



Estudo Comparativo de Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante de Compostos Bioactivos

Mariana Oliveira de Sousa Pereira

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Professora Doutora Maria Luísa Beirão da Costa

Co-Orientador: Doutor Vítor Manuel Delgado Alves

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Luísa Duarte Martins Beirão da Costa, Professora Catedrática Aposentada do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Maria Gabriela Bernardo Gil, Professora Associada do Instituto Superior Técnico da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor Vítor Manuel Delgado Alves, Investigador Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Lisboa, 2010

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos aqueles que directa ou indirectamente me apoiaram, incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

À senhora Professora Doutora Eng.^a Maria Luísa Beirão da Costa, pela oportunidade de integrar este projecto, assim como pelo seu apoio, disponibilidade e entusiasmo ao longo de todo o trabalho.

Ao Doutor Vítor Alves, pela co-orientação deste trabalho, pela paciência e constante colaboração.

A todo o pessoal técnico do DAIAT, em especial à D. Marília, à D. Graziela, à D. Júlia e à D. Rosário por todo o apoio e boa disposição.

À Eng.^a Cláudia Duarte pela ajuda prestada durante a realização da parte experimental do trabalho.

A todos os meus colegas e amigos do ISA, em particular às “minhas” Mestres, Cláudia Henriques, Diana Fernandes, Joana Carvalho e Sandra Balbi. Obrigada pelo apoio incondicional mas principalmente por me fazerem rir.

A toda a minha família e amigos pela força e incentivo.

À Lindita por ter sempre vontade de me ajudar e dar abraços.

À Paula Franca por cuidar tão bem de mim, sem ela tudo teria sido mais difícil.

À Marta Valente, por ser mais que minha irmã.

Ao meu irmão, por ser o melhor do mundo.

E por último, muito obrigada aos meus pais, pela oportunidade que me deram, pela paciência que tiveram até agora, mas acima de tudo por sempre me terem dado amor.

RESUMO

Com este trabalho pretendeu-se testar vários métodos de avaliação da capacidade antioxidante aplicados a vários compostos bioactivos contidos em produtos da indústria alimentar .

Foi avaliada a actividade antioxidante de orégão (*Origanum virens* L.), óleo essencial de orégão resultante de hidrodestilação e extracção por *Soxhlet*, repiso de tomate liofilizado, bagaço de azeitona, sumo de amora natural e sumo de amora comercial.

O estudo foi iniciado pelo método de Rancimat aplicado ao orégão e aos seus extractos, observou-se não só a utilização de vários extractos como a sua evolução ao longo do tempo.

O método de Quencher, derivado de um método que avalia a capacidade antioxidante por captação de radicais (DPPH), apresenta como vantagem não necessitar de processo extractivo, obtendo-se por isso eventualmente resultados mais próximos da dos compostos inseridos na matriz original. Estes métodos foram aplicados a várias matrizes naturais. Foi possível concluir que método de Quencher permite uma avaliação mais rápida da actividade dos compostos, mas é influenciado pela natureza da matriz sólida.

Os resultados permitem ainda concluir que o orégão inteiro apresenta um maior poder antioxidante que qualquer dos seus extractos, e também quando comparado com o repiso de tomate e o bagaço de azeitona. Foi ainda possível verificar que o sumo de amora natural é mais rico em antioxidantes que o sumo de amora comercial.

Palavras-chave: *Origanum virens* L., extracto, actividade antioxidante, Rancimat, Quencher

ABSTRACT

The objectives of this study concern in evaluate the antioxidant capability of potentially rich matrices.

The antioxidant activity of the oregano (*Origanum virens* L.), essential oregano oil resulting from the hydro distillation and *Soxhlet* extraction, lyophilized tomato industrial waste, olive industrial waste and natural and commercial blueberry juice was evaluated.

The study was started by applying the Rancimat method to oregano and its extracts observing the use of several extracts as well as its evolution through time.

The Quencher method based on radical scavenging ability, allows the evolution of antioxidant ability on solids matrices avoiding by this way extraction procedures. , therefore obtaining results that are closer to reality. These methods were applied to various natural matrices. It was concluded that Quencher method allows a more rapid assessment of the activity of the compounds, but is influenced by the nature of the solid matrix.

From results we can conclude that whole oregano presents a greater antioxidant power than any of its extracts, tomato and olive by-products. We can also conclude that natural blueberry juice is richer in antioxidants than commercial blueberry juice.

Keywords: *Origanum virens* L., extract, antioxidant activity, Rancimat, Quencher

EXTENDED ABSTRACT

Antioxidants are one of the food additives most studied nowadays. The low obtention cost combined with easiness of use, efficiency, thermo-resistance, recognised absence of toxicity and bioactivity are the defining factors for their selection and industrial level use.

Aromatic plants, such as oregano, are widely used in the food, pharmaceutical and perfume industries. Due to their seasonal character, these kinds of natural resources demand processes that allow replacing fresh plants in a way that prolongs their availability to consumers.

The antioxidant ability is influenced by temperature, composition, structure, oxygen availability as well as the processing methodologies to which the food item is exposed, existing several factors that can change the antioxidant activity of a product. There are chemical, physical, physicochemical and sensorial methods available to study antioxidant capability of materials.

The main objective of this study concerns:

- The assessment of different antioxidant evaluation methods to be applied to different natural matrices.

The antioxidant activity of the oregano (*Origanum virens* L.), essential oregano oil resulting from the hydrodistillation and *Soxhlet* extraction, lyophilized tomato industrial waste, olive industrial waste and natural and commercial blueberry juice was evaluated.

The study was started by applying the Rancimat method to oregano and its extracts observing the use of several extracts as well as its evolution through time.

The Quencher method based on radical scavenging ability, allows the evolution of antioxidant ability on solids matrices avoiding by this way extraction procedures. , therefore obtaining results that are closer to reality.

From results we can conclude that the Quencher method allows a quicker evaluation of compounds but it's influenced by the nature of the solid matrix.

The obtained results during the study allow also concluding:

- Oregano presents antioxidant activity
- Compounds with antioxidant activity are found in the whole plant, as well as in the essential oil and organic extracts from whole and deodorized oregano.
- The study of antioxidant activity by the Rancimat method proved that whole oregano presents a greater protection factor than deodorized oregano and its bagasse (obtained by Soxhlet extraction). It was also proved that Soxhlet extraction using diethyl ether as a solvent is more effective in extracting antioxidants.
- Quenching using the DPPH radical is a fast, effective method coherent with the Rancimat results. It was verified that whole oregano presents TEAC values a much greater than its extracts and tomato and olive by-products.
- Natural blueberry juice presents greater antioxidant values than commercial juice.
- In the case of natural juice, TEAC values increased during storage time. This can be due to changes in its structure, increasing the bioavailability of antioxidants that react with the DPPH radical, therefore obtaining TEAC values above those of day produced juice.

The *Quencher* method is more expedite, due to its absence of extraction process but it's important to note that it's influenced by the nature of the solid matrix and the solvent used. An effect study of these parameters is necessary for a comparative evaluation in several matrices.

Keywords: *Origanum virens* L., extract, antioxidant activity, Rancimat, Quencher

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
EXTENDED ABSTRACT	IV
ÍNDICE GERAL	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS	1
1. ANTIOXIDANTES	2
1.1. Antioxidantes de Síntese	4
1.2. Antioxidantes Naturais	6
1.3. Vantagens e desvantagens dos antioxidantes naturais e sintéticos.....	8
2. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA	9
2.1. Métodos de Captação de Radicais	9
2.2. Índice de peróxidos	10
2.3. Outros métodos	11
3. METODOLOGIAS PARA OBTENÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS	12
3.1 Destilação	12
3.2. Extracção por solventes	14
3.3. Outros métodos de extracção.....	14
4. ALGUMAS MATRIZES COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE UTILIZADAS	15
4.1. Orégãos	15
4.2. Repiso de tomate	16
4.3. Bagaço de azeitona.....	18

4.4. Sumo de amora.....	18
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
5.1. Material	19
5.1.1 Matérias-primas com potencial antioxidante	19
5.1.2 Reagentes.....	22
5.2 Métodos	23
5.2.1. Métodos de obtenção de extractos de orégão	23
5.2.2 Avaliação do potencial antioxidante de produtos de orégão	25
5.2.3. Avaliação da actividade antioxidante de vários produtos da indústria alimentar	26
5.2.3.1. Método de Quencher usando o radical DPPH	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
6.1. Avaliação do potencial antioxidante de produtos de orégão	29
6.2. Avaliação da capacidade antioxidante pelo método de Quencher usando o radical DPPH	31
6.2.2 Aplicação de métodos de Quencher a vários tipos de matrizes	33
CONCLUSÕES	36
BIBLIOGRAFIA	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Fórmula estrutural do BHA, BHT e TBHQ.	4
Figura 2 – Fórmula estrutural dos quatro isómeros de tocoferol.	7
Figura 3 – Exemplo de mudança de cor do radical DPPH após reagir com antioxidante.	9
Figura 4 – Exemplo de um reactor de Soxhlet.	14
Figura 5 – Estrutura molecular do licopeno (C ₄₀ H ₅₆)	17
Figura 6 – Folhas de orégão inteiro.	19
Figura 7 - Repiso de tomate Liofilizado.	20
Figura 8 - Representação esquemática do aparelho de destilação por arrastamento de vapor.	23
Figura 9 – Aparelho Metrohm 679 Rancimat	25
Figura 10 – Comparação do F.P. entre o extracto de Soxhlet de orégãos inteiros, desodorizados e água resultante da hidrodestilação.	29
Figura 11 – Estudo do solvente a utilizar na extracção de Soxhlet.	30
Figura 12 – Comparação entre o extracto de Soxhlet de orégãos desodorizados ao longo do tempo.	31
Figura 13 – Comparação do TEAC entre orégãos inteiros, orégãos desodorizados e extracto de Soxhlet a várias concentrações.	32
Figura 14 – Comparação do TEAC entre repiso de tomate e bagaço de azeitona, a várias concentrações.	33
Figura 15 – Comparação do TEAC entre o sumo de amora no “dia 0” e o sumo comercial de amora e chá vermelho, a várias concentrações.	34
Figura 16 – Comparação do TEAC entre o sumo de amora no “dia 0”, no “dia 7” com e sem azoto e de “dia 21” com e sem azoto, a várias concentrações.	35

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Mecanismos de acção dos antioxidantes	2
Tabela 2 – Valor diário de referência (VDR) de alguns antioxidantes permitidos em alimentos	5
Tabela 3 – Vantagens e desvantagens dos antioxidantes	8
Tabela 4 – Classificação botânica do orégão	16
Tabela 5 – Composição química de repiso de tomate em relação à sua matéria seca.	16
Tabela 6 – Composição química dum bagaço húmido “típico”	18
Tabela 7 – Valores de carotenóides de repiso de tomate.	20
Tabela 8 - Características do óleo de girassol.	22

INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

Os antioxidantes são um dos aditivos alimentares mais estudados nos dias de hoje. O baixo custo de obtenção, facilidade de emprego, eficácia, termo-resistência, ausência reconhecida de toxicidade e bioactividade, são factores de selecção e utilização a nível industrial.

As plantas aromáticas, como é o caso dos orégãos, são muito utilizadas na indústria alimentar, farmacêutica e de perfumaria. Este tipo de fontes naturais de antioxidantes, devido ao seu carácter sazonal, exigem muitas vezes processos que permitam substituir a planta em fresco, conservando as propriedades originais durante o maior período possível para o consumidor.

A capacidade antioxidante é afectada pela estrutura e composição da matriz do alimento em que se encontra, pelas condições de processamento, nomeadamente temperatura, e disponibilidade do oxigénio. A bibliografia apresenta vários métodos químicos, físicos, físico-químicos e sensoriais para a avaliação da capacidade antioxidante dos materiais.

Neste contexto, surge como necessário identificar métodos expeditos e precisos que permitam obter respostas em tempo útil da capacidade antioxidante de vários tipos de compostos antioxidantes.

Assim os objectivos do presente trabalho dizem respeito a:

- Avaliação da capacidade antioxidante de matrizes potencialmente ricas por dois métodos distintos;
- Rancimat e método de Quencher com vista a validar a utilização deste último, que apresenta como valorização não necessitar de processo extractivo dos compostos antioxidantes;
- Testar a capacidade antioxidante de várias matrizes nomeadamente subprodutos da indústria alimentar.

1. ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que quando presentes nos alimentos a determinadas concentrações retardam ou inibem a oxidação de substratos oxidáveis. (Hallewell, 2001).

A oxidação lipídica é uma das principais causas de deterioração dos alimentos podendo ser prevenida pela adição de antioxidantes. Sendo o responsável pelo cheiro e sabor a ranço, com a conseqüente diminuição da qualidade nutricional e da segurança, devido à formação de compostos secundários potencialmente tóxicos (Chevolleau *et al*, 1992).

Os antioxidantes também desempenham um papel fundamental na defesa do organismo contra os radicais livres, substâncias altamente reactivas com oxigénio, associadas a várias doenças como problemas cardiovasculares, cancro e doenças neurodegenerativas (Kaliora e Dedoussis, 2007).

A adição de aditivos a produtos alimentares é há muitos anos causa de preocupação devido aos seus possíveis efeitos na saúde dos consumidores e por isso é realizada uma avaliação toxicológica rigorosa. Esta avaliação é realizada por organismos internacionais como o comité conjunto da OMS (*Organização Mundial da Saúde*) e FAO (*Food and Agriculture Organization*) e o Comité Científico de Alimentação Humana. A Comissão da União Europeia estabeleceu um código internacional, que é constituído pela letra E seguida de um número de três ou quatro dígitos, para os aditivos com avaliação toxicológica favorável atribuída pelo Comité, cuja utilização está regulamentada. Por exemplo, os códigos E300 e E321 que correspondem respectivamente ao ácido ascórbico (Vitamina C) e ao BHA (butil-hidroxianisol) (Faísca, 1998).

Segundo Pokorný et al (1991), os antioxidantes podem ser agrupados segundo os seus mecanismos de acção (quadro 1):

Tabela 1 - Mecanismos de acção dos antioxidantes

Tipo de Antioxidante	Mecanismo de Acção	Ex. de Antioxidantes
Antioxidante	Inactivam radicais livres lipídicos	Compostos fenólicos
Estabilizadores de	Previnem a decomposição de hidroperóxidos em	Compostos fenólicos

Hidroperóxidos	radicais livres	
Sinergistas	Promovem a actividade dos antioxidantes	Ácido cítrico, ácido ascórbico
Inactivadores metálicos	Ligam metais pesados tornando-os inactivos	Ácido fosfórico, compostos de Maillard, ácido cítrico
Desactivadores de oxigénio singuleto	Transformam oxigénio singuleto em oxigénio tripleto	Carotenóides
Substancias que reduzem hidroperóxido	Reduzem hidroperóxidos por vias não radicais	Proteínas, aminoácidos

A acção das substâncias adicionadas é condicionada por diversos factores como a composição lipídica, a concentração, a temperatura, a pressão de oxigénio e a presença de outros antioxidantes e componentes habituais dos alimentos, por exemplo, proteínas e água. As substâncias naturais inicialmente utilizadas foram rapidamente substituídas por substâncias sintéticas mais baratas, de pureza controlada e com uma capacidade antioxidante mais uniforme (Pokorný et al, 1991).

A indústria alimentar ao utilizar um determinado antioxidante deve ter em atenção determinadas propriedades para conseguir obter um produto de qualidade. Um aditivo alimentar não pode apresentar qualquer toxicidade, não deve conferir aroma, sabor, ou cor ao produto, ser efectivo em baixas concentrações, ser fácil de incorporar de forma a obter-se uma mistura homogénea, resistir a altas temperaturas e estar disponível a um preço relativamente baixo (Coppen, 1989).

Como é difícil encontrar um antioxidante que reúna todas estas características é comum recorrer-se a sinergismos. É habitual a combinação de dois ou mais aditivos de modo a conseguir reunir os benefícios de cada composto adicionado.

No entanto os antioxidantes não têm capacidade de prevenir o ranço hidrolítico ou cetónico, apenas previnem o ranço oxidativo. Não têm ainda capacidade de reverter a oxidação ou regenerar um produto já rançoso por isso é fundamental a sua incorporação num produto de qualidade o mais cedo possível. (Coppen, 1989).

1.1. Antioxidantes de Síntese

Apesar de nos últimos anos ter havido preocupação em obter substâncias naturais que possuam função e eficiência similares aos antioxidantes sintéticos, o uso destes ainda prevalece. Os antioxidantes sintéticos mais usados são os compostos fenólicos, como por exemplo o butil-hidroxianisol (BHA), o butil-hidroxitolueno (BHT), o t-butil-hidroquinona (TBHQ) e os ésteres do ácido gálico (Pokorný, 1991).

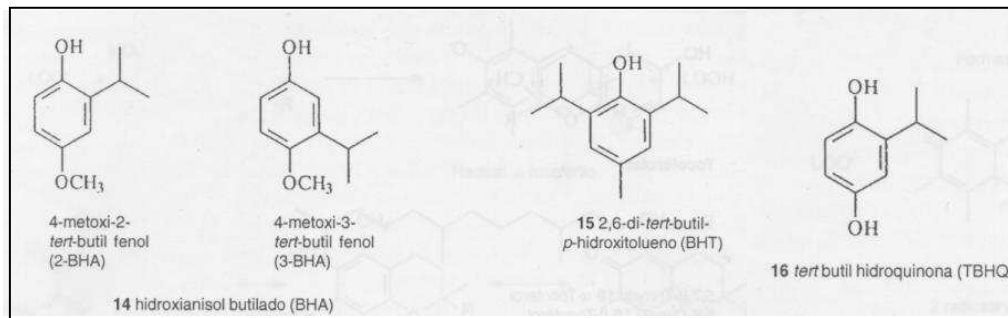


Figura 1 – Fórmula estrutural do BHA, BHT e TBHQ.

Os antioxidantes fenólicos sintéticos contêm reagem com grupos alquilo para melhorar a sua solubilidade em gorduras e óleos. De acordo com a Norma Portuguesa 2087 de 1987 a concentração total dos antioxidantes autorizados está limitada em 0,02% da massa em gordura.

O BHA é um antioxidante mais efectivo no retardamento da oxidação em gorduras animais que em óleos vegetais. Como a maior parte dos antioxidantes fenólicos, a sua eficiência é limitada em óleos insaturados de vegetais ou sementes. Apresenta pouca estabilidade em contacto com temperaturas elevadas, mas é efectivo no controlo de oxidação de ácidos gordos de cadeia curta, como por exemplo os que estão contidos em óleo de coco e de palma.

O antioxidante BHT tem propriedades similares ao BHA, porém, enquanto o BHA é um sinergista para propilgalatos, o BHT não. BHA e BHT podem conferir odor em alimentos quando aplicados em altas temperaturas em condição de fritura, por longo período.

O BHA e o BHT são sinergistas entre si. O BHA age como sequestrador de radicais peróxidos, enquanto o BHT age como sinergista, ou regenerador de radicais BHA.

O TBHQ é moderadamente solúvel em óleos e gorduras e não forma ligações com íons de cobre e ferro, com os galato. É considerado em geral mais eficaz em óleos vegetais que o BHA ou BHT. Em relação à gordura animal, é tão efectivo quanto o BHA e mais efectivo que o BHT. O TBHQ é considerado também o melhor antioxidante para óleos de fritura, pois resiste ao calor e proporciona uma excelente estabilidade para os produtos acabados. Ácido cítrico e TBHQ apresentam excelente sinergia em óleos vegetais (DeMan, 1999).

Tabela 2 – Valor diário de referência (VDR) de alguns antioxidantes permitidos em alimentos.

Antioxidante	VDR (mg/kg peso corporal)
BHA	0-0,5
BHT	0-0,125
TBHQ	0-0,2
Tocoferóis	0,15-2,0
Ácido cítrico	Não limitado
Lecitina	Não limitado
Ácido ascórbico	Não limitado

Contudo o seu uso não é permitido na Europa nem no Canadá por falta de dados toxicológicos conclusivos.

Tendo em conta os indícios de problemas inerentes ao consumo de antioxidantes sintéticos, têm sido realizados estudos no sentido de encontrar produtos naturais com actividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com intuito de diminuir a sua quantidade nos alimentos.

1.2. Antioxidantes Naturais

O uso empírico de compostos naturais é muito antigo. Desde há muito tempo que as populações utilizam métodos caseiros para preservar da rancificação, carne, pescado e outros alimentos ricos em gordura (Hernández et al 2009).

Antioxidante natural é difícil de definir, são substâncias que se apresentam ou podem ser extraídas de tecidos de plantas e de animais e aqueles que se formam durante o processamento de alimentos de origem animal ou vegetal.

Estes compostos estão presentes em praticamente todas as plantas, microrganismos e tecidos animais. Na sua maioria são compostos fenólicos, entre os quais grupos, os tocoferóis, flavonoides e ácidos fenólicos.

Por se considerar que estes não apresentam tantos riscos para o consumidor o seu estudo tem sido bastante intensivo para conseguir melhorar e estabilizar a sua incorporação em alimentos.

Os tocoferóis, a vitamina C, e os carotenóides são os mais utilizados na indústria alimentar e em produtos farmacêuticos (Porter, 1980).

Muitas plantas aromáticas e em particular os orégãos, são ricos em compostos fenólicos e por isso uma potencial fonte importante de produtos inibidores de oxidação dos lípidos. O mecanismo de acção antioxidante dos fenóis está relacionado com a facilidade de ceder um átomo de hidrogénio aos radicais lipídicos e assim quebrar as reacções de propagação durante a oxidação. O radical fenólico formado é mais estável e menos reactivo.

Os dois grupos hidroxilo na vizinhança e o grupo carbonilo na forma de éster aromático, lactona, flavanona ou flavona são factores essenciais para a actividade antioxidante.

Os flavonóides são outro tipo de compostos, que também se encontram no ramo vegetal, em frutos, vegetais, grãos, sementes, raízes, folhas, ou pólen.

Os tocoferóis estão presentes na maioria em óleos e sementes de oleaginosas, são antioxidantes de natureza fenólica, quase sempre na forma livre, podendo apresentar-se sob a forma esterificada com um ácido gordo. São bastante utilizados, uma vez que são considerados antioxidantes primários (dadores de electrões), inibindo a fase de propagação ao reagirem com os radicais livres (peróxido ou alcóxilo) com estabilização simultânea do radical tocoferilo.

Os tocoferóis apresentam-se sob a forma de quatro isómeros: α , β , γ e δ que diferem entre si no número e posição de grupos metil do anel dihidrocromanol.

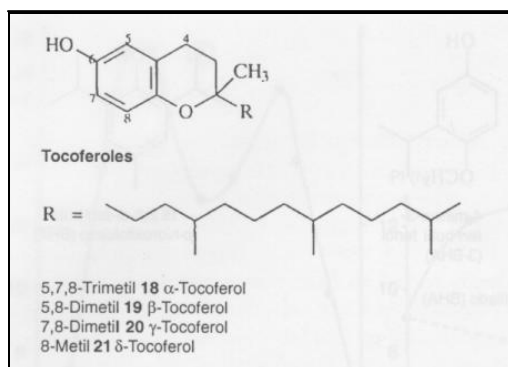


Figura 2 – Fórmula estrutural dos quatro isómeros de tocoferol.

A sua actividade antioxidante depende do alimento ao qual são adicionados, da sua concentração, de disponibilidade em oxigénio e da presença de metais pesados e de presença de outros compostos que exerçam algum tipo de sinergismo.

O δ -tocoferol é o que apresenta uma maior actividade antioxidante, seguido do γ -tocoferol, β -tocoferol e o α -tocoferol como o menos efectivo. Porém a baixas concentrações ($\leq 50 \mu\text{g g}^{-1}$) o α -tocoferol é mais efectivo que o γ -tocoferol, mas concentrações altas ($> 100 \mu\text{g g}^{-1}$) o γ -tocoferol é mais efectivo.

A actividade antioxidante dos tocoferóis tem sido estudada principalmente em gorduras que contêm pequenas quantidades de antioxidantes, uma vez que a concentrações altas se observa um efeito pró-oxidante (Porkorny et al, 1991).

Os tocoferóis são muito estáveis ao calor completamente miscíveis com óleo e gorduras e insolúveis em água.

Como interceptores de radicais livres, os antioxidantes reagem com os radicais alquilo ($\text{R}\cdot$) e alquilperóxido ($\text{ROO}\cdot$), interrompendo a cadeia de propagação e inibindo a formação de hidróperóxidos e com os radicais alcóxilo ($\text{RO}\cdot$), produzidos por decomposição dos hidroperóxidos na presença de metais diminuindo a sua decomposição e consequente formação de aldeídos (Pokorný et al, 1991).

1.3. Vantagens e desvantagens dos antioxidantes naturais e sintéticos

Embora os antioxidantes de origem natural sejam à partida mais saudáveis apresentam restrições ao seu uso.

No quadro seguinte apresentam-se vantagens e desvantagens de antioxidantes:

Tabela 3 – Vantagens e desvantagens dos antioxidantes (adaptado de Pokorný, 1991).

Antioxidantes Sintéticos	Antioxidantes Naturais
Barato	Caro
Uso amplo	Uso restringido a alguns produtos
Actividade antioxidante média a alta	Gama variada de actividade antioxidante
Aumento da preocupação relativa à segurança	Percebidas como substâncias inócuas
Restrições de uso	Incremento do seu uso e ampliação das suas aplicações
Baixa solubilidade em água	Alta solubilidade em várias substâncias
Diminuição de interesse	Aumento do interesse

2. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA

Vários métodos de actividade antioxidante foram utilizados para monitorizar e comparar a actividade antioxidante dos alimentos. Nos últimos anos, têm-se desenvolvido técnicas no sentido de preservar ao máximo o material de análise para obter respostas o mais fiável possível.

2.1. Métodos de Captação de Radicais

A captação de radicais é o principal mecanismo de acção dos antioxidantes nos alimentos. Têm-se desenvolvido vários métodos em que se mede a capacidade antioxidante através da captação de radicais-livres sintéticos em solventes orgânicos polares, por exemplo metanol, a temperatura ambiente. Os radicais utilizados são o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) e o ABTS (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-acidosulfónico)).

No método de DPPH, aplicado a extractos, mede-se a captação deste radical através da diminuição da absorvância, medida a 515nm, que acontece devido à redução de um antioxidante (AH) ou por reacção com radicais.



Figura 3 – Exemplo de mudança de cor do radical DPPH após reagir com antioxidante. (fonte: <http://www.naturalsolution.co.kr/tech21e.html>)

Alguns fenóis, por exemplo, o α -tocoferol, reagem rapidamente com o radical DPPH. Porém várias reacções secundárias lentas podem causar uma diminuição progressiva de absorvância, e por isso pode ser difícil alcançar o estado estacionário mesmo ao fim de várias horas.

Na maioria dos casos o método de DPPH é utilizado para medir a captação de radicais após 30 minutos depois de iniciada a reacção. É expresso normalmente em valor EC_{50} , ou seja, a concentração de antioxidante necessária para captar 50% dos radicais de DPPH num período de tempo determinado.

O radical catiónico ABTS é mais reactivo que o radical DPPH, logo a reacção ocorre completamente após 1 minuto. O método mais recente consiste no uso de persulfato de potássio para oxidar o ABTS ao seu radical catiónico. A actividade de captação de radicais pelo método de ABTS expressa-se em valor TEAC (capacidade antioxidante equivalente trolox, *trolox equivalent antioxidant capacity*).

Estes métodos podem ser úteis para a busca de novos antioxidantes mas não quando se pretende valorizar a utilidade de um antioxidante num alimento, já que a sua actividade neste caso depende de factores tais como a polaridade, solubilidade e a actividade quelante de metais.

Um método relativamente recente de medição directa da capacidade total de antioxidantes num alimentos é o QUENCHER (QUick, Easy, New, CHEap and Reproducible), ou seja, um método rápido, fácil, novo, barato e reproduzível, segundo Göken et al (2009).

Este novo método exclui os antigos métodos de extracção com solventes que inevitavelmente alteram a avaliação. Quencher também é um método de captação de radicais utilizando as matrizes directamente através da utilização de radicais como o DPPH e o ABTS.

2.2. Índice de peróxidos

Para avaliação de estabilidade oxidativa de óleos e gorduras é usual a realização de testes de oxidação rápida, controlando vários parâmetros. Parâmetros que permitem acelerar o processo oxidativo como: catalisadores metálicos, acção da luz, pressão de O_2 , agitação e temperatura (mais comum e eficaz) (Frankel, 1993).

Num teste de oxidação rápida, o estado de oxidação pode ser representado em função do tempo, obtendo-se uma curva com uma fase inicial relativamente estável seguida de uma fase em que existe um marcado aumento do índice de peróxidos, absorção de O_2 e formação de produtos de oxidação voláteis (Frank e tal, 1982). O tempo decorrido até ao

ponto de inflexão de curva (ponto de máxima variação de velocidade de oxidação) denomina-se por período de indução (PI).

O PI é medido como o ponto onde se dá a variação rápida do declive da curva de oxidação ou como rápida do declive da curva de oxidação ou como o tempo necessário para atingir um determinado estado de oxidação. O PI também pode ser utilizado para avaliar o efeito de protecção dos antioxidantes quando adicionados a óleos (Frankel, 1993).

O efeito de protecção ou factor de protecção (FP) é consequência de um aditivo incorporado a determinado produto e é avaliado pela razão entre o PI do produto com incorporação do aditivo e o seu PI sem qualquer aditivo (amostra de controlo). Se o $FP < 1$, este actua como pró-oxidante (Faísca, 1998).

Este método foi obtido em aparelhos do tipo Rancimat.

2.3. Outros métodos

O DSC (Differential Scanning Colorimetry, Colorimetria de Varrimento Diferencial) é um método instrumental que monitoriza a transição exotérmica e endotérmica devido às mudanças de fase ou às reacções químicas produzidas numa amostra.

O final do período de indução vem marcado por um incremento do calor de reacção devido a uma reacção mais rápida dos lípidos insaturados com o oxigénio.

Porém, esta medida tem uma escassa reprodutividade a menos que se realize a temperaturas abaixo de 155° C, o qual reduz a utilidade do método como medida da actividade antioxidante.

O método ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) mede a capacidade antioxidante em amostras biológicas in vitro. O teste mede a degradação oxidativa da molécula fluorescente após ser misturado com radicais livres, tais como compostos azo-iniciador. Azo-iniciadores são utilizados para produzir o radical peróxil por aquecimento, o que degrada a molécula fluorescente, resultando na perda de fluorescência. Os antioxidantes são capazes de proteger a molécula fluorescente da degeneração oxidativa. O grau de protecção vai ser quantificados utilizando um fluorímetro.

FRAP (ferric reducing ability of plasma) é outro dos métodos utilizados para avaliação da capacidade antioxidante. É um método simples, automatizado de medição da capacidade de redução férrica plasmática. É utilizado ião ferro com baixo pH o que causa a formação de um complexo de cor ferrosa. Os valores de FRAP são obtidos através da comparação da alteração da absorvância a 593nm em misturas que estão em teste com os iões conteúdo ferro em concentração conhecida. É um método barato, os reagentes são simples de preparar, são obtidos resultados altamente reprodutíveis e o procedimento é simples e rápido.

3. METODOLOGIAS PARA OBTENÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS

A extracção de compostos naturais a partir de material vegetal é muitas vezes efectuada através de solventes orgânicos. O grande problema deste tipo de extracção é a toxicidade de alguns dos solventes utilizados, que inviabiliza a sua utilização no domínio alimentar.

O consumidor actual está cada vez mais alertado para os perigos de contaminação dos alimentos e as leis que restringem a utilização de solventes orgânicos na indústria alimentar são cada vez mais apertados.

3.1 Destilação

A destilação é das operações unitárias mais antigas e das mais utilizadas na indústria alimentar e química.

É utilizada para extrair aromas de origem vegetal obtendo-se óleo essencial como produto final. Além de ser um método de baixos custos, é fácil, versátil e permite obter extractos aromáticos de boa qualidade.

O princípio deste método é bastante simples, ocorre uma transferência de calor e de massa, da fase líquida para a fase de vapor e da fase líquida por condensação. A principal técnica utilizada é por arrastamento de vapor de água, devido à sua boa penetração nos tecidos vegetais devido à sua baixa viscosidade (Heath, 1981). Por outro lado o vapor de água não

põe em causa problemas de toxicidade como outros solventes utilizados noutras metodologias de extracção.

Existem duas metodologias utilizando água como solvente: destilação do material imerso em água e destilação por arrastamento de vapor.

3.1.1. Hidro-destilação

Pode ser efectuada por arrastamento de vapor ou por material imerso em água.

Para a hidro-destilação por arrastamento de vapor é necessário fornecimento de calor para que o vapor de água seja arrastado pelo vaso onde se encontra o material a extractar e seja obrigado a passar num condensador. O vapor de água ao atravessar a amostra arrasta consigo os compostos voláteis e hidrossolúveis que são posteriormente condensados e decantados. Além do óleo essencial é obtida uma fase aquosa.

A principal diferença deste tipo de destilação é a imersão do material vegetal em água num balão a que se fornece calor ligado a um aparelho de Clevenger modificado, em caso de laboratório.

Como neste método há contacto directo entre a amostra e a água, apresenta mais inconvenientes, como alguma modificação do aroma original, degradação térmica dos compostos mais sensíveis ao calor, extractos com cheiro a “cozido” e alteração de cor e não pode ser utilizado em materiais ricos em amido por formarem aglomerados compactos (Moldão-Martins, 1995).

3.2. Extração por solventes

A nível laboratorial este método é normalmente praticado em aparelhos tipo Soxhlet.

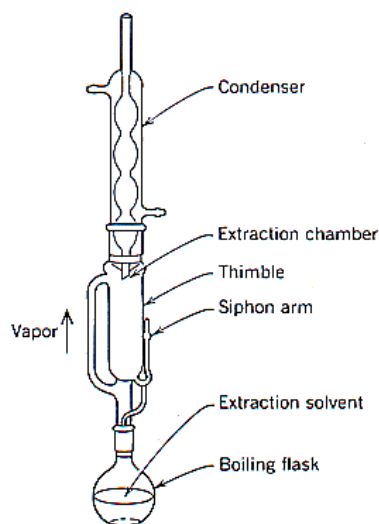


Figura 4 – Exemplo de um reactor de Soxhlet

Para obter extractos de compostos aromáticos o menos alterados possível a escolha do solvente é muito importante. Há que ter em atenção o seu ponto de ebulição, para que a temperatura de refluxo não danifique a amostra e para que a operação se faça continuamente e não seja necessário grande quantidade de solvente. Outro aspecto muito importante é a sua polaridade uma vez que o objectivo é extrair lipídios existentes na matriz e estes são apolares é necessário escolher um solvente também apolar (como álcoois) para existir uma interacção entre eles.

3.3. Outros métodos de extração

Para além de destilação utilizando água como solvente existem ainda duas categorias: arrastamento por gás inerte, seguido de concentração e extração com fluidos supercríticos.

A extração por arrastamento com gás inerte consiste normalmente no arrastamento por uma corrente de N₂, conduzindo à produção de um extracto rico apenas em compostos

mais voláteis e mais termossensíveis. Não sendo por isso viável para extrair compostos com actividade antioxidante.

Na extracção por fluidos supercríticos é realizada uma extracção por solventes em que este se encontra em condições de pressão e temperaturas acima dos seus valores críticos. O extractante mais utilizado é o CO₂ no estado supercrítico por reunir um conjunto de vantagens, nomeadamente, condições de pressão e temperatura facilmente atingíveis, baixo custo e ausência de toxicidade.

4. ALGUMAS MATRIZES COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE UTILIZADAS

De entre as potenciais fontes de antioxidantes naturais seleccionaram-se no presente trabalho algumas que a seguir se descrevem com mais pormenor.

Neste trabalho o orégão foi a matriz mais estudada mas para fins comparativos foram analisadas outras amostras vegetais com possível actividade antioxidante. Foram analisadas amostras de repiso de tomate, bagaço de azeitona, sumo de amora preta e sumo de amora comercial.

4.1. Orégãos

Os orégãos são das plantas aromáticas mais utilizadas não só como condimento mas também em fitoterapia e em na produção de medicamentos. Possuem propriedades antitússicas, antibacterianas, antifúngicas e pode ser administrado para situações de perda de apetite, dispepsia, flatulência, cólicas e afecções broncopulmonares.

É produzido em larga escala nos EUA, México, Turquia, Grécia, Israel e Marrocos (Gardé, 1971).

O orégão é uma planta originária da região mediterrânica e Próximo Oriente. É uma espécie vivaz, que forma um tufo ramificado de 50 a 60 cm. Apresenta folhas pequenas dispostas em espiga. Podem ser utilizadas as folhas frescas ou secas, o que permite uma ampla utilização uma vez que é uma planta sazonal.

Classificação botânica do orégão é apresentada no seguinte quadro:

Tabela 4 – Classificação botânica do orégão (Gardé, 1971)

Família	<i>Lamiacea</i>
Subfamília	<i>Nepetoideae</i>
Tribo	<i>Mentheae</i>
Género	<i>Origanum</i>
Secção	<i>Origanum</i>
Espécie	<i>Origanum vulgare</i> L.

Os orégãos são ricos em flavonoides, tocoferóis e derivados de ácidos fenólicos. O óleo essencial é rico em compostos fenólicos, como o timol e o carvacrol, o seu efeito antioxidante deve-se à presença destes compostos.

O timol e o carvacrol diferem no seu mecanismo de inibição à temperatura ambiente, o qual é dependente do carácter lipídico da matriz. O timol apresenta melhores propriedades antioxidantes em triacilgliceróis de óleo de girassol que em triacilgliceróis de gordura de porco.

4.2. Repiso de tomate

O repiso de tomate é constituído essencialmente por películas, sementes e material celuloso podendo conter também uma percentagem mínima de polpa de tomate.

Tabela 5 – Composição química de repiso de tomate em relação à sua matéria seca. (Del Valle et al (2006))

Composição química	Valores (%)
Fibra	59,03
Açúcares totais	25,73

Proteínas	19,27
Pectinas	7,55
Gordura total	5,85
Minerais	3,92

Actualmente este subproduto da indústria de concentrado de tomate é escoado para ração animal ou na forma de fertilizantes devido ao seu elevado valor proteico (Campos et al, 2007).

Contudo o facto de ter na sua composição uma percentagem considerável de película de tomate faz do repiso uma importante fonte de licopeno e por isso cada vez mais valorizado para futuras utilizações na industria alimentar e farmacêutica.

O licopeno é um poderoso antioxidante, representando aproximadamente 80-90% do total de carotenóides presentes no tomate (Graziani, 2003).

O papel do licopeno na prevenção de diversas doenças tem sido alvo de inúmeros estudos que comprovam o seu efeito benéfico para a saúde humana, devido ao seu poder antioxidante e capacidade de interacção com radicais livres (Shi et al., 2002). A sua ingestão está relacionada com a redução de incidência de alguns cancros e com a prevenção de acidentes cardiovasculares. (Camões et al., 2008).

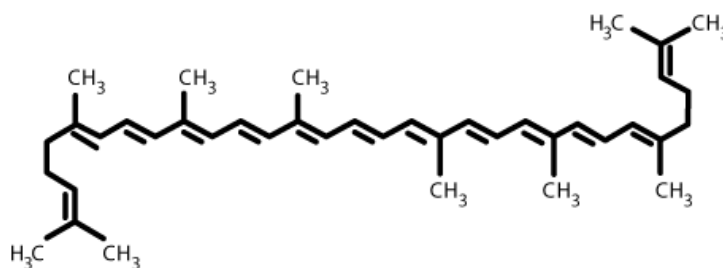


Figura 5 – Estrutura molecular do licopeno (C₄₀H₅₆)

4.3. Bagaço de azeitona

O bagaço de azeitona é um subproduto dos lagares de azeite. Apresentando em média 55-65% de fracção de polpa, é rico em polifenóis e tocoferóis, compostos com actividade antioxidante.

Tabela 6 – Composição química dum bagaço húmido “típico” (adaptado de Centre d`Initiatives pour la Production Propre, 2000).

Composição química	Valores (%)
Gordura	3 – 4
Proteína	56
Açúcares	13 – 14
Fibra bruta	14 – 15
Cinzas	2 – 3
Ácidos orgânicos	0,5 - 1,0
Polialcoois	0,5 - 1,0
Glucosidos e polifenóis	0,5
Humidade	65

O teor de humidade dos bagaços é um factor de importância fundamental para a conservação destes e para a qualidade dos óleos extractados.

A quantidade de água diminui cerca de 15 a 20% ao fim de alguns dias de exposição ao ar, enquanto que a acidez do óleo presente aumenta com resultado de hidrólise dos triacilgliceróis (Bravo, 1990).

É utilizado para alimentação animal ou como potencial energético.

4.4. Sumo de amora

A actividade antioxidante da amora preta deve-se à presença de flavonóides, designadamente as antocianinas. As antocianinas são pigmentos que conferem um tom vermelho, roxo ou azul a diversos frutos, na amora preta a antocianina presente em maior quantidade é a cianidina. Este fruto pode conter entre 1165,9 a 1528 mg eq. de cinidina-3-

glucosido por kg peso fresco. Os ácidos fenólicos presentes na amora também contribuem para a sua capacidade antioxidante e são ácidos hidroxicinâmicos: ácido coumárico, ácido cafeíco e ácido ferúlico (Maguer *et al*, 2002).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Material

5.1.1 Matérias-primas com potencial antioxidante

Orégãos Inteiros

O material utilizado foi constituído por folhas e inflorescências de *Origanum virens* L. originária da região alentejana (figura 6). O orégão foi colhido no início da floração, foi seco e posteriormente conservado em sacos de polietileno, ao abrigo da luz, e mantidos à temperatura ambiente. A secagem das folhas previne o crescimento de microrganismos.

Possui um teor de humidade de 10% (m/m) aproximadamente.



Figura 6 – Folhas de orégão inteiro

Orégãos desodorizados

Procedeu-se à desodorização por destilação das folhas da planta por arrastamento de vapor sendo em seguida o material extractado seco em estufa a 30° C.

Repiso de tomate

O repiso de tomate utilizado foi fornecido pela *FIT* (Fomento de Indústria do Tomate, Lda) e recolhido na campanha de 2009.

O repiso foi liofilizado tendo no final uma humidade residual de cerca de 5,4 %. Na tabela 7 apresenta-se a composição em carotenóides deste material.

Tabela 7 – Valores de carotenóides de repiso de tomate.

Caroteinóides (mg/100 g Repiso (bs))		
Licopeno	α -Caroteno	β -Caroteno
32,38	4,52	1,62



Figura 7 – Repiso de tomate liofilizado

Bagaço de Azeitona

O bagaço de azeitona foi cedido por um lagar de Moura, da campanha de 2008 resultado de um processo de extracção de azeite de três fases.

Amora

As amoras foram adquiridas numa superfície comercial, comprimidas em papel de filtro a fim de obter o sumo de amora sem caroços nem películas e o sumo foi separado para dois frascos. A um dos frascos foi retirado todo o oxigénio e substituído por azoto (gás inerte). Nesse mesmo dia procedeu-se à análise da capacidade antioxidante .

Os frascos foram armazenados no escuro a uma temperatura de 4°C.

Sumo comercial de amora e chá vermelho

Sumo de amora e chá vermelho da marca *Compal*

5.1.2 Reagentes

Óleo de girassol

Utilizou-se óleo de girassol da marca *Auchan*. As características médias e respectivos limites do óleo encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 - Características do óleo de girassol (Rosa, 1992).

Características	Óleo de girassol
Cromáticas:	
c.d.o. dominante	568-580 nm
Transparência (min)	88%
Ácido Gordos:	
Ácido palmítico	7-13%
Ácido esteárico	2-6%
Ácido oleico	19-35%
Ácido linoleico	40-62%
Ácido linolénico	4-14%
Acidez	0,3%
Índice de peróxidos	10 meq O ₂ /Kg

Acetona [CH₃(CO)CH₃] (*Panreac*)

Hexano [CH₃(CH₂)₄CH₃] (*Panreac*)

Metanol [CH₃OH] (*Panreac*)

Éter dietílico [C₂H₅OC₂H₅] (*Panreac*)

DPPH [1,1-difenil-2-picrilhidrazila] (*Aldrich*)

TROLOX [6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico] (*Sigma*)

5.2 Métodos

5.2.1. Métodos de obtenção de extractos de orégão

Obtenção de orégão desodorizado

A desodorização do orégão foi efectuada através de destilação por arrastamento de vapor.

Utilizou-se o equipamento apresentado (fig.8)

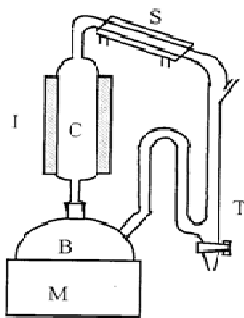


Figura 8 - Representação esquemática do aparelho de destilação por arrastamento de vapor. B – balão gerador de vapor; C – coluna de vidro; I – material isolante; M – manta de aquecimento; S – condensador; T - Tubo de recolha.

É inserido na coluna (C) cerca de 150g de orégão inteiro e no balão (B) 500mL de água. Ao ser gerado calor pela manta de aquecimento (M) vai-se formar vapor que é movido pela coluna contendo os orégãos, o vapor vai arrastar consigo compostos voláteis que posteriormente são condensados em (S) e recolhidos no tubo (T). O processo é realizado a 100° C durante 50min.

No final da extracção obtêm-se no tubo (T):

- Óleo essencial de orégão (cerca de 7ml)
- Extracto aquoso

E na coluna (C):

- Orégão desodorizado

O rendimento total de extracção foi calculado pela seguinte expressão:

$$RT = (\text{óleo essencial} / \text{massa de orégão seco}) * 100$$

O óleo essencial e o extracto aquoso foram armazenados a cerca de 4°C, ao abrigo da luz. O orégão desodorizado foi colocado numa estufa para retirar toda a água excedente e guardado em sacos de polietileno devidamente selados e ao abrigo da luz.

Tratamento do extracto aquoso

O extracto aquoso foi arrefecido à temperatura ambiente e filtrado. Acidificou-se a solução através de uma solução de HCl a 25% para passar de um pH inicial de 4 para um pH ideal de 2. Uma vez que há precipitação de ceras após a acidificação a solução é filtrada por gravidade através de papel de filtro.

Os extractos foram seguidamente obtidos por extracção líquido-líquido. Foi utilizado um agitador orbital e éter diisopropílico como solvente, com uma proporção de 1:3, ou seja, colocou-se na ampola 300 ml de solução e 90ml de solvente, agitando durante 15 min a uma velocidade de 260-320r.p.m. (U/min).

A fase aquosa formada é recuperada e é submetida a uma nova extracção, repetindo todo o processo anterior.

As duas fases orgânicas foram recolhidas e foi adicionado sulfato de magnésio de modo a eliminar a água remanescente, as fases aquosas foram rejeitadas.

A fase orgânica obtida, cerca de 400 ml, foi filtrada por papel de filtro, o solvente foi retirado por evaporação num evaporador rotativo a cerca de 30°C, sendo ainda atravessado por uma corrente de azoto para eliminar eventuais resíduos de solvente.

O produto resultante foi posteriormente analisado em Rancimat a fim de determinar a sua actividade antioxidante.

Extracção com solventes - Soxhlet

A extracção por solventes orgânicos é realizada normalmente em aparelhos tipo Soxhlet.

Para extracções de compostos aromáticos realizadas por solventes de baixo ponto de ebulição (40-90°C) o solvente é escolhido de acordo com a sua polaridade. Os solventes utilizados foram: acetona, hexano, éter dietílico e metanol. Em cada “batch” de extracção foram processados 5g de orégão durante 3h.

5.2.2 Avaliação do potencial antioxidante de produtos de orégão

Avaliação do Factor de Protecção de Produtos de Orégão pelo método Rancimat

A inibição da oxidação lipídica utilizando o aparelho Rancimat requer equipamento simples e pode ser utilizado como um método para determinar a actividade antioxidante, através de substratos como óleos comestíveis.

Foi utilizado o modelo Metrohm 679 Rancimat (fig.9), este permite a análise de 6 amostras em simultâneo.



Figura 7 – Aparelho Metrohm 679 Rancimat

A amostra a estudar é exposta a uma corrente de ar purificado com o caudal de 20 L/h, a uma temperatura de 120° C. Vão sendo obtidas curvas de oxidação que permitem a determinação periódica do índice de peróxidos. Estas curvas compreendem uma fase de

indução, onde não se forma praticamente nenhum dos produtos secundários da oxidação, e uma fase de oxidação, durante a qual há uma grande elevação no índice de peróxido e detecção de produtos voláteis. A adição de um antioxidante resulta na inibição da oxidação.

Para avaliar a capacidade protectora das amostras de orégão utilizou-se o aparelho Rancimat 679, marca Metrohm, onde foi medido o período de indução da oxidação lipídica da gordura vegetal hidrogenada contendo o extracto de orégão obtido por vários solventes. Foram colocados em 6 tubos do Rancimat 2mg de extracto e 3g de óleo vegetal e nos restantes 2 tubos apenas óleo vegetal sem qualquer antioxidante (como ensaio em branco). O ensaio termina, automaticamente, quando é atingida uma condutância de 200 μ S em todos os canais, obtendo-se na final uma curva de condutividade em relação ao período de indução (P.I.), ou seja, à sua resistência à oxidação. O P.I. corresponde a resultados finais expressos em horas e que se referem ao momento em que a curva de condutividade sofreu inflexão. A partir destes valores é possível obter o factor de protecção (F.P.)

$$F.P.= P.I. (\text{óleo} + \text{extracto}) / P.I. (\text{óleo})$$

Onde:

P.I. (óleo + extracto), corresponde ao ponto de inflexão da mistura extracto de orégão mais óleo vegetal

P.I. (óleo), corresponde ao ponto de inflexão do óleo vegetal sem adição de qualquer antioxidante, amostra de controlo.

5.2.3. Avaliação da actividade antioxidante de vários produtos da indústria alimentar

5.2.3.1. Método de Quencher usando o radical DPPH

Esta técnica de avaliação da actividade antioxidante permite analisar matrizes originais, sem que estas tenham de sofrer um processo de extracção, o que permite a obtenção de resultados mais rápidos e aproximados da realidade. É utilizado um radical (DPPH) de cor roxo, que ao ser colocado em contacto com a amostra a analisar é consumido de acordo com o poder antioxidante dessa amostra.

O radical DPPH é previamente preparado. Para uma concentração de 60µM são dissolvidos 2,4 mg de radical em 100mL de metanol, num balão volumétrico. É homogeneizado e guardado a 4°C durante 24h.

No dia seguinte são preparadas as amostras. A matriz a analisar é analiticamente pesada para 2 frascos de cor âmbar. Num dos frascos é adicionado 6mL de DPPH a 60µM e no outro é adicionado 6mL de metanol puro (a fim de verificar a interação daquela amostra no metanol e assim termos comparação com a mistura anterior).

No caso de se verificar necessidade de diminuir a concentração de radicais antioxidantes presentes em matrizes sólidas, procedeu-se a uma diluição desta utilizando um material inerte (amido de arroz).

Para todas as concentrações de matriz estudadas este processo foi feito em triplicado para resultados mais fiáveis.

As misturas ficam em agitação durante 1h e em seguida são avaliadas por espectrofotometria (realizada a 515 nm).

Além da mistura “matriz mais radical” e “matriz mais metanol” é ainda realizada uma leitura apenas com radical como ensaio em branco.

Da leitura por espectrofotometria são obtidas 3 absorvâncias diferentes para cada quantidade de matriz:

- “matriz + radical”;

- “matriz + metanol”;

- “radical DPPH”.

Com estes três valores de absorvância é possível determinar o RSA (radical scavenging activity), em %. Primeiramente é calculado o Δ Abs.:

- Δ Abs = “matriz + radical” / “matriz + metanol”

- RSA = (“radical” - Δ Abs) / “radical” * 100

Assim, quanto maior poder antioxidante a amostra tiver, mais radical vai ser consumido e por isso menos absorvância terá a amostra.

É realizado em simultâneo uma curva de calibração feita com um antioxidante de referência, Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico), a 2mM onde é dissolvido em 50mL de metanol 25mg de Trolox. É homogeneizado e utilizado logo de seguida. Para obter a recta de calibração são preparadas várias amostras de Trolox a diferentes concentrações (25 µL, 50 µL, 100 µL, 150 µL, 300 µL, 400 µL e 600 µL), que após 1h são lidas no espectrofotómetro a 515nm. Assim é possível determinar a recta de calibração Trolox e a sua respectiva equação, obtida da forma:

$$y = m x + b$$

De seguida é calculado nM Trolox:

$$\text{nM Trolox} = (\text{RSA} (\%) - b) / m$$

Os resultados são expressos em TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) que é definido como a concentração do antioxidante que fornece a mesma percentagem de inibição do Trolox (RE e tal, 1999).

Concluindo o TEAC é calculado por:

$$\text{TEAC} (\text{ nM Trolox} / \text{ g ou } \mu\text{L amostra}) = \text{nM Trolox} / \text{ g ou } \mu\text{L (amostra)}$$

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Avaliação do potencial antioxidante de produtos de orégão

A parte experimental deste trabalho iniciou-se pela avaliação, em Rancimat, de extractos obtidos por extracção sólido/líquido em Soxhlet de: orégão inteiro, orégão desodorizado e extracto aquoso resultante da hidrodestilação.

No estudo prévio foi utilizado metanol como solvente e os resultados obtidos são apresentados na fig.10.

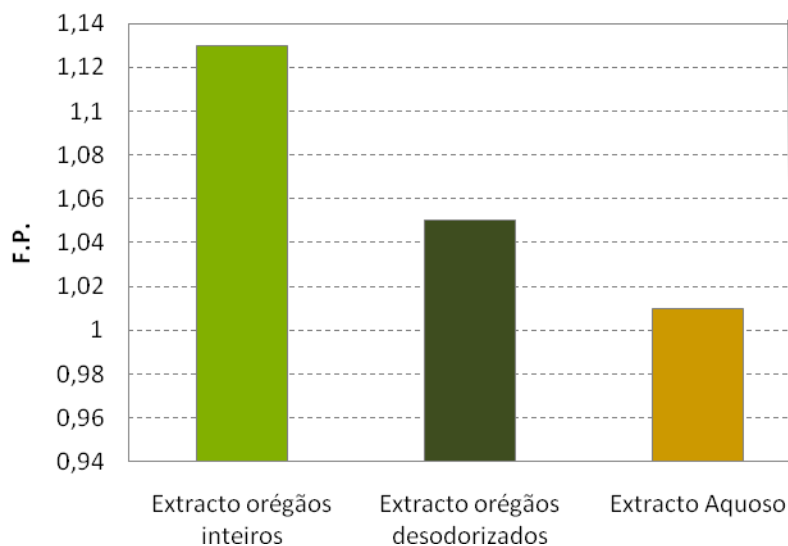


Figura 8 – Comparação do F.P. entre o extracto de Soxlet de orégãos inteiros, desodorizados e extracto aquoso, utilizando o metanol.

Pode concluir-se que os extractos de orégãos inteiros apresentam um maior factor de protecção logo, um maior poder antioxidante que os extractos obtidos do bagaço desodorizado e da água de destilação. Portanto a operação unitária de hidrodestilação reduz o poder antioxidante da planta. Ainda assim tanto os orégãos desodorizados como o extracto aquoso da hidrodestilação ainda apresentam actividade antioxidante pois o seu F.P. é superior a 1.

Devido à elevada toxicidade do metanol, este tem de ser evitado na indústria alimentar e por isso testaram-se outros solventes na extracção por Soxhlet, sendo os resultados apresentados na fig. 11.

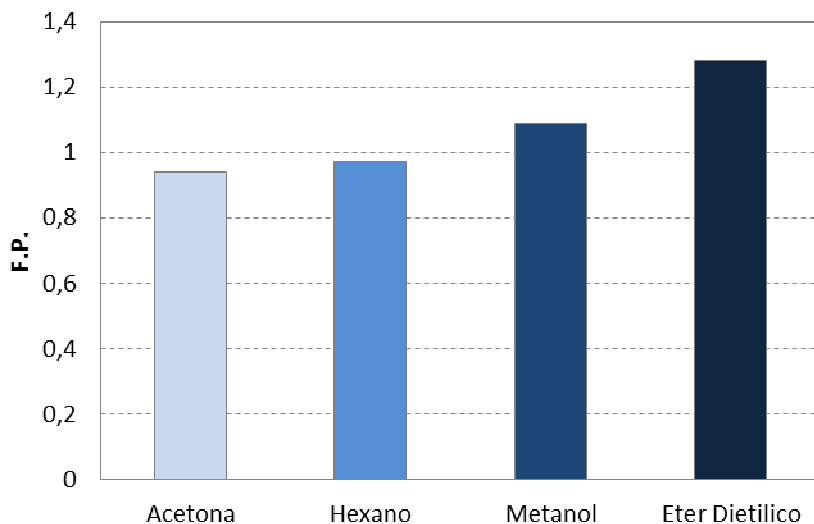


Figura 9 – Estudo do solvente a utilizar na extracção de Soxhle, de extracto de oregão desodorizado.

Contrariamente ao que ocorreu com os extractos metanólicos os extractos obtidos com acetona e hexano apresentaram um F.P. inferior a 1, indicando assim não uma actividade antioxidante mas uma extracção de componentes com actividade pró-oxidante.

Além disso, apesar do metanol extrair da matriz, componentes com actividade antioxidante o éter dietílico provou conseguir recuperar compostos apresentando um F.P. mais elevado, sendo por isso o solvente escolhido para a continuação do trabalho.

Seguiu-se uma avaliação do valor de F.P. ao longo do tempo com a mesma amostra. Foi preparado um extracto sólido/líquido em Soxhlet a partir de orégãos desodorizado, o espaço de cabeça foi preenchido com azoto líquido e a amostra foi armazenada ao abrigo da luz.

Foi analisada ao longo de 4 semanas, seguindo-se sempre a mesma metodologia. Os resultados são apresentados fig. 12.

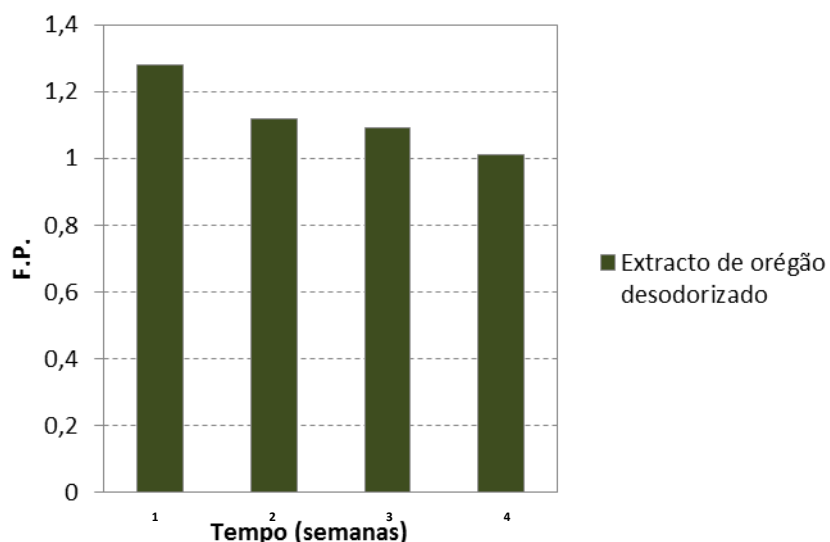


Figura 10 – Comparação entre o extracto de Soxhlet de orégãos desodorizados ao longo do tempo.

Verificou-se que ao longo desses 28 dias o extracto que inicialmente, apresentava um F.P. de 1,3, foi perdendo actividade antioxidante até um F.P. de valor igual 1. Assim pode concluir-se que o extracto perde actividade antioxidante ao longo do tempo podendo mesmo vir a apresentar actividade pró-oxidante.

6.2. Avaliação da capacidade antioxidante pelo método de Quencher usando o radical DPPH

O método de Quencher foi testado neste trabalho em várias matrizes: orégão inteiro, orégão desodorizado, repiso de tomate liofilizado, bagaço de azeitona, amora e sumo de amora comercial.

Numa primeira fase analisaram-se todos os materiais resultantes da planta aromática como indicado na fig 13.

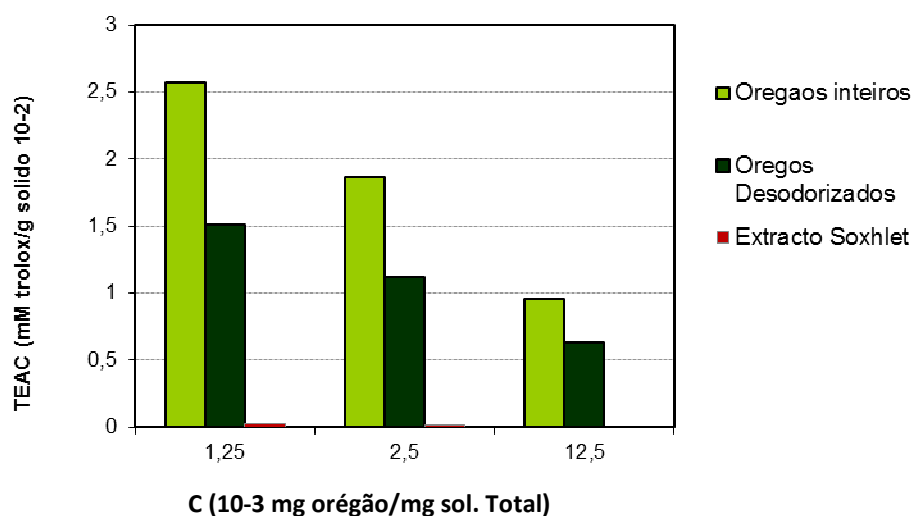


Figura 13 – Comparação do TEAC entre orégãos inteiros, orégãos desodorizados e extracto de Soxhlet a várias concentrações.

Observou-se que nestas condições reaccionais os orégãos inteiros apresentaram um maior valor de TEAC relativamente a qualquer extracto do mesmo, logo, em princípio, os orégãos inteiros terão um maior poder antioxidante. Verificando-se ainda existir coerência entre os resultados deste método e o realizado anteriormente em Rancimat. O poder do extracto resultante de Soxhlet é praticamente nulo.

É ainda possível observar um decréscimo no TEAC com o aumento de concentração de orégão na solução sólida. Este facto deve-se possivelmente a limitações reaccionais devido à menor difusão, uma vez que há um aumento de massa de amostra para o mesmo volume reaccional de radical.

Como este método é aplicável directamente à matriz, sem esta ter de sofrer nenhum método de extracção, é possível obter resultados mais rapidamente parecendo ainda que estes serão fidedignos.

6.2.2 Aplicação de métodos de Quencher a vários tipos de matrizes

Repiso de tomate e Bagaço de azeitona

Tendo-se verificado que o método de Quencher apresentou resultados positivos no caso do orégão e seus derivados, procurou-se validar o método aplicando-o a outras matrizes com potencial capacidade antioxidante e com interesse industrial. Foram escolhidos repiso de tomate liofilizado, bagaço de azeitona, amora e sumo de amora comercial.

Nestas matrizes não foi necessária qualquer diluição, o que indicou logo um poder antioxidante inferior ao do orégão.

O repiso de tomate e o bagaço de azeitona foram triturados e peneirados nas mesmas condições. Os resultados de actividade antioxidante assim obtidos são apresentados na figura 14.

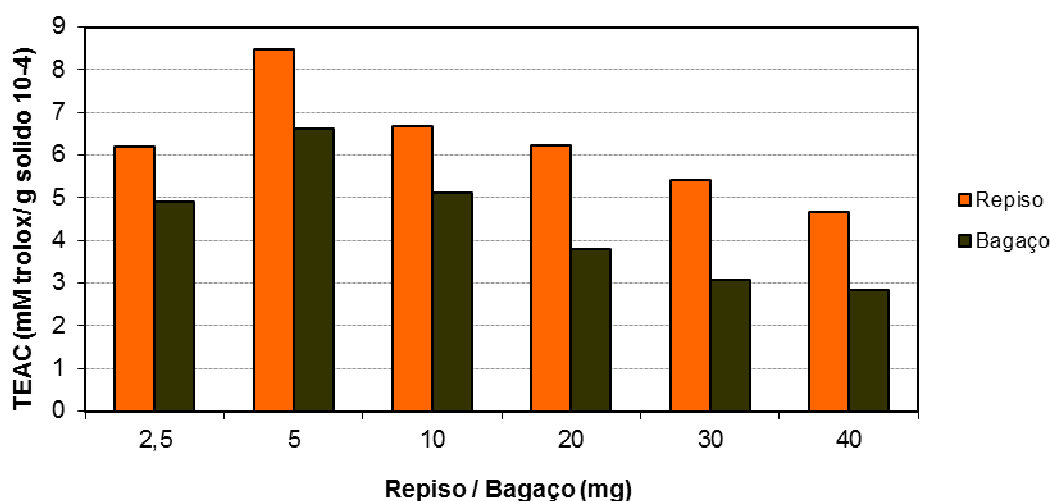


Figura 14 – Comparação do TEAC entre repiso de tomate e bagaço de azeitona, a várias concentrações.

Para todos os valores de concentração o repiso de tomate apresentou maior valor TEAC que o bagaço de azeitona. O comportamento entre as duas matrizes é sempre semelhante. O valor da TEAC aumenta com a concentração até um valor de 5 mg de matriz com potencial antioxidante. A partir desse valor observa-se um decréscimo progressivo no valor TEAC, podendo ser devido a vários factores nomeadamente limitações difusionais, uma vez

que como o tempo de reacção foi de 1 hora para todas as concentrações pode não ter havido tempo para toda a massa reagir com o radical.

Sumo de amora e chá vermelho e sumo de amora comercial

Para este estudo foi utilizado sumo extraído por pressão de amoras frescas e um sumo comercial de amora. O sumo foi extraído, dividido em 2 frascos, um com a adição de azoto liquido e outro sem. Ambos foram armazenados a 4°C durante 21 dias e analisados no tempo 0, 7 e 21 dias.

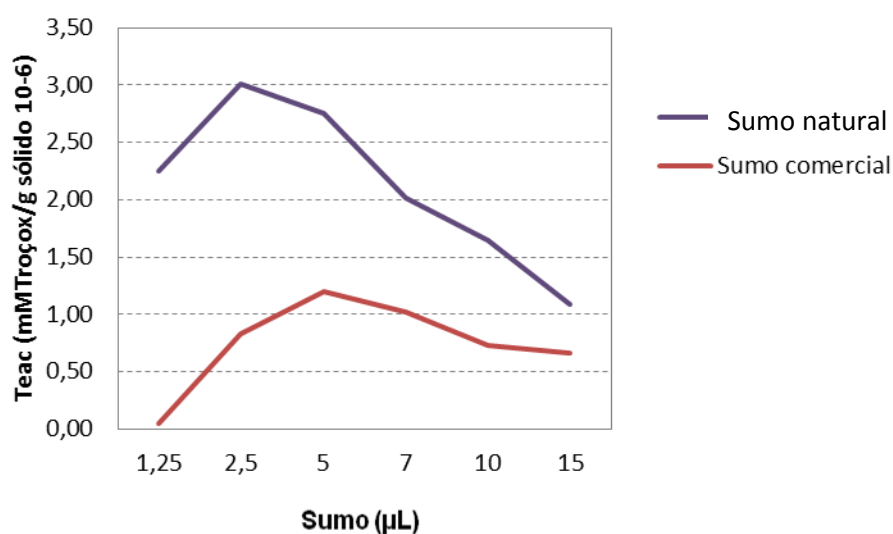


Figura 15 – Comparação do TEAC entre o sumo de amora no “dia 0” e o sumo comercial de amora, a várias concentrações.

Através da observação da figura 15 é notório que o TEAC do sumo natural de amora é muito superior ao do sumo comercial. Este facto pode ficar a dever-se à presença de outro tipo de compostos presentes no chá vermelho que podem complexar e tornar indisponíveis os radicais antioxidantes da amora. Contudo o comportamento entre os dois sumos é semelhante, o sumo natural parece ter a sua reacção completa a 2,5 uL e o sumo comercial a 5uL, a partir destes valores denota-se uma diminuição do valor TEAC. Ao longo da experiencia foi verificada que estas duas matrizes em contacto com a mistura metanol e radical formaram precipitados (possivelmente proteínas e lipidos) dificultando assim a velocidade de reacção, tornando-a mais lenta para concentrações mais elevadas.

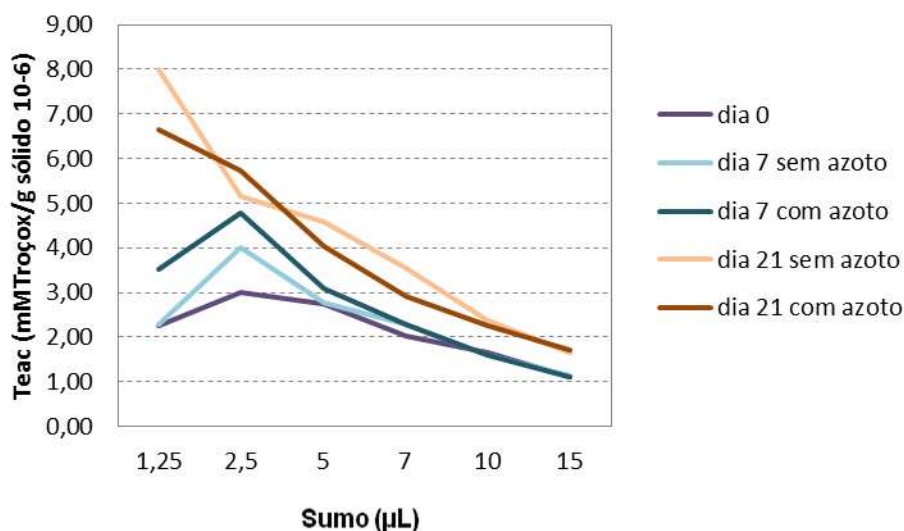


Figura 16 – Comparação do TEAC entre o sumo de amora no “dia 0”, no “dia 7” com e sem azoto e de “dia 21” com e sem azoto, a várias concentrações.

Ao longo do tempo é possível avaliar que o sumo armazenado após 21 dias possui um maior valor TEAC. Este facto deve-se possivelmente a alterações na estrutura do sumo, como libertação de compostos (proteínas e polissacaridos) deixando de formar um precipitado tão coeso em contacto com a mistura reaccional, logo, dando lugar a uma maior reactividade da matriz.

Todas as amostras apresentam comportamento semelhante, apresentando um máximo de TEAC com 2,5 uL, seguindo-se um decréscimo nesse valor, provavelmente devido a reacção incompleta entre as matrizes e o radical.

Através da figura 16 observa-se ainda não existir diferença significativa entre o sumo armazenado com azoto líquido e sem qualquer tipo de adição.

CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objectivos: avaliar a capacidade antioxidante de matrizes com esperado poder antioxidante por dois métodos diferentes, bem como validar o método de Quencher

Os resultados obtidos no decurso do trabalho permitiram retirar as seguintes conclusões:

- O orégão apresenta actividade antioxidante.
- Os compostos com actividade antioxidante encontram-se quer na planta inteira, quer no óleo essencial, e extractos orgânicos do orégão inteiro e desodorizado.
- O estudo da actividade antioxidante pelo método de Rancimat provou que os orégãos inteiros apresentam um maior factor de protecção que os orégãos desodorizados e que o bagaço do mesmo (obtido por extracção de Soxhlet). Ou seja os orégãos inteiros apresentam uma maior actividade antioxidante. Comprovou-se ainda que a extracção de Soxhlet executada com éter dietílico como solvente é mais eficaz na extracção de antioxidantes.
- O método *Quencher* usando o radical DPPH provou ser rápido, eficaz, e coerente com os resultados de Rancimat. Verificou-se que o orégão inteiro apresenta valores de TEAC muito superiores relativamente aos seus extractos e ao repiso de tomate e ao bagaço de azeitona.
- O Sumo de amora natural apresenta um maior poder antioxidante que o sumo comercial. Facto que se pode dever à presença de outro tipo de compostos presentes no chá vermelho que podem complexar tornando indisponíveis os radicais antioxidantes da amora.
- Relativamente ao sumo natural, verificou-se um aumento dos valores de TEAC com o tempo de armazenamento. Este facto pode ser devido a alterações na sua estrutura, aumentando a biodisponibilidade dos antioxidantes que vão reagir com o radical DPPH, obtendo-se valores de TEAC superiores em relação ao sumo produzido no dia.
- O método de *Quencher* é mais expedito, não necessitando de um processo de extracção. No entanto, é preciso ter em conta que é influenciado pela natureza da

matriz sólida e pelo solvente usado. É necessário um estudo do efeito destes parâmetros para uma aplicação comparativa aprofundada em várias matrizes.

BIBLIOGRAFIA

BRENNAN, J.G.; BUTTERS, J.R., COWELL, N. D.; LILLEY, A. E. V.; *Antimicrobial properties of phenolic antioxidants and lipids. Food Technol.*, May:42-53, 1989.

CAMPOS, W. E.; SATURINO, H. M.; BORGES, A. L. C. C.; REIS E SILVA, R.; SOUSA, B.M.; CAMPOS, M. M.; ROGÉRIO, M. C. P.; *Digestibilidade Aparente de Dietas Contendo Diferentes Proporções de Resíduo Industrial de Tomate. Ciência Animal Brasileira.* n.3, 2007.

BRAVO, J.; *Amélioration de la qualité de l'huile d'olive.* Conseil Oléicole International. Madrid, 1990.

CAMÕES, M. F., Dias, M. G., Oliveira, L.; *Carotenoids in traditional portuguese fruits and vegetables. Food Chemistry.* Lisboa, v. 13, pp. 808-815, 2008.

CHEVOLLEAU, S.; Debal, A.; Ucciani, E.; *Détermination de l'activité antioxydante d'extraits végétaux. Révue Française des CORPS GRAS*, 39^o année, n^o1/2 :3-8, 1992.

COPPEN, P.P.; *The use of Antioxidants.* Rancidity in Foods, 2nd Ed., (Ed. J.C. Allen, R.J. Hamilton), Elsevier Applied Science, 1989.

DEMAN, J. M.; *Principles of Food Chemistry*, third edition, an aspen publication, food chemistry, third edition, an aspen publication, 1999.

DURÁN, R.M. ; PADILLA, R. B.; *Actividad Antioxidante de los Compuestos Fenólicos. Grasas e Aceites*, Vol. 44 (4):101-107, 1993.

FAISCA, I.M.C.; *Obtenção de extractos a partir de Murta (Myrtus communis L.). Avaliação da sua actividade antioxidante*, Lisboa, 1998.

FAULKS, R. M.; Southon, S.; *Carotenoids, metabolism and disease.* In R. E. C. Wildman, Handbook of nutraceuticals and functionalfoods, 2001.

HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group, 2001.

HEATH, H.; *Source book of flavours*. The Avi Publishing co. Inc., Westport, Connecticut, U.S.A, 1981.

HERNÁNDEZ, E. et al.; *Antioxidante effect rosemary (Rosmarinus officinalis L.) and oregano (Origanum vulgare L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters*. *Meat Science*, v.82, n. 2, 410-417, 2009.

GARDÉ, A. H. A.; GARDÉ, V.P.M. N.; *Culturas Hortícolas*, Livraria Clássica Editora, Porto, 1971.

GÖKEN, V.; SERPEN, A.; FOGLIANO, V.; *Direct measurement of total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach*, *Trends in food Science & Technology* 20, 2009.

GRAZIANI, G.; PERNICE, R.; LANZUISE, S.; VITAGLIONE, P; ANESE, M., & FOGLIANO, V.; *Effect of peeling and heating on carotenoid content and antioxidant activity of tomato and tomato-virgin oliveoil systems*. *European Food Research Technology*, v. 216, 116-121, 2003.

KALIORA, A. C.; DEDOUSSIS, G. V.; *Natural antioxidant compounds in risk factors for CVD*. *Pharmacological Research*, 56, 99-109, 2007.

LIEWEN, M. B.; *Antimicrobials in Encyclopedia of food Science & Tecnology*, Vol. 1 (Ed.-in Chief Y. H. Hui), John Willey & Sons, 1992.

MAGUER, M. e MAZZA, G. (Ed.) – *Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects*, Volume 2, Functional Foods and Nutraceuticals Series, CRC Press. cap. 4, pp.135 – 163, 1979.

POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M.; *Antioxidantes de los Alimentos, Aplicaciones prácticas*, Editorial Acribia, S.A., 2005.

PORTER, W. L.; *Recent trends in food applications of antioxidants*. In: *Antioxidation in Food and Biological Systems*, eds Simic G & Karel M. Plenum Press, New York, USA, pp 295-366, 1980.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C.; *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*, Free radical biology & medicine, v. 26, 1231-1237, 1999.

SERPEN, A.; CAPUANO, E., FOGLIANO, V., & GÖKMEN, V.; *A new procedure to measure the antioxidant activity of insoluble food components*. Journal of agricultural and food chemistry, v.55, 7676-7681, 2007.

SHI, J.; LE MAGUER, M. e BRYAN, M; *Lycopene from Tomatoes*, Southern Crop Protection and Food Research Center, Agriculture and Agri-Food Canada, v. 40, 1-42, 2002.