabela 2 - Percentagem dos diferentes antioxidantes presentes na fase aquosa e orgânica de uma mistura binária azeite/água e o valor da constante de partição P_A^O .

		CGA	C2	C4	C8	C10	C12	C16
Mistura binária (4:6 azeite/água)	%AO _O	0,45	5,4	4,54	92,9	94,7	95,9	99,5
	%AO _A	99,55	94,6	93,4	7,1	5,3	4,1	0,5
	P_A^O	0,0068 ± 0,0004	0,0856 ± 0,0016	0,0729 ± 0,0023	19,63 ± 0,61	26,80 ± 0,88	35,09 ± 1,24	298,5 ± 11,4

Verifica-se, como esperado, a quase total solubilidade do ácido clorogénico na fase aquosa da mistura binária. A partir do clorogenato de octilo todos os antioxidantes praticamente se localizam na fase oleosa, logo verifica-se um aumento do valor da constante de partição P_A^O , à medida que aumenta a cadeia alquílica do derivado. É de notar que os antioxidantes em estudo ou se localizam quase na totalidade na fase aquosa, ou quase na totalidade na fase oleosa, tendo por isso sido determinadas posteriormente as suas distribuições em emulsões a partir do modelo cinético de pseudofase simplificado.

4.3 Distribuição do ácido clorogénico em emulsões azeite/tampão citrato (o/a)

4.3.1 Determinação de k_{obs} mediante o método de derivatização e cálculo de P_A^I do ácido clorogénico

Neste trabalho estudou-se o efeito que a fração de emulsionante tem no valor da constante de velocidade da reação observada, k_{obs} , entre os iões $16-ArN_2^+$ e o ácido clorogénico e seus derivados em emulsões 4:6 azeite/tampão citrato (0,04 M, pH = 3,65) para frações de emulsionante (Tween 20) que variaram de 0,005 a 0,042. Para determinar o valor de k_{obs} , utilizou-se o método da derivatização descrito no capítulo anterior. Em todos os casos, os dados absorvância-tempo obtidos ajustaram-se perfeitamente à equação integrada de ordem 1, sendo assim possível obter a constante de velocidade observada, k_{obs} . Na figura 38 está representado um exemplo de uma variação típica da absorvância do corante utilizado em função do tempo, bem como a representação de $\ln(Abs_t - Abs_{inf})$ em função do tempo.

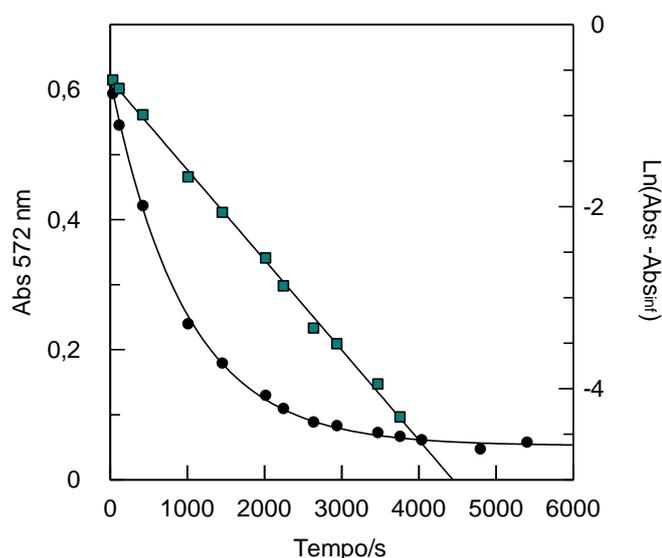


Figura 38 - Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [Abs_t - Abs_{inf}]$ vs tempo. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $\Phi_1 = 0,0281$, $[16-ArN_2^+] = 2,90 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 2,8 \times 10^{-3}$ M, $[NED.2HCl] = 0,019$ M e $T = 25,5$ °C.

Como observado na tabela 2, mais de 98% do ácido clorogénico encontra-se na fase aquosa. Assim, o tratamento dos resultados experimentais foi feito utilizando o modelo cinético de pseudofase simplificado, ajustando os dados (k_{obs} , Φ_1) às equações 46 e 47 (figura 41) deduzidas na secção 1.5.2.2. Através do gráfico da figura 39,

verificou-se que ocorreu uma diminuição de k_{obs} à medida que o valor de Φ_I presente na emulsão aumentou.

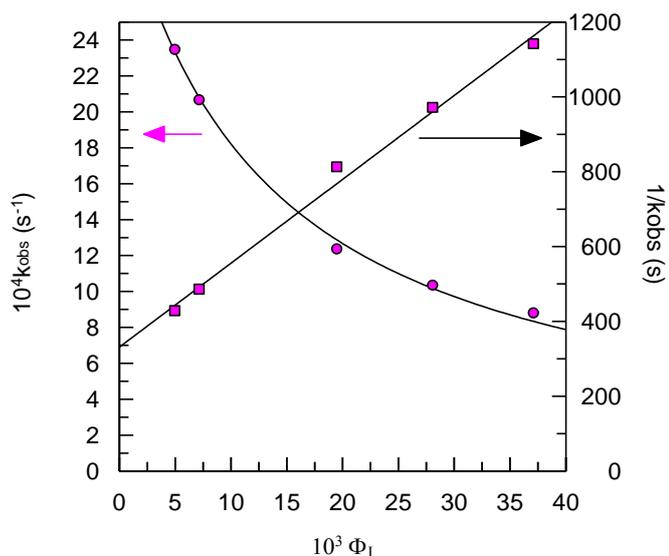


Figura 39 - Representação de k_{obs} e $1/k_{obs}$ vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respectivos ajustes às equações 46 e 47. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $[16-ArN_2^+] = 2,90 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 2,8 \times 10^{-3}$ M, $[NED.2HCl] = 0,019$ M e $T = 25,5$ °C.

Da representação linear de $1/k_{obs}$ vs Φ_I (figura 39), podem-se obter os parâmetros a e b através do ajuste à equação 47, a partir dos valores do declive e da ordenada na origem (tabela 3).

Tabela 3 - Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da Figura 39 à equação 47.

Parâmetro	Emulsão (4:6)
$10^2 a$	$0,0042 \pm 0,0002$
b	$77,72 \pm 5,80$

Utilizando o valor de a e b calculou-se o valor de k_I e P_A^I , tabela 4.

Tabela 4 - Valores de P_A^I e k_I obtidos para a emulsão 4:6 a partir do ajuste dos dados da Figura 39 à equação 47.

Emulsão (4:6)	
P_A^I	$k_I (M^{-1}s^{-1})$
$40,58 \pm 3,71$	$0,0149 \pm 0,0007$

4.3.2 Determinação da distribuição do ácido clorogénico entre a região aquosa e interfacial

Conhecendo o valor de P_A^I e aplicando as equações 49 e 50 do modelo da pseudofase simplificado (MCPS), determinou-se a percentagem de ácido clorogénico nas regiões aquosa e interfacial da emulsão, para cada valor de Φ_1 (figura 40).

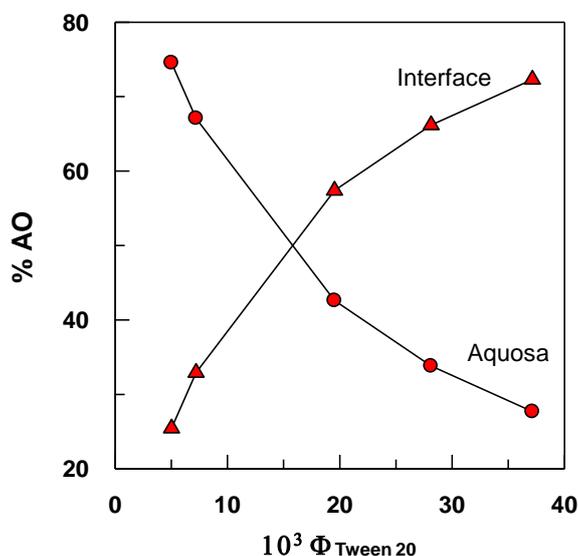


Figura 40 - Variação da percentagem de ácido clorogénico nas fases aquosa e interfacial do sistema emulsionado. emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65/ Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 2,90 \times 10^{-4}$ M, $[\text{AO}] = 2,8 \times 10^{-3}$ M, $[\text{NED.2HCl}] = 0,019$ M e $T = 25,5$ °C.

Através dos resultados da figura 40, verificou-se que para uma fração de emulsificante (Φ_1) de 0,005 apenas 25 % do ácido clorogénico se encontra distribuído na região interfacial mas à medida que Φ_1 aumenta, a concentração do AO também vai aumentando na interface, ou seja, quando $\Phi_1 \approx 0,04$, cerca de 70 % do antioxidante encontra-se nesta região da emulsão.

A partir destes resultados pode-se concluir que a fração de emulsificante exerce uma grande influência sobre a percentagem de antioxidante que se encontra em cada fase da emulsão: quanto maior for Φ_1 maior será a percentagem de ácido clorogénico presente na interface.

4.4 Distribuição do clorogenato de etilo e butilo em emulsões azeite/ tampão citrato (o/a)

4.4.1 Determinação de k_{obs} mediante o método de derivatização e cálculo de P_A^I

Estudou-se o efeito que a fração de emulsionante tem no valor da constante de velocidade da reação observada, k_{obs} , entre os iões $16-ArN_2^+$ e os clorogenato de etilo e butilo em emulsões 4:6 azeite/tampão citrato (0,04 M, pH = 3,65) para frações de emulsionante (Tween 20) que variaram de 0,005 a 0,042. Para determinar o valor de k_{obs} , utilizou-se o método da derivatização descrito no capítulo anterior. Em todos os casos, os dados absorvância-tempo obtidos ajustaram-se perfeitamente à equação integrada de ordem 1, sendo assim possível obter a constante de velocidade observada, k_{obs} . Na figura 41 está representado um exemplo de uma variação típica da absorvância do corante utilizado em função do tempo, bem como a representação de $\ln(Abs_t - Abs_{inf})$ em função do tempo.

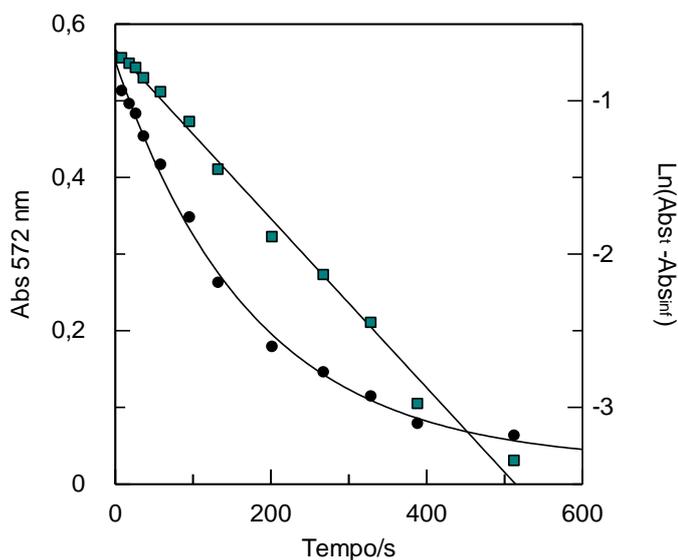


Figura 41 - Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [Abs_t - Abs_{inf}]$ vs tempo. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $\Phi_1 = 0,0154$, $[16-ArN_2^+] = 1,93 \times 10^{-4}$ M, $[C2] = 2,04 \times 10^{-3}$ M, $[NED.2HCl] = 0,019$ M e $T = 25,5^\circ C$.

Como se pode observar pelo valor de P_A^O ($P_A^O(C2) = 0,0856$ e $P_A^O(C4) = 0,0729$), o clorogenato de etilo e butilo são maioritariamente solúveis na região aquosa, sendo por isso, só necessária uma constante de partição, P_A^I , para descrever as suas distribuições em emulsões, pelo que os dados experimentais foram interpretados com

base no modelo cinético de pseudofase simplificado, visto que os resultados são aproximadamente iguais àqueles que seriam obtidos através do modelo cinético de pseudofase completo.

Através dos gráficos da figura 42, verificou-se que ocorreu uma diminuição de k_{obs} à medida que o valor de Φ_1 presente na emulsão aumentou.

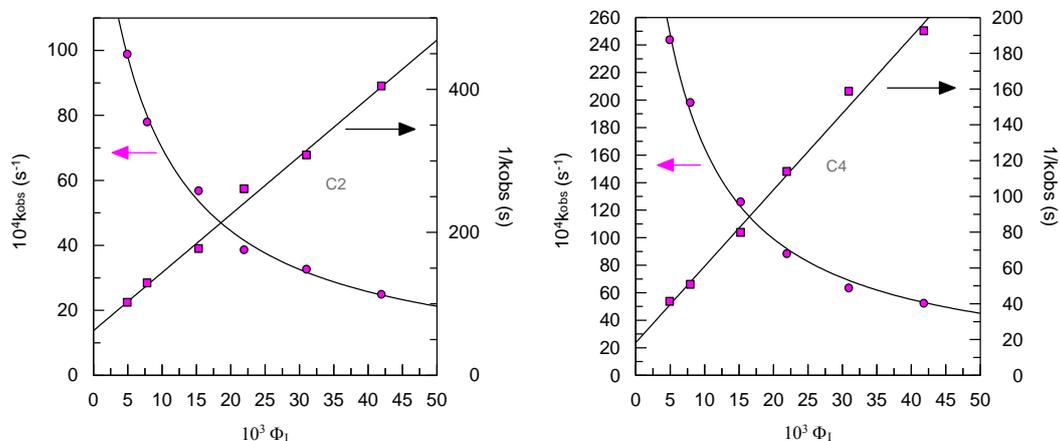


Figura 42 - Representação de k_{obs} e $1/k_{obs}$ vs fração de emulsionante (Φ_1) com os respectivos ajustes às equações 46 e 47. Condições experimentais são emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), [NED.2HCl] = 0,019 M e T = 25,0 °C; para C2: $[16-ArN_2^+] = 1,93 \times 10^{-4}$ M, [AO] = $2,00 \times 10^{-3}$ M, para C4: $[16-ArN_2^+] = 2,81 \times 10^{-4}$ M, [AO] = $3,00 \times 10^{-3}$ M.

Da representação linear de $1/k_{obs}$ vs Φ_1 (figura 42), podem-se obter os parâmetros a e b através do ajuste à equação 47, a partir dos valores do declive e da ordenada na origem (tabela 5).

Tabela 5 - Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da Figura 42 à equação 47.

Parâmetro	Emulsão (4:6) (C2)	Emulsão (4:6) (C4)
$10^2 a$	0,0122	$0,0248 \pm 0,0013$
b	134,18	$199,57 \pm 25,86$

A partir dos parâmetros a e b calcularam-se os valores de k_i e P_A^I , tabela 6.

Tabela 6 - Valores de P_A^I e k_i obtidos para a emulsão 4:6 a partir do ajuste dos dados da Figura 42 à equação 47.

Emulsão (4:6) (C2)		Emulsão (4:6) (C4)	
P_A^I	k_i (M ⁻¹ s ⁻¹)	P_A^I	k_i (M ⁻¹ s ⁻¹)
$78,36 \pm 11,77$	$0,0615 \pm 0,0028$	$140,60 \pm 31,28$	$0,0777 \pm 0,0030$

Pela análise da tabela 6, verificou-se que o valor de P_A^I aumentou do clorogenato de etilo para o clorogenato de butilo o que indica que este último se encontra mais distribuído na região interfacial da emulsão. Relativamente à reatividade destes antioxidantes na região interfacial da emulsão representada pela constante de velocidade k_i , verificou-se que não existem diferenças significativas o que mostra que existe uma reatividade intrínseca muito similar.

4.4.2 Determinação da distribuição do clorogenato de etilo e butilo pelas regiões aquosa e interfacial

Conhecido o valor de P_A^I e aplicando as equações 49 e 50 do modelo da pseudofase simplificado (MCPS), obteve-se a percentagem de antioxidante nas regiões aquosa e interfacial da emulsão, para cada valor de Φ_i , (figura 43).

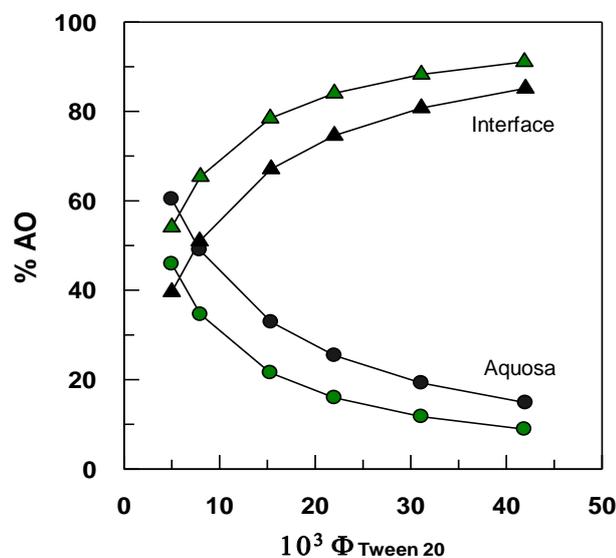


Figura 43 - Variação da percentagem do clorogenato de etilo (preto) e butilo (verde) nas regiões aquosa e interfacial do sistema emulsionado. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), T = 25 °C.

Os resultados que se encontram na figura 43 indicam que cerca de 80 % do clorogenato de etilo e mais de 90 % do clorogenato de butilo encontram-se distribuídos na região interfacial quando $\Phi_i \approx 0,04$. Para uma fração de emulsionante de 0,005, o clorogenato de butilo encontra-se distribuído, aproximadamente, 53 % na região interfacial e apenas 40 % do clorogenato de etilo, para a mesma fração de emulsionante ($\Phi_i \approx 0,005$), se encontra distribuído nesta região. Deste modo, uma quantidade substancial de cada antioxidante ainda se encontra dissolvida na região aquosa.

4.5 Distribuição do clorogenato de octilo, decilo, dodecilo e hexadecilo em emulsões azeite/ tampão citrato (o/a)

4.5.1 Determinação de k_{obs} mediante o método de derivatização e cálculo de P_O^I

Estudou-se o efeito que a fração de emulsionante tem no valor da constante de velocidade da reação observada, k_{obs} , entre os iões 16-ArN_2^+ e os derivados do ácido clorogénico de cadeia longa em emulsões 4:6 azeite/tampão citrato (0,04 M, pH = 3,65) para frações de emulsionante (Tween 20) que variaram de 0,005 a 0,042. Para determinar o valor de k_{obs} , utilizou-se o método da derivatização descrito no capítulo anterior. Em todos os casos, os dados absorvância-tempo obtidos ajustaram-se perfeitamente à equação integrada de ordem 1, sendo assim possível obter a constante de velocidade observada, k_{obs} . Na figura 44 está representado um exemplo de uma variação típica da absorvância do corante utilizado em função do tempo, bem como a representação de $\ln(Abs_t - Abs_{inf})$ em função do tempo.

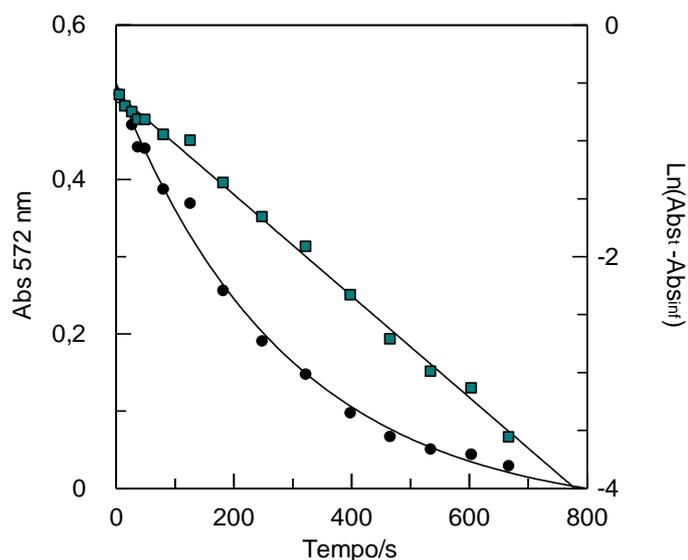


Figura 44 - Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [Abs_t - Abs_{inf}]$ vs tempo. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $\Phi_1 = 0,0420$, $[16\text{-ArN}_2^+] = 1,95 \times 10^{-4}$ M, $[C8] = 2,04 \times 10^{-3}$ M, $[NED.2HCl] = 0,019$ M e $T = 25,3$ °C.

Dado que pelo menos 93 % de cada um destes antioxidantes se encontram na fase orgânica (ver valor de P_A^O na tabela 2), só foi necessária uma constante de partição para descrever a distribuição, P_O^I , pelo que os dados experimentais podem ser interpretados com base no modelo cinético simplificado de pseudofase, ajustando os

dados (k_{obs} , Φ_1) às equações 39 e 42 (figura 45) deduzidas na secção 1.5.2.2. Através dos gráficos da figura 45, verificou-se que ocorreu uma diminuição de k_{obs} à medida que o valor de Φ_1 presente na emulsão aumentou, para os quatro antioxidantes.

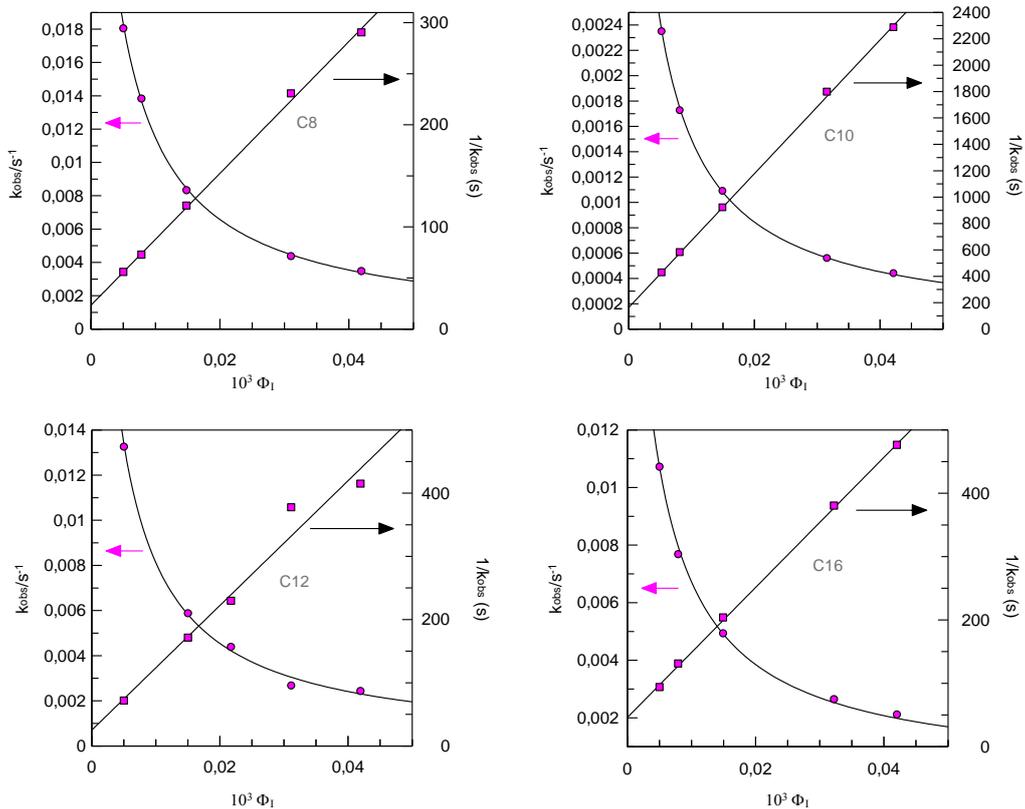


Figura 45 - Representação de k_{obs} e $1/k_{obs}$ vs fração de emulsionante (Φ_1) com os respetivos ajustes às equações 39 e 42. Condições experimentais C8-CGA: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $[16-ArN_2^+] = 1,95 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 2,00 \times 10^{-3}$ M, $[NED.2HCl] = 0,019$ M e $T = 25,3$ °C; Condições experimentais C10-CGA: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $[16-ArN_2^+] = 1,76 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 1,80 \times 10^{-3}$ M, $[NED.2HCl] = 0,019$ M e $T = 25,1$ °C; Condições experimentais C12-CGA: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $[16-ArN_2^+] = 1,77 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 1,80 \times 10^{-3}$ M, $[NED.2HCl] = 0,019$ M e $T = 25,5$ °C; Condições experimentais C16-CGA: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), $[16-ArN_2^+] = 1,96 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 1,80 \times 10^{-3}$ M, $[NED.2HCl] = 0,019$ M e $T = 25,0$ °C.

Da representação linear de $1/k_{obs}$ vs Φ_1 (figura 45), obtiveram-se os parâmetros a e b através do ajuste à equação 42, a partir dos valores do declive e da ordenada na origem (tabela 7).

Tabela 7 - Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da Figura 45 à equação 42.

Parâmetro	Emulsão (4:6) (C8)	Emulsão (4:6) (C10)	Emulsão (4:6) (C12)	Emulsão (4:6) (C16)
$10^2 a$	$0,0154 \pm 0,0004$	$0,0019 \pm 0,0024$	$0,0103 \pm 0,0005$	$0,0090 \pm 0,0004$
b	$294,78 \pm 20,10$	$333,98 \pm 13,15$	$374,91 \pm 61,07$	$293,04 \pm 39,57$

A partir dos parâmetros a e b calcularam-se os valores de k_1 e P_0^I , tabela 8.

Tabela 8 - Valores de P_O^I e k_I obtidos para a emulsão 4:6 a partir do ajuste dos dados da Figura 45 à equação 42.

Emulsão (4:6)							
C8		C10		C12		C16	
P_O^I	k_I ($M^{-1}s^{-1}$)	P_O^I	k_I ($M^{-1}s^{-1}$)	P_O^I	k_I ($M^{-1}s^{-1}$)	P_O^I	k_I ($M^{-1}s^{-1}$)
110,71 ± 17,13	0,0771 ± 0,0017	124,31 ± 12,76	0,0109 ± 0,0002	158,51 ± 24,42	0,0560 ± 0,0060	89,28 ± 6,33	0,0538 ± 0,007

Através análise da tabela 8, verificou-se que o valor de P_O^I aumentou do clorogenato de octilo para o clorogenato de dodecilo, diminuindo para o clorogenato de hexadecilo. Uma vez que pela definição de P_O^I , o antioxidante que tiver maior valor será aquele com maior percentagem na região interfacial da emulsão, então o C12 estando em maior percentagem nesta região, deverá apresentar maior atividade antioxidante. Relativamente à reatividade destes antioxidantes na região interfacial da emulsão representada pela constante de velocidade k_I , verificamos que não existem diferenças significativas, o que mostra que existe uma reatividade intrínseca similar.

4.5.2 Determinação da distribuição do clorogenato de octilo, decilo, dodecilo e hexadecilo pelas regiões oleosa e interfacial

Conhecido o valor de P_O^I e aplicando as equações 44 e 45 do modelo da pseudofase simplificado (MCPS), obteve-se a percentagem de antioxidante nas regiões aquosa e interfacial da emulsão, para cada valor de Φ_1 (figura 46).

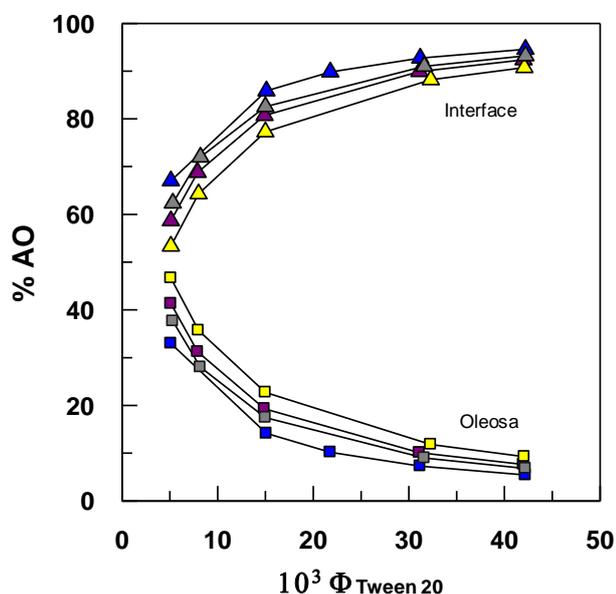


Figura 46 - Variação da percentagem do clorogenato de octilo (roxo), decilo (cinzento), dodecilo (azul) e hexadecilo (amarelo) nas regiões orgânica e interfacial do sistema emulsionado. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65) / Tween 20), T = 25 °C.

Os resultados que se encontram na figura 46, indicam que para uma fração de emulsionante aproximadamente igual a 0,04, cerca de 90 % do clorogenato de octilo, decilo, dodecilo e hexadecilo encontravam-se distribuídos na região interfacial da emulsão. Para a Φ_1 mais baixa utilizada (0,005), o clorogenato de hexadecilo encontrava-se numa percentagem de cerca de 53 % na região interfacial, já os restantes antioxidantes clorogenato de octilo, decilo e dodecilo encontravam-se numa percentagem de 58 %, 62 % e 67 %, respetivamente, na região interfacial.

4.6 Análise comparativa da distribuição do ácido clorogénico e seus derivados

Com os resultados anteriormente apresentados, foi possível analisar em simultâneo a variação da percentagem de ácido clorogénico e seus derivados em cada uma das regiões (aquosa, interfacial e oleosa) de uma emulsão 4:6 (azeite/tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65). Na figura 47 e tabela 9 apresentam-se os valores das percentagens do ácido clorogénico e dos seus derivados presentes nas três regiões da emulsão.

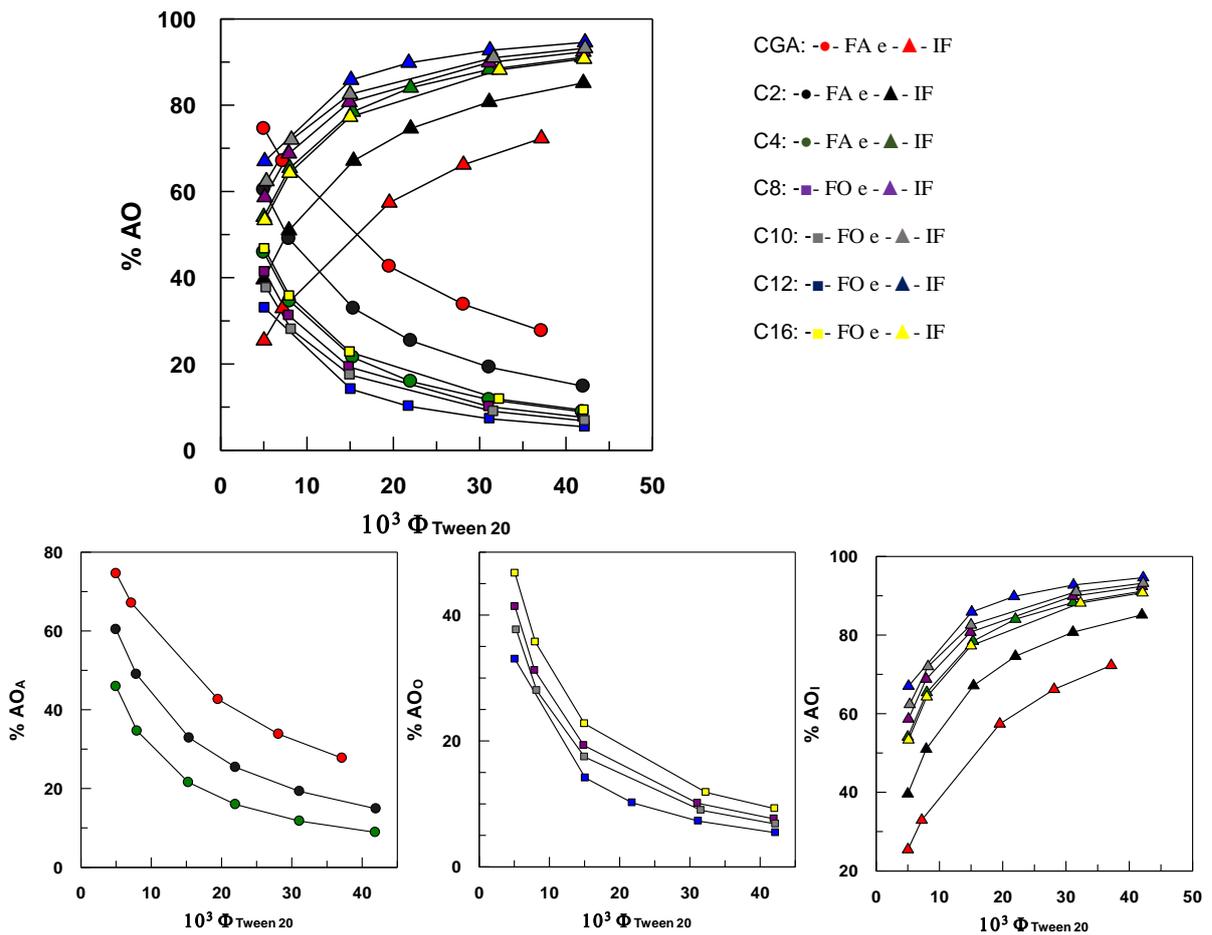


Figura 47 - Variação da percentagem do ácido clorogénico e seus derivados nas regiões oleosa, interfacial e aquosa do sistema emulsionado. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), T = 25 °C.

Tabela 9 - Percentagem (em valor aproximado) do ácido clorogénico e dos seus derivados para as frações de emulsionante de 0,005 e 0,042, nas três regiões da emulsão.

Antioxidante	Φ_1	%AO _I	%AO _A	%AO _O
CGA	0,005	25	75	-
	0,042	75	25	-
C2	0,005	40	60	-
	0,042	85	15	-
C4	0,005	54	46	-
	0,042	91	9	-
C8	0,005	59	-	41
	0,042	92	-	8
C10	0,005	62	-	38
	0,042	93	-	7
C12	0,005	67	-	33
	0,042	95	-	5
C16	0,005	53	-	47
	0,042	91	-	9

Tabela 10 - Valores de P_A^I , P_O^I , k_i , e P_A^O , obtidos para o ácido clorogénico e seus derivados.

		CGA	C2	C4	C8	C10	C12	C16
Emulsão 4:6 (azeite/água)	P_A^I	40,58 ± 3,71	78,36 ± 11,77	140,60 ± 31,28	---	---	---	---
	P_O^I	---	---	---	110,71 ± 17,13	124,31 ± 12,76	158,51 ± 24,42	89,28 ± 6,33
	k_i	0,0149 ± 0,0007	0,0615 ± 0,0028	0,0777 ± 0,0030	0,0771 ± 0,0017	0,0109 ± 0,0002	0,0560 ± 0,0060	0,0538 ± 0,0007
Mistura binária 4:6 (azeite água)	P_A^O	0,00678 ± 0,004	0,0856 ± 0,0016	0,0729 ± 0,0023	19,63 ± 0,61	26,80 ± 0,88	35,09 ± 1,24	298,5 ± 11,4

Em misturas binárias, verifica-se um aumento de P_A^O há medida que aumenta a hidrofobicidade dos antioxidantes estudados. Verifica-se igualmente que os derivados C2 e C4 apesar da cadeia alquílica introduzida, são muito hidrofílicos com valores de $P_A^O < 1$. É de notar ainda que ocorre um aumento do valor da constante de partição binária do C4 para o C8 de 270 vezes, indicando que o derivado C8, em contraste com o C4, é praticamente insolúvel em água.

Pela observação da figura 47 e da tabela 9, podemos verificar que o ácido clorogénico e seus ésteres derivados têm distribuições bastante diferentes pelas três regiões da emulsão, em especial para frações de emulsionante mais baixas e para os antioxidantes mais hidrofílicos, CGA e C2, comparativamente aos restantes derivados. Existem diferenças muito acentuadas nas percentagens de antioxidante na região interfacial a $\Phi_1 = 0,005$ que vão de apenas 25 % para CGA e 40 % para o C2, até 67 % para o C12, o antioxidante presente em maior percentagem nesta região.

Os resultados permitem concluir igualmente que a fração em volume de emulsionante exerce uma influência significativa sobre a fração de antioxidante que se encontra em cada fase. Quanto maior for Φ_1 (quer dizer, a concentração de emulsionante utilizado na preparação da emulsão) maior é a percentagem de ácido clorogénico e seus derivados presente na interface.

Em relação aos valores de P_O^I obtidos para os antioxidantes estudados (tabela 10), verifica-se um aumento a partir do clorogenato de octilo para o clorogenato de dodecilo, decrescendo para o clorogenato de hexadecilo, verificando-se o efeito “*cut-off*”. Ora, se atendermos à definição de P_O^I , isto indica-nos que, para compostos que se distribuem apenas pelas regiões interfacial e oleosa, quanto maior é o valor de P_O^I , maior é a quantidade de antioxidante na interface. Do mesmo modo, para os compostos que se distribuem pelas regiões interfacial e aquosa também se verifica que à medida que aumenta o valor de P_A^I , maior será a percentagem de antioxidante na interface. Assim, e após determinar a distribuição dos vários antioxidantes pelas diferentes regiões da emulsão, verificou-se que a percentagem de antioxidante na interface seguiu a seguinte ordem: C12 > C10 > C8 > C4 > C16 > C2 > CGA. Logo, pode-se afirmar que o derivado C12 é aquele que deverá apresentar maior eficácia na inibição da oxidação lipídica se existir uma correlação entre a eficácia antioxidante e a percentagem de antioxidante na região interfacial da emulsão.

Em relação à reatividade do ácido clorogénico e seus derivados na interface, os valores de k_i têm a mesma ordem de magnitude, o que indica que existe uma reatividade intrínseca muito similar entre todos os antioxidantes, o que seria de esperar dado que unicamente se modifica o comprimento da cadeia alquílica.

4.7 Avaliação da atividade antioxidante

Como referido, a eficácia de um antioxidante depende, entre outros fatores, da sua localização na emulsão. Com o objetivo de correlacionar a distribuição dos antioxidantes na emulsão com a sua atividade antioxidante, foi necessário verificar qual a influência da cadeia alquílica introduzida na capacidade antiradicalar dos antioxidantes.

De modo a poder efetuar a correlação entre a eficácia antioxidante com a distribuição era necessário que apenas a distribuição do antioxidante na emulsão fosse alterada com o aumento da cadeia alquílica do antioxidante e que a capacidade antiradicalar de todos os derivados fosse a mesma. Assim, efetuou-se o teste de DPPH• de modo a verificar se a modificação molecular efetuada teria alterado a capacidade dos antioxidantes em captar radicais livres.

4.7.1 Avaliação da atividade antiradicalar – Método do DPPH•

O método de DPPH• é um método colorimétrico simples, baseado na diminuição da absorvância a 515 nm do radical DPPH• (que apresenta uma cor púrpura), devido à reação com o antioxidante.

Na figura 48 está representado um exemplo típico da variação da absorvância obtida para o desaparecimento do radical DPPH• em função do tempo, na presença de diferentes concentrações de clorogenato de metilo.

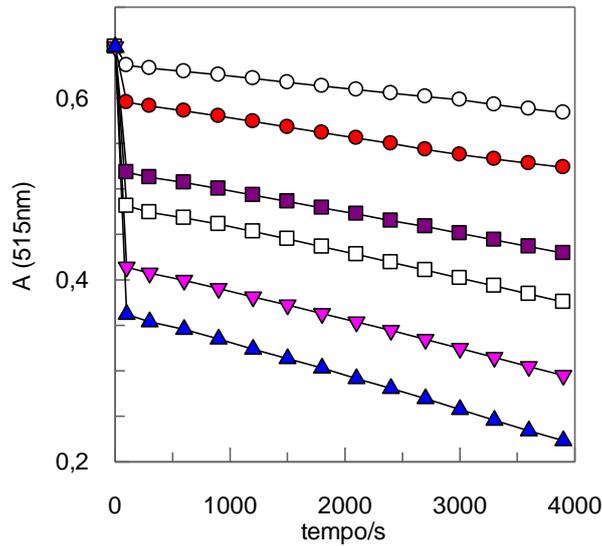


Figura 48 - Variação da absorvância do radical DPPH* ($\lambda = 515 \text{ nm}$) em função do tempo, na presença de diferentes concentrações do clorogenato de metilo -○- 0,0400 mol AO / mol DPPH*, -●- 0,0801 mol AO / mol DPPH*, -■- 0,1201 mol AO / mol DPPH*, -□- 0,1602 mol AO / mol DPPH*, -▼- 0,2002 mol AO / mol DPPH*, -▲- 0,2402 mol AO / mol DPPH*.

A atividade antiradicalar é definida pelo parâmetro EC_{50} que corresponde à concentração mínima necessária para o antioxidante captar 50 % dos radicais de DPPH* iniciais.

Para determinar esse parâmetro, representou-se graficamente, para um determinado tempo, a variação da percentagem de DPPH* com a relação mol AO/ mol DPPH* (figura 49).

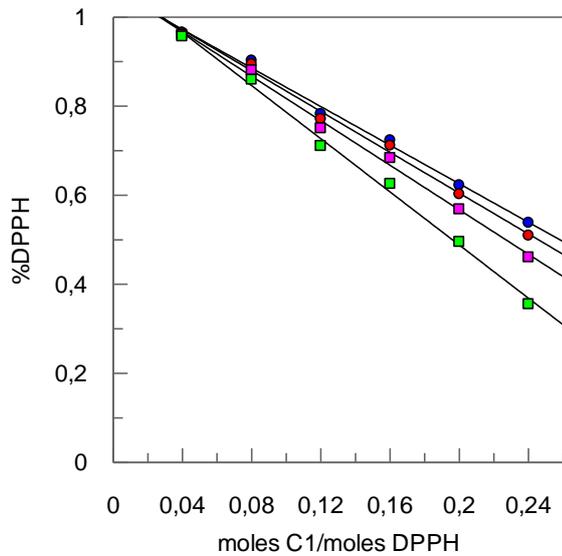


Figura 49 - Representação da variação da percentagem de DPPH* com a concentração de antioxidante (ex: clorogenato de metilo), expressa em mol AO/ mol DPPH*, para os diferentes tempos de reação, com o correspondente ajuste linear. (-●- 5 min, -●- 15 min, -■- 30 min, -■- 60 min)

Os valores de EC_{50} obtidos para o ácido clorogénico e seus derivados encontram-se na tabela 11.

Dado que os valores de EC_{50} indicam a relação mol AO/ mol DPPH• necessária para reduzir a metade a concentração inicial de DPPH•, os antioxidantes que tenham um valor de EC_{50} menor, serão aqueles que irão apresentar maior atividade antiradicalar.

Tabela 11 - Valores de EC_{50} obtidos para diferentes tempos de reação.

Antioxidante	EC_{50} (mol AO / mol DPPH•) $\pm \sigma$			
	5 min	15 min	30 min	60 min
CGA	0,247 \pm 0,004	0,241 \pm 0,004	0,240 \pm 0,004	0,242 \pm 0,005
C1	0,258 \pm 0,006	0,246 \pm 0,006	0,227 \pm 0,005	0,196 \pm 0,007
C2	0,245 \pm 0,004	0,222 \pm 0,005	0,197 \pm 0,008	0,178 \pm 0,007
C3	0,267 \pm 0,021	0,242 \pm 0,012	0,208 \pm 0,006	0,177 \pm 0,010
C4	0,254 \pm 0,011	0,240 \pm 0,010	0,220 \pm 0,007	0,186 \pm 0,002
C8	0,249 \pm 0,005	0,241 \pm 0,008	0,223 \pm 0,006	0,194 \pm 0,005
C10	0,251 \pm 0,005	0,238 \pm 0,006	0,217 \pm 0,007	0,187 \pm 0,008
C12	0,253 \pm 0,004	0,242 \pm 0,004	0,225 \pm 0,004	0,195 \pm 0,004
C16	0,238 \pm 0,012	0,224 \pm 0,014	0,202 \pm 0,015	0,165 \pm 0,016

Pela análise da tabela 11, à primeira vista, não se observam diferenças significativas entre o ácido clorogénico e seus derivados, o que sugere que a sua reatividade frente ao radical DPPH• é similar. No entanto, verificou-se que em solução metanólica e após 30 minutos de reação, ocorre uma maior diminuição do valor do parâmetro EC_{50} para os ésteres derivados do ácido clorogénico estudados, relativamente ao CGA.

Na generalidade, as curvas absorvância em função do tempo caracterizam-se inicialmente por um rápido desaparecimento da absorção do radical DPPH•, seguido de um lento desaparecimento subsequente deste radical. O abaixamento inicial é atribuído a reações de transferência do hidrogénio/eletrão do antioxidante para o radical, enquanto que a descida subsequente é normalmente atribuída a reações secundárias mais lentas de produtos de dimerização do radical fenoxilo, entre outras. Assim, todos os derivados do ácido clorogénico apresentaram este comportamento de um modo similar, mostrando a existência de um mecanismo de reação semelhante para todos os antioxidantes estudados. A semelhante reatividade dos derivados do ácido clorogénico frente aos radicais DPPH• em solução sugerem que a possível diferença na atividade antioxidante destes compostos em emulsões poderá então dever-se à provável diferença na distribuição destes pelas várias fases que as compõem.

4.7.2 Teste da estufa de Schaal

Estudou-se a atividade antioxidante do ácido clorogénico e dos seus derivados em emulsões compostas por azeite e tampão citrato (0,04 M, pH = 3,65), com 0,5 %, 1 % e 2 % de Tween 20 e contendo 0,6 mM de cada um dos antioxidantes. Para tal, submeteram-se as emulsões a um teste de aceleração oxidativa a uma temperatura de 60 °C (teste da estufa de Schaal). Estas experiências foram realizadas em triplicado.

O avanço da oxidação lipídica foi avaliado ao longo do tempo através da medição do conteúdo em dienos conjugados (DC).

Primeiramente, avaliou-se a eficácia antioxidante na inibição da oxidação lipídica submetendo ao teste de estufa de Schaal emulsões contendo os antioxidantes com uma percentagem de tween 20 de 1 %. De seguida, com o objetivo de avaliar o efeito da concentração de emulsionante na inibição da oxidação lipídica, foi realizado um segundo teste de estufa de Schaal com percentagens de tween 20 iguais a 0,5 %, 1 % e 2 %.

4.7.2.1 Avaliação da eficácia antioxidante em emulsões azeite / tampão citrato contendo 1% Tween 20

A figura 50 representa o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a alcançar o valor de 0,5 % nas emulsões, contendo 1 % de emulsionante.

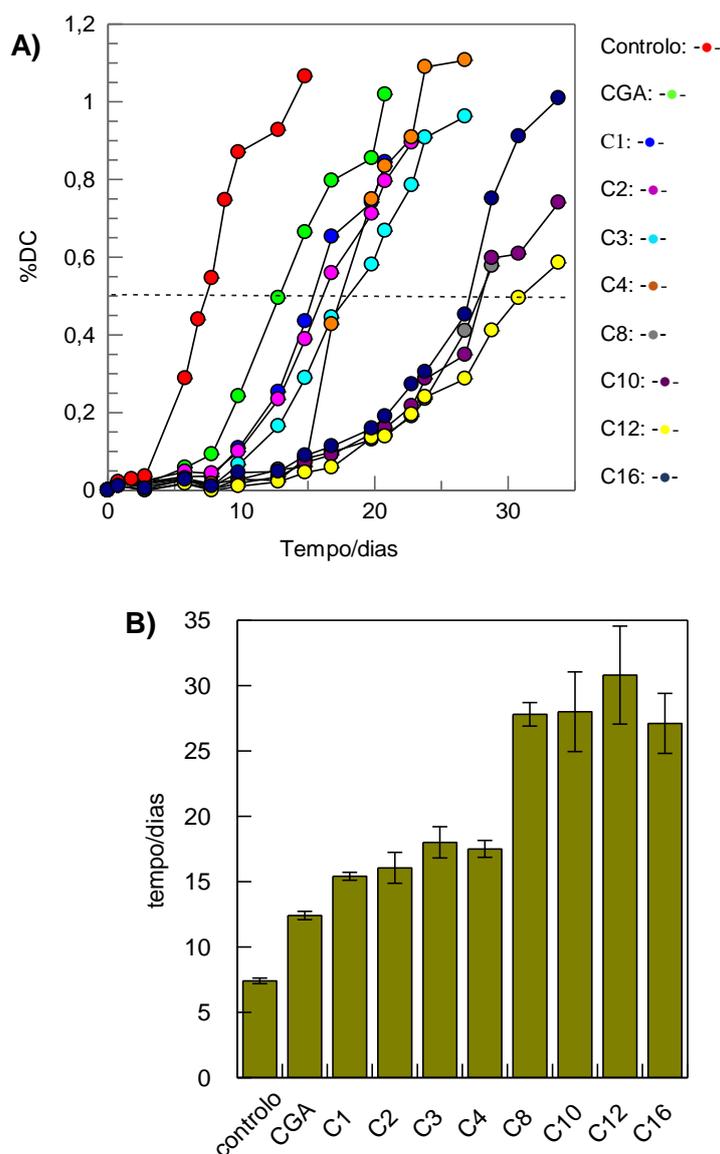


Figura 50 - A) Percentagem de dienos conjugados atingida em dias, para emulsões contendo 1% de emulsionante. B) Tempo (dias) para que as emulsões contendo 1% de emulsionante, atingissem o conteúdo em DC de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados. Condições experimentais de A) e B): emulsões 4:6 (Azeite/Tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20), [AO] = 0,6 mM no azeite, T = 60 °C.

De acordo com o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a atingir o valor de 0,5 % para a percentagem de emulsionante de 1 %, o derivado que parece apresentar uma maior eficácia é o C12. No entanto, após uma análise estatística verificou-se uma ordem de eficácia de: ácido clorogénico < clorogenato de metilo = clorogenato de etilo = clorogenato de propilo < clorogenato de octilo = clorogenato de decilo = clorogenato de dodecilo = clorogenato de hexadecilo.

Segundo a teoria do paradoxo polar, os antioxidantes mais polares seriam mais eficazes em meios menos polares e os antioxidantes menos polares seriam eficazes em sistemas emulsionados do tipo O/A. A ordem de eficácia dos antioxidantes anteriormente descrita não obedece ao paradoxo polar, isto porque o antioxidante mais hidrofóbico, o clorogenato de hexadecilo, apresenta menor eficácia que o clorogenato de dodecilo nos sistemas emulsionados utilizados. A eficácia dos antioxidantes aumenta até ao clorogenato de dodecilo, decrescendo para o clorogenato de hexadecilo.

Resultados semelhantes foram encontrados por *Laguerre et al*^[28] para uma série de ésteres derivados do ácido clorogénico, clorogenatos de metilo, butilo, octilo, dodecilo, hexadecilo, octadecilo e eicosilo, em emulsões de óleo de tungue/água. Estes autores observaram um aumento da atividade antioxidante destes ésteres derivados do ácido clorogénico, do próprio ácido clorogénico para o clorogenato de dodecilo e uma diminuição da atividade antioxidante para o clorogenato de eicosilo.

A atividade antioxidante num sistema emulsionado depende das constantes de partição e naturalmente da distribuição dos antioxidantes entre as diferentes regiões que a constituem, da estabilidade dos antioxidantes, e dos fenómenos ocorridos na interface azeite/água. Assim, a concentração de antioxidante na interface parece representar de facto um papel de extrema importância no que respeita à estabilidade oxidativa das emulsões. Verificou-se que a atividade antioxidante será tanto maior quanto maior a percentagem de antioxidante na região interfacial.

Uma vez que todos os derivados do ácido clorogénico revelam uma atividade antiradicalar frente ao radical DPPH• muito semelhante, as diferenças observadas só poderão residir no facto da diferente distribuição dos mesmos nas emulsões. Desta forma, os antioxidantes que se localizaram em maior percentagem na região interfacial, para uma mesma quantidade de emulsionante, parecem exercer uma atividade antioxidante melhor.

4.7.2.3 Estudo do efeito da concentração de emulsionante na estabilidade oxidativa

De modo a estudar o efeito da concentração de emulsionante na estabilidade das emulsões, prepararam-se emulsões com diferentes percentagens de tween 20: 0,5 %, 1 % e 2 %. Na figura 51 está representado o tempo que levou a alcançar-se uma percentagem em dienos conjugados de 0,5 % nas emulsões contendo 0,5 %, 1 % e 2 % de emulsionante, para alguns antioxidantes (CGA, C4, C8, C12 e C16).

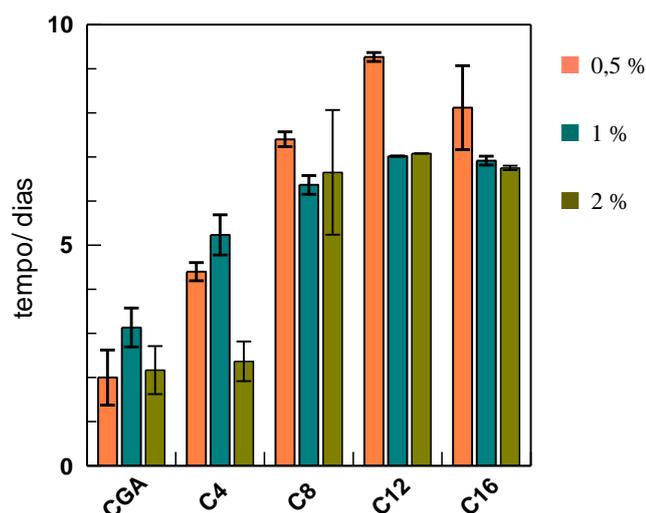


Figura 51 – Diferença observada entre o tempo (dias) para que as emulsões com antioxidante e as emulsões controle, contendo 0,5%, 1% e 2% de emulsionante, atinjam o conteúdo em DC de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão) Condições experimentais: emulsões 4:6 (Azeite/ Tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20) e [AO] = 0,6 mM no azeite, T = 60 °C.

Como é possível verificar, o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demora a alcançar um valor de 0,5 % diminuiu com o aumento da percentagem de emulsionante. Ou seja, com uma percentagem de emulsionante igual a 2 % a emulsão pode tornar-se menos estável (oxida mais rapidamente) comparativamente à emulsão que contenha 0,5 % de emulsionante.

Ao aumentar a fração de emulsionante, a percentagem de antioxidante na interface aumenta, mas aumenta também o volume da interface, pelo que a concentração de antioxidante nessa região vai ser menor. Ou seja, embora ocorra um aumento da quantidade de antioxidante na interface, com o aumento da quantidade de emulsionante ocorre igualmente uma diluição do antioxidante que se encontra na interface, que não é suficiente para contrabalançar o acréscimo de AO nessa região. Sendo assim, o resultado da atividade antioxidante dependerá assim, por um lado, do balanço entre o aumento da quantidade do antioxidante na interface, e por outro, da diluição que ocorre.

Verificou-se igualmente que à medida que aumenta a fração de emulsionante, a percentagem de antioxidante na interface para os vários antioxidantes também se vai aproximando (tabela 12), pelo que as diferenças na atividade antioxidante dos antioxidantes vai diminuindo.

Tabela 12 - Percentagem (em valor aproximado) do ácido clorogénico e dos seus derivados para as frações de emulsionante de 0,005, 0,01 e 0,02, nas três regiões da emulsão.

Antioxidante	Φ_1	%AO _I	%AO _A	%AO _O
CGA	0,005	25	75	-
	0,01	41	59	-
	0,02	58	42	-
C4	0,005	54	46	-
	0,01	70	30	-
	0,02	83	17	-
C8	0,005	59	-	41
	0,01	74	-	26
	0,02	85	-	15
C12	0,005	67	-	33
	0,01	80	-	20
	0,02	89	-	11
C16	0,005	53	-	47
	0,01	69	-	31
	0,02	82	-	18

4.8 Avaliação do grau de insaturação do azeite

Após a avaliação da capacidade antioxidante foi necessário proceder à avaliação do grau de insaturação do azeite, devido ao facto de se ter usado azeites livres de antioxidantes tratados em momentos diferentes, nos dois testes de estufa realizados, que revelaram resultados um pouco distintos, no que diz respeito ao tempo necessário para a oxidação das emulsões. Seria de esperar que as emulsões contendo 1 % de tween 20 tiveram os mesmos resultados em ambos os testes de estufa, já que as condições da experiência foram exatamente as mesmas. No entanto, as emulsões submetidas ao primeiro teste de estufa oxidaram mais rapidamente comparativamente às emulsões submetidas ao segundo teste de estufa.

Posto isto, para a avaliação do grau de insaturação do azeite foi determinado o índice de iodo para os dois azeites utilizados: o azeite usado para a determinação das constantes de partição e usado também no primeiro teste de estufa de Schaal (1 % tween 20) e o azeite usado no segundo teste de estufa de Schaal (0,5 %, 1 % e 2 % de tween 20).

Na tabela 13, encontram-se os resultados obtidos nesta determinação.

Tabela 13 - Resultados obtidos na determinação do índice de iodo.

Titulação	Branco	Azeite (1º teste)	Azeite (2º teste)
Massa da amostra (g)	-	0,43	0,45
Volume da solução de tiosulfato de sódio 0,1 M (mL)		15,27	16,97
Volume gasto na titulação do branco (mL)	43,985	-	-
Índice de iodo (g de I ₂ por 100 g de óleo)	-	84,8	76,2

Pela análise da tabela 13, verifica-se que o azeite utilizado no primeiro teste de estufa apresentou um índice maior que o azeite utilizado no 2º teste. Então, se o número de moles de iodo absorvido é proporcional ao número de insaturações contidas no azeite, o azeite do primeiro teste é aquele que apresenta ácidos gordos com maior número de duplas ligações e por isso é mais suscetível a reações de oxidação (oxidação mais rápida). Estes resultados explicam assim as diferenças observadas nos dois testes de estufa de Schaal mostrados na secção 4.7.2.

4.9 Correlação entre a distribuição dos antioxidantes na emulsão com a eficácia antioxidante

Na figura 52 está representada a correlação entre a distribuição dos antioxidantes na emulsão com a eficácia antioxidante que é medida pelo tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a alcançar 0,5 % nas emulsões contendo 1 % de emulsionante, para alguns antioxidantes (CGA, C2, C4, C8, C10, C12 e C16).

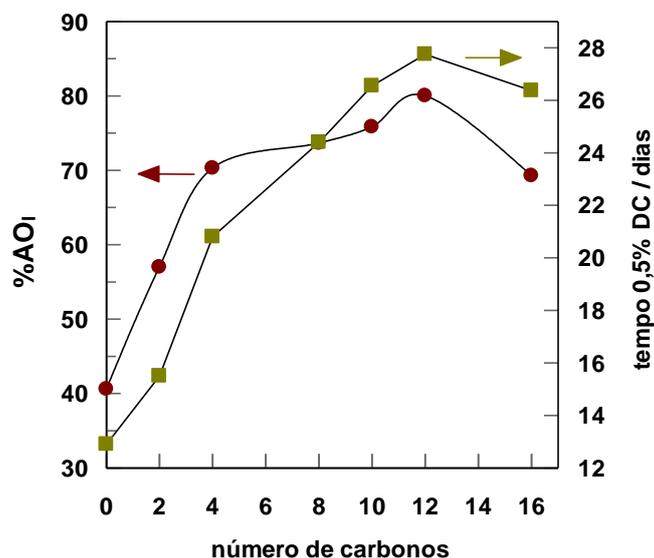


Figura 52 - Correlação da distribuição e da eficácia antioxidante com a hidrofobicidade dos AOs para $\Phi_i=0,01$.
Condições experimentais: emulsões 4:6 (Azeite / Tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 20) e [AO] = 0,6 mM no azeite, T = 60 °C.

Da correlação efetuada entre a distribuição dos antioxidantes na emulsão e a eficácia antioxidante podemos verificar que o clorogenato de dodecilo é aquele que apresenta uma melhor eficácia antioxidante devido à sua elevada percentagem presente na região interfacial da emulsão. Com base nisto, podemos afirmar que as diferenças entre as atividades antioxidantes são devidas às diferentes concentrações dos AOs na região interfacial, ou seja, são devidas em grande parte à diferente distribuição que apresentam na emulsão; é possível comparar diretamente os resultados da distribuição dos AOs na emulsão com os resultados da eficácia antioxidante mostrando assim que ocorrem variações paralelas dos parâmetros referidos, encontrando-se um máximo para o C12.

É possível também afirmar que a percentagem de antioxidante na região interfacial não se correlaciona com a hidrofobicidade dos AOs estudados, uma vez que os AOs que se encontram mais distribuídos na região interfacial não são os mais hidrofóbicos.

De notar ainda que para uma mesma concentração na região interfacial, os AOs que se distribuem também pela fase oleosa parecem ser mais eficazes. São exemplo disso os derivados C4 e C16 que apesar de se encontrarem na interface em percentagens semelhantes (tabela 9), a restante percentagem do derivado C4 se encontra distribuído pela região aquosa enquanto que a restante percentagem do derivado C16 se encontra distribuído pela região oleosa. Aparentemente, esta pequena

quantidade distribuída pela região oleosa aumenta a capacidade antioxidante dos antioxidantes.

Por fim, os resultados obtidos refletem a importância da região interfacial nos processos de oxidação lipídica, fornecendo uma explicação para o efeito “*cut-off*” observado.

5. CONCLUSÕES

Neste estudo, pretendeu-se, como referido no objetivo, contribuir para o estabelecimento de uma base científica que permita correlacionar a hidrofobicidade dos AOs com a sua distribuição e eficácia antioxidante, com a finalidade de modelar novos AOs mais eficazes. Para isso, estudou-se a distribuição do ácido clorogénico e alguns dos seus ésteres sintetizados para o efeito, através da determinação das constantes de partição do AO entre as regiões aquosa-interfacial e oleosa-interfacial de emulsões azeite/ Tween 20/ água, sem necessidade de separação de fases ou pré-tratamento. Para que isso fosse possível, utilizou-se um método cinético em que os resultados obtidos foram analisados com base no modelo da pseudofase extendido a emulsões. Para tal, aplicou-se um tratamento matemático simplificado, pois todos os antioxidantes estudados se distribuíam apenas entre duas regiões das emulsões (água/interface ou azeite/interface). Com o uso deste método também foi possível obter-se uma estimativa da constante de velocidade na região interfacial da reação, k_i , entre os antioxidantes e os iões 4-hexadecilbenzenodiazonio.

Após a análise efetuada a todos os resultados obtidos, pode concluir-se que o ácido clorogénico está distribuído maioritariamente na região interfacial e aquosa (mais de 70 % se encontra na região interfacial para $\Phi_i = 0,042$). O mesmo acontece para os clorogenatos de etilo e butilo que também se encontram distribuídos na região interfacial e aquosa, no entanto presentes em percentagens superiores ao ácido clorogénico na região interfacial (mais de 80 % destes antioxidantes se encontram na região interfacial para $\Phi_i = 0,042$). O clorogenato de octilo, decilo, dodecilo e hexadecilo encontram-se distribuídos essencialmente pelas regiões interfacial e oleosa.

Em relação aos valores de P_o^I obtidos para os ésteres do ácido clorogénico mais hidrofóbicos estudados, pode-se observar uma tendência para o aumento desse valor a partir do clorogenato de octilo, encontrando-se o seu máximo para o clorogenato de dodecilo, decrescendo para o clorogenato de hexadecilo. Pela definição de P_o^I , isto indica-nos que para valores maiores de P_o^I é esperada uma maior quantidade de antioxidante na interface.

Quanto à reatividade do ácido clorogénico e dos seus derivados na região interfacial, os valores de k_i são muito similares o que nos indica que existe uma reatividade intrínseca muito semelhante entre todos os antioxidantes.

Relativamente ao estudo da atividade antiradicalar realizada pelo método do DPPH•, podemos concluir que em solução metanólica, ao fim de 5 minutos de reação, não existem diferenças significativas na atividade antiradicalar do ácido clorogénico e dos seus derivados frente ao radical DPPH•, consequência da estrutura fenólica comum a todos eles. Contudo, o valor de EC_{50} para o ácido clorogénico mantém-se

relativamente constante ao longo do tempo de reação, ao contrário do que acontece com os seus derivados que diminuem de uma forma semelhante.

A eficácia antioxidante do ácido clorogénico e seus derivados foi avaliada pelo teste de estufa de Schaal, verificando-se que com o aumento da esterificação ocorre um aumento da capacidade antioxidante de todos os antioxidantes comparativamente ao ácido clorogénico. Contudo, este aumento da capacidade antioxidante ocorreu do C1 até ao derivado C12, tendo diminuído para o derivado com cadeia alquílica superior, C16.

Desta forma, foi possível concluir que a atividade antioxidante é superior para o composto que apresentou o maior valor de P_O^I , como esperado. Uma vez que todos os derivados do ácido clorogénico mostram uma atividade antiradicalar bastante semelhante, as diferenças observadas só podem ser explicadas pela diferente distribuição dos vários antioxidantes nas emulsões. Assim, os antioxidantes que se encontram em maior percentagem na interface, para uma mesma quantidade de emulsionante, parecem apresentar uma atividade antioxidante mais eficaz.

No que diz respeito à estabilidade das emulsões, esta diminuiu com o aumento da percentagem de emulsionante para os antioxidantes testados. Embora ocorra um aumento da quantidade do antioxidante na interface com o aumento da quantidade de emulsionante, ocorre igualmente uma diluição do antioxidante que se encontra na interface. O resultado da atividade antioxidante dependerá assim, por um lado, de um balanço entre o aumento da quantidade do antioxidante na interface e, por outro, da diluição que ocorre.

Os resultados obtidos refletem a importância da região interfacial nos processos de oxidação lipídica na medida em que a localização do antioxidante na interface parece ser o fator mais importante de que depende a atividade antioxidante de compostos com a mesma capacidade antiradicalar. Por outro lado, a percentagem de emulsionante tem uma influência decisiva na distribuição dos antioxidantes na emulsão e na concentração destes na interface e deste modo na sua atividade antioxidante. Assim, a fração de emulsionante utilizada, tem um papel, não só para a estabilidade física da emulsão, mas também para a estabilidade química da mesma.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allen, J. St. A., *Lipid Oxidation in Foods*, Food science and Nutrition., 1996, 36, p. 175-224.
2. Nawar, W. W., *Food Chemistry*, 3 ed 2007, Massachusetts.
3. Wong, D. W. S., *Química de los alimentos: Mecanismos y teoría*, 1989, p. 1-10.
4. Chorilli, M., Leonardi, G., et al., Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas, *Revista brasileira de farmácia*, 2007, 88(3), p. 113-118
5. Silva, F. A. M., *Síntese de derivados de ácidos cinâmicos: determinação da atividade antiradicalar e antioxidante*, 1998, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto: Porto.
6. Chen, B., McClements, D. J., et al., *Oxidation in Different Food Matrices: How Physical Structure Impacts Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions and Bulk Oils*, *Lipid Oxidation: Challenges in Food Systems*, A. Logan, U. Nienaber, and X.S. Pan Editors, 2013.
7. Wanasundara, P. K. J. P. D. and Shahidi, F., *Antioxidants: Science, Technology and Applications*. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. F. Shahidi Editor, 2005, NY, J. Wiley & Sons. 1: p. 434-436.
8. Coultate, T., *Food Chemistry: The chemistry of its components*, The Royal Society of Chemistry Editor, 2002, p. 92.
9. Schaich, K. M., *Challenges in Elucidating Lipid Oxidation Mechanisms: When, Where, and How Do Products Arise?*, *Lipid Oxidation: Challenges in food systems*, A. Logan, U. Nienaber, and X.S. Pan Editors, 2013, p. 11.
10. Nuchi, C. D., Hernandez, P., et al., *Ability of Lipid Hydroperoxides To Partition into Surfactant Micelles and Alter Lipid Oxidation Rates in Emulsions*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002. 50(19): p. 5445-5449.
11. Silva, L. M., *Determinação da estabilidade de óleos e de compostos com actividade anti-aterosclerótica do azeite durante o processamento de alimentos*, Departamento de Química e Bioquímica, 2008, Universidade do Porto: Porto.
12. Costa, M., *Determinação Quantitativa da Distribuição de Antioxidantes em emulsões óleo/água e Correlação com a sua Capacidade Antioxidante*, Departamento de Química e Bioquímica, 2012, Universidade do Porto: Porto.
13. Velasco, J. and Dobarganes, C., *Oxidative stability of virgin olive oil*, *Journal of Lipid Science and Technology*, 2002, 104: p. 661-676.
14. Lindon, F. and Silvestre, M. M., *Industrias Alimentares - Aditivos e Tecnologia*, ed. Escolar Editora, 2007, p. 49
15. Choe, E. and Min, D. B., *Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods*. *Comprehensive Reviews Food Science and Food Safety*, 2009, 8: p. 345-358.

16. Wanasundara, P. K. J. P. D. and Shahidi, F., Antioxidants: Science, Technology and Applications. Bailey's Industrial Oil and Fat Products, F. Shahidi Editor, 2005, NY, J. Wiley & Sons, 1: p. 438-441.
17. Barlow, S. M., Toxicological Aspects of antioxidants used as Food Additives, Food Antioxidant, 1990, London: Elsevier.
18. Wanasundara, P. K. J. P. D. and Shahidi, F., Antioxidants: Science, Technology and Applications. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. F. Shahidi Editor, 2005, NY, J. Wiley & Sons, 1: p. 441-443.
19. Wanasundara, P. K. J. P. D. and Shahidi, F., Antioxidants: Science, Technology and Applications. Bailey's Industrial Oil and Fat Products. F. Shahidi Editor, 2005 NY, J. Wiley & Sons, 1: p. 467.
20. Farah, A., Monteiro, M., et al., Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans, Journal of Nutrition, 2008, 12: p. 2309-2315.
21. Romsted, L. S. and Bravo-Díaz, C., Modeling chemical reactivity in emulsions, Current Opinion In Colloid and Interface Science, 2013, 18: p. 3-14.
22. Waraho, T., McClements, D. J., et al., Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions, Trends in Food Science and Technology, 2011, 22: p. 3-13.
23. Sánchez-Paz, V., Pastoriza-Gallego, M. J., et al., Quantitative determination of a-tocopherol distribution in a tributyrin/Brij 30/water model food emulsion, Journal of Colloid and Interface Science, 2008, 320: p. 1-8.
24. Miyashita, K. and Hosokawa, M., Substrate and Droplet Size: Important Factors for Understanding Aqueous Lipid Oxidation, in Lipid Oxidation: Challenges in Food Systems, A. Logan, U. Nienaber, and X.S. Pan Editors, 2013, p. 159.
25. Frankel, E., Huang S. W., et al., Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1994, 42, 1054-1059.
26. Costa, M., Losada-Barreiro, S., et al., A direct correlation between the antioxidant efficiencies of caffeic acid and its alkyl esters and their concentrations in the interfacial region of olive oil emulsions. The pseudophase model interpretation of the "cut-off" effect, Food Chemistry, 2015. 175: p. 233-242.
27. Laguerre, M., Giraldo, L. J. L., et al., Relationship between Hydrophobicity and Antioxidant Ability of "Phenolipids" in Emulsion: A parabolic Effect of the Chain Length of Rosmarinate Esters, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58: p. 2869-2876.
28. Laguerre, M., Bayrasy, C., et al., What Makes Good Antioxidants in Lipid-Based Systems? The Next Theories Beyond the Polar Paradox, Food Science and Nutrition, 2015, 55: p. 183-201.

29. Losada-Barreiro, S., Costa, M., et al., Distribution and antioxidant efficiency of Resveratrol in stripped corn oil emulsions, *Antioxidants*, 2014, 3: p. 212-228.
30. Jaszczuka, K., Dudzika, A., et al., Kinetics and mechanism of the reaction between 3-methylbenzenediazonium ions and catechol, *Journal of Physical Organic Chemistry*, 2016, 26: p. 586-593
31. Bravo-Díaz, C., Romsted, L., et al., To Model Chemical Reactivity in Heterogeneous Emulsions, Think Homogeneous Microemulsions, *Langmuir*, 2015, 31: p. 8961-8979.
32. Losada-Barreiro, S., Bravo-Díaz, C., et al., Maxima in antioxidant distributions and efficiencies with increasing hydrophobicity of gallic acid and its alkyl esters. The pseudophase model interpretation of the "Cut-off effect, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61: p. 6533-6543.
33. Losada-Barreiro, S., Sánchez Paz, V., et al., Temperature and emulsifier concentration effects on gallic acid distribution in a model food emulsion, *Journal of Colloid and Interface Science*, 2012, 370: p. 73-79.
34. Brand-Williams, W., Cuvelie, M. E., et al., Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, *LWT-Food Science and Technology*, 1995, 28: p. 25-30.
35. Foti, M. C., Daquino, C., et al., Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH• Radical in Alcoholic Solutions, *Journal of Organic Chemistry*, 2004, 69: p. 2309-2314.
36. Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., et al., Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical, *Talanta*, 2007, 71: p. 230-235.
37. Sharma, R. A., Yadav, A., et al., DPPH Free Radical Scavenging Activity of Phenolic Compounds in Argemone Mexicana Linn, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2013, 5: p. 683-686.
38. Antoniasse, R., "Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras", *Boletim do centro de Pesquisa e processamento de alimentos*, Curitiba, 2001, 19, 353-380.
39. Ravelli, D., Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias: correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial, 2011, Universidade de São Paulo: São Paulo, p. 41-43.
40. Silva, F. A. M., Ferreira, M. A., Métodos para a avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante, *Química Nova*, 1999, 22 (1), 94-103.

41. Giraldo, L., Laguerre, M., et al., Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium, *Enzyme and microbial technology*, 2007, 41: p. 721–726.
42. Paiva-Martins, F., Santos, V., et al., Effects of Copper on the Antioxidant Activity of Olive Polyphenols in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54: p. 3738-3743.
43. Yoshida, H., Influence of fatty acids of different unsaturation in the oxidation of purified vegetable oils during microwave irradiation, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1993, 62: p. 41-47.
44. Doyle, M. P., Bryker, W. J., Alkyl-Nitrite-Metal Halide Deamination Reactions. 6. Direct Synthesis of Arenediazonium Tetrafluoroborate Salts from Aromatic Amines, *tert-Butyl Nitrite and Boron Trifluoride Etherate in Anhydrous Media*, *Journal of Organic Chemistry*, 1979. 44(9): p. 1572-1574.