

DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Caracterização de Antioxidantes com Potencial Interesse Industrial

BÁRBARA LUÍSA MENDES DE ALMEIDA BARRETO

Mestrado em Engenharia Química

Ramo Gestão de Energia na Indústria Química

Dezembro de 2008

Caracterização de Antioxidantes com Potencial Interesse Industrial

Mestrado em Engenharia Química

Orientador: Doutor Paulo Silva

Co-orientador: Doutor Jorge Garrido

Realizado Por: Bárbara Barreto



2008

Resumo

O objectivo deste trabalho residiu na comparação da capacidade antioxidativa de diferentes compostos fenólicos. Os estudos foram efectuados com base na avaliação da temperatura de indução de oxidação do ácido linoleico.

No início do trabalho realizou-se o estudo da estabilidade térmica e termo-oxidativa do ácido linoleico e dos diversos antioxidantes: ácidos protocatecuico e homo-protocatecuico e dos ésteres metílico, etílico e propílico do ácido protocatecuico. A estabilidade térmica foi estudada desde os 25°C até aos 400°C, em atmosfera de azoto e a estabilidade termo-oxidativa foi avaliada desde os 25°C até aos 220°C, em atmosfera de oxigénio.

Depois de estudar e otimizar as condições de análise e o método de preparação das amostras, foi analisada a oxidação do ácido linoleico na presença dos antioxidantes mencionados. Os resultados obtidos mostraram que, em comparação com os ésteres, os compostos ácidos são antioxidantes mais eficazes. Nos ácidos observa-se que a introdução de um grupo CH_2 entre o anel aromático e o grupo ácido aumenta a eficácia do poder antioxidante da espécie química. No respeitante ao poder estabilizante dos ésteres do ácido protocatecuico, o aumento do número de átomos de carbono do radical do grupo éster tem um efeito difícil de caracterizar no que concerne à capacidade antioxidativa. O éster com o maior radical (radical propilo) tem mais capacidade para evitar o aumento da velocidade de oxidação medida pelo pico do termograma diferencial, mas ao mesmo tempo a temperatura de indução de oxidação indica que o éster com maior radical apresenta menor capacidade para estabilizar o ácido linoleico.

Foi, ainda estudado o efeito que a concentração do antioxidante e o método de preparação das amostras tinham na estabilidade do ácido linoleico. No caso dos ácidos verificou-se que o aumento para o dobro da concentração do antioxidante resultava num aumento em 21°C da temperatura de indução da oxidação.

Avaliou-se, também, a utilização de termogramas diferenciais para a caracterização da acção antioxidativa.

Palavras-Chave: antioxidantes fenólicos, temperatura de indução da oxidação, calorimetria diferencial de varrimento.

Abstract

The aim of this work was to compare the anti-oxidative capacity of different phenolic compounds. The study has been based on the evaluation of linoleic acid oxidation induction temperature.

In the beginning of the work, the thermal and thermo-oxidative stability of linoleic acid and the different antioxidants was determined: protocatechuic acid, homoprotocatechuic acid, and methylic, ethylic and propylic esters of protocatechuic acid. The thermal stability was analyzed from 25°C to 400°C, in nitrogen atmosphere, while thermo-oxidative stability was evaluated from 25°C to 220°C, in oxygen atmosphere.

After studying and optimizing the analysis conditions and the sample preparation method, the linoleic acid oxidation in the presence of the different antioxidants was evaluated. The results showed that acids seem to be more efficient when compared with esters. Was demonstrated that, in acids, a CH₂ group between the aromatic ring and the acid group increases the anti-oxidative power of the chemical species. Among the esters of protocatechuic acid, it's difficult to characterize the effect of increasing the carbon atom number (of the radical of ester group) on the antioxidative capacity. The propylic ester, which is the longer one, exhibited a better capacity to avoid the increase of oxidation speed, when measured the peak temperature of the differential thermogram. But, simultaneously, the oxidation induction temperature indicates that the ester with longer radical shows less capacity to stabilize the linoleic acid.

The effect that the concentration and the sample preparation method had on the linoleic acid stability was investigated. Phenolic acids showed that the increase for the double of concentration resulted in the improvement of 21°C on the oxidation induction temperature.

The use of differential thermograms for the characterization of antioxidative action was evaluated in this work.

KEYWORDS: phenolic antioxidants, induction oxidation temperature, differential scanning calorimetry.

Índice

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 OXIDAÇÃO	1
1.1.1 <i>Oxidação em Materiais Poliméricos Sintetizados</i>	2
1.1.2 <i>Oxidação em Medicamentos</i>	4
1.1.3 <i>Oxidação em Seres Vivos</i>	6
1.1.4 <i>Oxidação em Lípidos</i>	8
1.2 ANTIOXIDANTES	10
1.2.1 <i>Antioxidantes Fenólicos</i>	12
1.2.2 <i>Mecanismo de Acção dos Antioxidantes Fenólicos</i>	14
1.3 MÉTODOS PARA AVALIAR A CAPACIDADE ANTI-OXIDATIVA	16
1.4. UTILIZAÇÃO DE UM CALORIMETRO DIFERENCIAL DE VARRIMENTO PARA A AVALIAÇÃO DE ANTIOXIDANTES..	18
1.5 ÁCIDO LINOLEICO	19
1.6 OBJECTIVOS DO TRABALHO	22
1.7 ESTRUTURA DO RELATÓRIO	22
2. PARTE EXPERIMENTAL	25
2.1 REAGENTES	25
2.2 EQUIPAMENTO	27
2.2.1 <i>Calorímetro Diferencial de Varrimento</i>	27
2.2.2 <i>Balança Analítica</i>	27
2.2.3 <i>Micropipetas</i>	27
2.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	28
2.3.1 <i>Preparação da Amostra de Ácido Linoleico</i>	28
2.3.2 <i>Preparação das Soluções de Antioxidante</i>	28
2.3.3 <i>Preparação da Amostra de Ácido Linoleico com Adição de Antioxidante</i>	29
2.4 CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS	30
2.4.1 <i>Avaliação da Estabilidade Térmica</i>	30
2.4.2 <i>Avaliação da Estabilidade Termo-Oxidativa</i>	30
2.5 ENSAIOS EFECTUADOS.....	31
2.5.1 <i>Avaliação da Estabilidade Térmica dos Antioxidantes</i>	31
2.5.2 <i>Avaliação da Estabilidade Termo-Oxidativa dos Antioxidantes</i>	31
2.5.3 <i>Análise da Estabilidade Térmica do Ácido Linoleico</i>	31
2.5.4 <i>Análise da Estabilidade Termo-Oxidativa do Ácido Linoleico</i>	31
2.5.5 <i>Avaliação do Efeito do Solvente na Termo-Oxidação do Ácido Linoleico</i>	32
2.5.6 <i>Avaliação do Efeito da Preparação das Amostras na Termo-Oxidação do Ácido Linoleico</i>	32
2.5.7 <i>Análise do Efeito dos Antioxidantes na Estabilidade Termo-Oxidativa do Ácido Linoleico</i>	33
2.5.8 <i>Análise do Efeito da Concentração dos Antioxidantes na Estabilidade Termo-Oxidativa do Ácido Linoleico</i>	33
3. ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS	34
3.1 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DOS ANTIOXIDANTES.....	34

3.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA DOS ANTIOXIDANTES	40
3.3 ANÁLISE DA ESTABILIDADE TÉRMICA DO ÁCIDO LINOLEICO	46
3.4 ANÁLISE DA ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA DO ÁCIDO LINOLEICO	48
3.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SOLVENTE NA TERMO-OXIDAÇÃO DO ÁCIDO LINOLEICO	50
3.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS NA TERMO-OXIDAÇÃO DO ÁCIDO LINOLEICO	52
3.7 ANÁLISE DO EFEITO DOS ANTIOXIDANTES NA ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA DO ÁCIDO LINOLEICO	54
3.7.1 <i>Análise do Efeito dos AntiOxidantes na Estabilidade Oxidativa do Ácido Linoleico – Termogramas Diferenciais</i>	61
3.7.2 <i>Comparação Entre os Termogramas e os Termogramas Diferenciais</i>	65
3.8 ANÁLISE DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÁCIDO LINOLEICO	67
3.8.1 <i>Análise do Efeito da Concentração dos Antioxidantes na Estabilidade Oxidativa do Ácido Linoleico – Termogramas Diferenciais</i>	70
4. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	72
ANEXOS	75

Índice de Figuras

Figura 1 – Estabilidade térmica do PA (2 ensaios em diferentes tomas de amostra). Varrimento desde os 25°C até ao 400°C com uma rampa de 5°C/min em atmosfera de azoto (20 ml/min).....	34
Figura 2 – Estabilidade térmica do DOPA (2 ensaios em diferentes tomas de amostra). Varrimento desde os 25°C até ao 400°C com uma rampa de 5°C/min em atmosfera de azoto (20 ml/min).....	35
Figura 3 – Estabilidade térmica do PM. Varrimento desde os 25°C até ao 400°C com uma rampa de 5°C/min em atmosfera de azoto (20 ml/min).....	36
Figura 4 – Estabilidade térmica do PE. Varrimento desde os 25°C até ao 400°C com uma rampa de 5°C/min em atmosfera de azoto (20 ml/min).....	37
Figura 5 – Estabilidade térmica do PP. Varrimento desde os 25°C até ao 400°C com uma rampa de 5°C/min em atmosfera de azoto (20 ml/min).....	38
Figura 6 – Estabilidade oxidativa do PA (2 ensaios em diferentes tomas de amostra). Varrimento desde os 25°C até aos 220°C, com uma rampa de temperatura de 5°C/min, em atmosfera de oxigénio (50 ml/min).....	40
Figura 7 – Comparação da estabilidade térmica (----) com a estabilidade termo-oxidativa (—) do PA.....	41
Figura 8 – Estabilidade oxidativa do DOPA (2 ensaios em diferentes tomas de amostra). Varrimento desde os 25°C até aos 220°C, com uma rampa de temperatura de 5°C/min, em atmosfera de oxigénio (50 ml/min).....	41
Figura 9 – Comparação da estabilidade térmica (----) com a estabilidade termo-oxidativa (—) do DOPA.....	42
Figura 10 – Estabilidade termo-oxidativa do PM. Varrimento desde os 25°C até aos 220°C, com uma rampa de temperatura de 5°C/min, em atmosfera de oxigénio (50 ml/min).....	42
Figura 11 – Comparação da estabilidade térmica (----) com a estabilidade termo-oxidativa (—) do PM.....	43
Figura 12 – Estabilidade termo-oxidativa do PE. Varrimento desde os 25°C até aos 220°C, com uma rampa de temperatura de 5°C/min, em atmosfera de oxigénio (50 ml/min).....	43
Figura 13 – Comparação da estabilidade térmica (----) com a estabilidade termo-oxidativa (—) do PE.....	44

Figura 14 – Estabilidade termo-oxidativa do PP. Varrimento desde os 25°C até aos 220°C, com uma rampa de temperatura de 5°C/min, em atmosfera de oxigénio (50 ml/min).....	44
Figura 15 – Comparação da estabilidade térmica (----) com a estabilidade termo-oxidativa (—) do PP.....	45
Figura 16 – Estabilidade térmica do ácido linoleico (dois ensaios em diferentes tomas de amostra). Varrimento desde os 25°C até ao 400°C com uma rampa de 5°C/min em atmosfera de azoto (20 ml/min).....	46
Figura 17 – Estabilidade oxidativa do ácido linoleico (dois ensaios em diferentes tomas de amostra). Varrimento desde os 25°C até ao 220°C com uma rampa de 5°C/min em atmosfera de azoto (50 ml/min).....	48
Figura 18 – Comparação da estabilidade térmica (----) com a estabilidade oxidativa (—) do ácido linoleico.....	49
Figura 19 – Comparação da estabilidade oxidativa do ácido linoleico sem acetona (—) e com acetona (----).....	50
Figura 20 – Estudo da oxidação do ácido linoleico com acetona depois de o deixar à temperatura ambiente do laboratório durante 0 horas (—), 24h (----), 48h (....), e 72h (---).....	52
Figura 21 – Oxidação do ácido linoleico sem a presença de antioxidante (—) e estabilizado com PA (----).....	54
Figura 22 – Oxidação do ácido linoleico sem a presença de antioxidante (—) e estabilizado com DOPA (----).....	55
Figura 23 – Oxidação do ácido linoleico sem a presença de antioxidante (—) e estabilizado com PM (----).....	56
Figura 24 – Oxidação do ácido linoleico sem a presença de antioxidante (—) e estabilizado com PE (----).....	57
Figura 25 – Oxidação do ácido linoleico sem a presença de antioxidante (—) e estabilizado com PA (----).....	58
Figura 26 – Termogramas da oxidação do ácido linoleico na presença de antioxidantes. De baixo para cima: sem antioxidante, com PA, com DOPA, com PM, com PE e com PP.....	59
Figura 27 – Estudo comparativo da estabilidade oxidativa do PM: termograma (—), termograma diferencial (....).....	61
Figura 28 – Termogramas diferenciais representativos da estabilidade oxidativa do ácido linoleico (—), ácido linoleico com PA (....), ácido linoleico com DOPA (----).....	63

Figura 29 – Termogramas diferenciais representativos da estabilidade oxidativa do ácido linoleico (—), ácido linoleico com PM (---), ácido linoleico com PE (...), ácido linoleico com PP(---).....**63**

Figura 30 – Gráfico comparativo das diferentes TIO (quadrados), TIO* (círculos) e TPD (triângulos).....**66**

Figura 31 – Estabilidade térmica do ácido linoleico com diferentes concentrações de PA: $1,4 \times 10^{-7}$ (—); $2,7 \times 10^{-7}$ (----) e $5,4 \times 10^{-7}$ (.....) (mol/L).....**67**

Figura 32 – Estabilidade térmica do ácido linoleico estabilizado com diferentes concentrações de DOPA: $1,4 \times 10^{-7}$ (—); $2,7 \times 10^{-7}$ (----) e $5,4 \times 10^{-7}$ (.....) (mol/L).....**68**

Figura 33 – Derivadas dos termogramas representativos da estabilidade térmica do ácido linoleico com diferentes concentrações de PA: $1,4 \times 10^{-7}$ (—); $2,7 \times 10^{-7}$ (----) e $5,4 \times 10^{-7}$ (.....) (mol/L).....**70**

Figura 34 – Derivadas dos termogramas representativos da estabilidade térmica do ácido linoleico com diferentes concentrações de DOPA: $1,4 \times 10^{-7}$ (—); $2,7 \times 10^{-7}$ (----) e $5,4 \times 10^{-7}$ (.....) (mol/L).....**71**

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Preparação de soluções dos diferentes antioxidantes em acetona.....	28
Tabela 2 – Preparação das misturas do antioxidante com o ácido linoleico.....	29
Tabela 3 – Avaliação da estabilidade térmica dos antioxidantes em atmosfera de azoto.....	38
Tabela 4 – Avaliação do efeito da preparação da amostra na estabilidade termo-oxidativa do ácido linoleico.....	53
Tabela 5 – Avaliação do efeito dos antioxidantes na estabilidade termo-oxidativa do ácido linoleico.....	60
Tabela 6 – Análise do efeito dos antioxidantes na estabilidade termo-oxidativa do ácido linoleico, TPD's para os diferentes antioxidantes adicionados ao ácido linoleico.....	64
Tabela 7a – Análise comparativa entre a TIO, TIO* e TPD do ácido linoleico.....	65
Tabela 7b – Análise comparativa entre a TIO do PA e DOPA para diferentes concentrações.....	69
Tabela 7c – Análise comparativa da TIO e TPD para o PA e DOPA para diferentes concentrações.....	71
Tabela 8 – Calibração do Aparelho.....	75
Tabela 9 – Estudo da estabilidade térmica e oxidativa dos antioxidantes.....	75
Tabela 10 – Estudo da estabilidade térmica e oxidativa do ácido linoleico.....	76
Tabela 11 – Estudo da estabilidade do ácido linoleico com acetona à temperatura ambiente – diferentes tempos de espera para evaporação do solvente.....	76
Tabela 12 – Estudo do efeito dos antioxidantes na estabilidade oxidativa do ácido linoleico.....	76
Tabela 13 – Estudo do efeito da concentração do antioxidante PA na estabilidade oxidativa do ácido linoleico.....	76
Tabela 14 – Estudo do efeito da concentração do antioxidante DOPA na estabilidade térmica e oxidativa do ácido linoleico.....	77
Tabela 15 – Estudo da estabilidade térmica do ácido linoleico.....	77
Tabela 16 – Estudo da estabilidade térmica e oxidativa do PA.....	77
Tabela 17 – Estudo da estabilidade térmica e oxidativa do DOPA.....	78
Tabela 18 – Estudo da estabilidade térmica e oxidativa do PM.....	78
Tabela 19 – Estudo da estabilidade térmica e oxidativa do PE.....	78

Tabela 20 – Estudo da estabilidade térmica e oxidativa do PP.....	79
Tabela 21 – Temperatura de Indução de Oxidação e Ponto de Inflexão para os diferentes antioxidantes.....	79
Tabela 22 – Concentrações dos diferentes antioxidantes nas amostras de ácido linoleico analisadas.....	80

Índice de siglas

API – Ingredientes Fármacos Activos

DOPA – Ácido Homo-Protocatecuico

DSC – Calorimetria Diferencial de Varrimento (Differential Scanning Calorimetry)

PA – Ácido Protocatecuico

PE – Éster etílico do Ácido Protocatecuico

PM – Éster metílico do Ácido Protocatecuico

PP – Éster propílico do Ácido Protocatecuico

TIO – Temperatura de Indução de Oxidação

TIO* – Temperatura de Indução de Oxidação da Segunda Rampa (dos termogramas dos ésteres do ácido protocatecuico)

TPD – Temperatura de Pico da Derivada

1. INTRODUÇÃO

1.1 OXIDAÇÃO

Uma reacção de oxidação é toda aquela em que ocorre perda de electrões por parte de um átomo, elevando o seu número de oxidação. O redutor é a espécie química que, na reacção, perde electrões, oxidando-se. O oxidante é a espécie química que, na reacção, capta electrões, reduzindo-se.

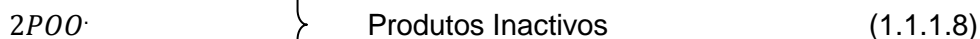
Mas, foi Lavoisier quem deu a primeira definição de oxidação (séc. XVIII), como sendo «qualquer reacção na qual o oxigénio se combinava com outra substância». No entanto verificou-se que essa definição estava manifestamente incompleta. Existem no dia-a-dia inúmeros factos que correspondem a oxidações, em que ocorre uma reacção química com o oxigénio atmosférico, seja na combustão do carvão numa lareira, na respiração de um ser vivo ou na oxidação da maioria dos metais. A oxidação controlada também ocorre em alguns processos químicos, usando o oxigénio atmosférico devido às suas capacidades oxidativas e à sua acessibilidade económica, como por exemplo, na indústria do petróleo e gorduras. No entanto, a auto-oxidação é um processo indesejável pois as borrachas, plásticos, fuel óleos e gorduras podem deteriorar-se e até mesmo rançar.

Seguidamente, dar-se-ão alguns exemplos em que ocorre o fenómeno de oxidação, todos eles têm semelhanças entre si, mas convém perceber também o que os diferencia.

1.1.1.1 OXIDAÇÃO EM MATERIAIS POLIMÉRICOS SINTETIZADOS

Sob o ponto de vista químico, o envelhecimento natural corresponde, basicamente, a um conjunto de reacções químicas entre as macromoléculas poliméricas e o oxigénio atmosférico. A radiação ultravioleta e temperaturas mais elevadas favorecem a ocorrência das reacções químicas provocando, em certas situações, rápidas degradações de materiais. Sob o ponto de vista físico, o envelhecimento poderá provocar, a perda de resistência mecânica levando à ruptura do material. O conjunto das mudanças introduzidas no material polimérico colocado ao ar livre, e portanto na presença de oxigénio, na superfície da Terra, sob a acção da temperatura e da radiação solar, é normalmente designado por foto-oxidação.

A quantidade de factores envolvidos no envelhecimento de materiais poliméricos (*P*) é muito extensa, as condições climáticas, o contacto com outros materiais (por exemplo metais), o contacto com produtos agressivos quimicamente (detergentes, pesticidas, etc...) aceleram o processo de oxidação (P. Silva, 2001).



} Produtos Inactivos

A iniciação do processo oxidativo do polímero pode ser directamente promovida por agentes físicos, como a acção do calor, da radiação UV, da radiação ionizante ou da

acção de esforços mecânicos, ou ainda, indirectamente, devida à presença de impurezas ou irregularidades estruturais do material polimérico. Forma-se, então, um radical polimérico.

A propagação da reacção em cadeia, com a formação de hidroperóxidos poliméricos, dá-se em duas fases: uma primeira reacção extremamente rápida na presença de oxigénio em quantidade suficiente, do radical $P\cdot$ com o oxigénio molecular, dando origem a um radical peróxido polimérico, uma segunda reacção, em que o radical $POO\cdot$ capta um átomo de hidrogénio, preferencialmente de um C terciário, de outra molécula do polímero ou, eventualmente, da mesma molécula (propagação intramolecular).

Durante a ramificação, os hidroperóxidos decompõem-se facilmente por acção da radiação, do calor ou na presença de catalisadores metálicos. A formação de grupos hidroxilo pode ocorrer por reacção dos radicais alcóxido ($PO\cdot$) com outras moléculas do polímero.

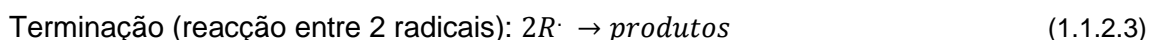
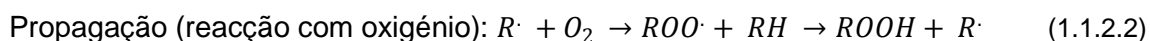
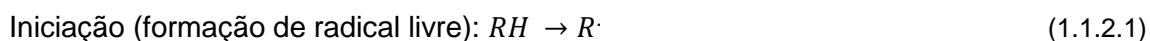
A propagação da reacção em cadeia terminará, na ausência de inibidores, sempre que haja reacção entre dois radicais conduzindo à formação de espécies inactivas.

Como resultado de reacções subsequentes aos processos primários descritos, surgem como produtos da oxidação do polímero compostos contendo grupos de cetona ou aldeído, com um papel importante na foto-oxidação das poliolefinas.

A formação desses grupos cetona e aldeído pode resultar da decomposição de radicais alcóxido ($PO\cdot$), ou de grupos hidroperóxido.

1.1.2 OXIDAÇÃO EM MEDICAMENTOS

A degradação oxidativa de ingredientes de fármacos activos (Active Pharmaceutical Ingredient) em formulações líquidas ou sólidas foi estudada e observou-se que este fenómeno pode levar à diminuição da potência do fármaco e redução do seu tempo de vida. A decomposição oxidativa pode provocar alterações na taxa de dissolução e provocar a descoloração do medicamento. A auto-oxidação é o processo de degradação oxidativa mais comum, cuja reacção envolve três etapas, nas quais o API reage com o oxigénio molecular da seguinte forma:



Este processo é bastante complexo e pode ser catalisado pela luz, temperatura concentração do ião hidrogénio e traços de iões metálicos, em todo semelhante ao exemplo anterior, verificado nos polímeros. Estes catalisadores podem reduzir o tempo de iniciação e aumentar a velocidade de oxidação. Algumas impurezas em excipientes farmacológicos, tais como peróxidos, podem actuar como iniciadores de radicais livres e acelerar o processo de degradação oxidativa. A forma mais óbvia de minimizar a oxidação seria diminuir a concentração de oxigénio aquando do fabrico, de modo a minimizar o contacto do API com o oxigénio. Ao efectuar o processamento em atmosfera de azoto, e diminuindo o espaço livre no contentor poder-se-á melhorar a estabilidade de medicamentos sensíveis ao contacto com oxigénio, mas a sua remoção total é extremamente difícil e apenas a presença de traços de oxigénio são, por vezes, suficientes para iniciar a oxidação. Efectuar o fabrico destes medicamentos a baixas temperaturas também poderia melhorar a estabilidade química. Podem também ser usadas finas películas poliméricas a envolver o medicamento, de forma a reduzir a permeabilidade do oxigénio. Também foram desenvolvidas embalagens especiais de forma a minimizar a degradação oxidativa.

Sabendo-se que o contacto com água catalisa o processo oxidativo, foram alterados os processos de revestimento e granulação para solventes orgânicos de forma a melhorar a estabilidade dos compostos. No entanto, estes solventes não podem ser

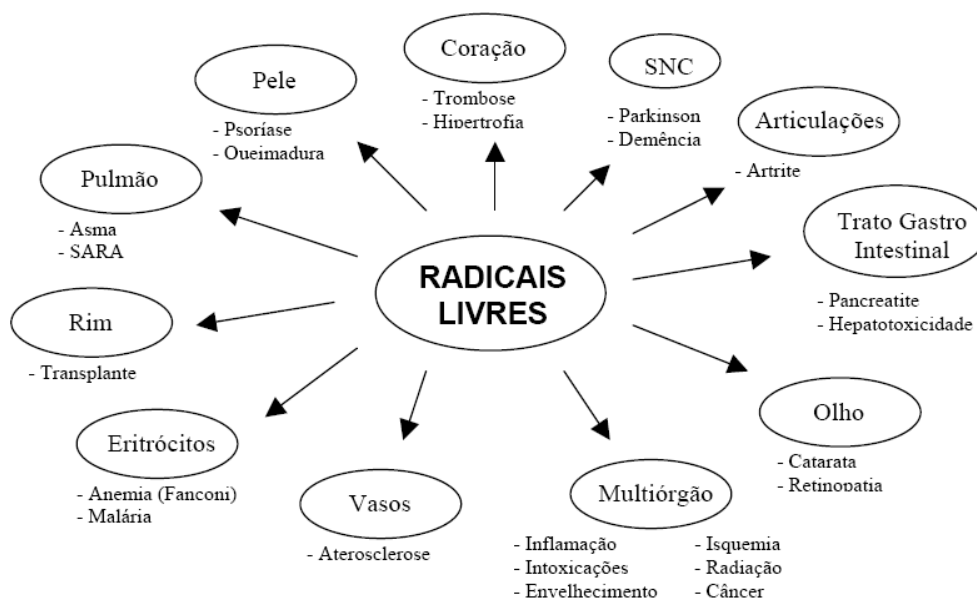
usados em todos os fármacos e devido a problemas de segurança e ambientais, algumas empresas preferem não os utilizar (Felton et al, 2007).

1.1.3 OXIDAÇÃO EM SERES VIVOS

O oxigénio é indispensável para a vida mas quando os seres vivos lhe são expostos em concentrações superiores às encontradas na atmosfera, pode resultar em danos irreversíveis, podendo mesmo levar à morte cerebral. Este elemento primordial à sobrevivência humana, entra em reacções tóxicas e é uma ameaça ao bem-estar dos seres vivos. Ao longo dos tempos, o organismo humano foi evoluindo de forma a minimizar esse efeito tóxico (Renz, 2003).

No entanto, as nossas defesas são imperfeitas e, apesar de limitarem, não conseguem eliminar completamente os danos causados pelo oxigénio. Existem evidências que, à medida que os anos passam, os efeitos maléficos do oxigénio no nosso organismo vão-se acumulando e supõe-se que esse seja um dos factores responsáveis pelo envelhecimento e pelo aparecimento de algumas doenças degenerativas, entre as quais algumas doenças cardiovasculares, cancro, cataratas e o declínio do sistema imunológico ligado à idade, bem como doenças degenerativas do sistema nervoso. Acredita-se que a maioria dos efeitos prejudiciais do oxigénio se deve à formação de espécies instáveis e reactivas (na sua maioria radicais livres) produzidas continuamente no corpo humano através de processos metabólicos normais. Quando estas espécies não são desactivadas, as células do corpo podem ser danificadas, causando efeitos indesejáveis nas proteínas, hidratos de carbono, lípidos e ácidos nucleicos. Sabe-se que, efeitos destrutivos nas proteínas podem levar ao aparecimento de cataratas, no desenvolvimento do cancro estão envolvidos efeitos no DNA e pensa-se que efeitos indesejáveis sobre os lípidos possam contribuir para a arteriosclerose.

Outras doenças poderão estar também relacionadas à formação de radicais livres:



Nos seres humanos, como nos polímeros ou nos fármacos, apesar das diferenças, o resultado da oxidação traduz-se numa perda de propriedades, numa diminuição das características iniciais, através de mecanismos semelhantes.

1.1.4 OXIDAÇÃO EM LÍPIDOS

A auto-oxidação lipídica e de outros substratos oxidáveis é uma reacção de radicais livres em cadeia, em que após a iniciação (que pode ser catalisada pela luz, iões metálicos de transição ou moléculas de água), ocorre a propagação de radicais livres hidroperóxido. Esse processo pode ser representado pela equação:



Observa-se sempre um período de indução, mas através da adição de certos fenóis, aminofenóis ou carotenoides, considerados antioxidantes, durante o processo de oxidação lipídica esse período pode ser alargado. Pode-se prever que a oxidação de lípidos seja lenta no início e após o período de indução, os hidroperóxidos e produtos hidroperoxídicos, incluindo aldeídos e cetonas sejam produzidos rapidamente. A duração do período de indução depende da presença de antioxidantes e da estrutura do próprio lípido – a presença de grupos poli-insaturados provocam oxidação com maior facilidade do que grupos mono-insaturados ou saturados.

Em fases mais avançadas da degradação ocorre uma diminuição da velocidade de oxidação em resultado do aumento da importância das reacções de terminação. Essa reacção pode ocorrer através da combinação de dois radicais peróxido:



Durante o período de indução, os antioxidantes fenólicos e os radicais são consumidos em reacções do seguinte tipo:



É comum referir que a actividade antioxidante dos polifenóis está relacionada com a presença de grupos hidroxilo, mas a sua eficácia é afectada pela restante molécula. Por exemplo: a presença de uma cadeia alquílica na posição *para* é favorável à deslocalização de electrões e à estabilização dos radicais formados durante a reacção em cadeia referida anteriormente. Da mesma forma, grupos dadores de electrões na

posição *orto*, aumentam a estabilidade dos radicais fenoxilo e observa-se um efeito de inibição (Litwinienko *et al*, 1999).

1.2 ANTIOXIDANTES

Um antioxidante é uma molécula capaz de diminuir a velocidade ou prevenir a oxidação de outras moléculas, é por essa razão denominado como agente redutor.

Genericamente, os seres vivos obtêm os antioxidantes pelos alimentos, sendo encontrados na sua maioria nos vegetais, o que explica a maioria das acções saudáveis que as frutas, legumes, cereais têm no nosso organismo. Nos últimos anos, tem vindo a aumentar o interesse pela descoberta de novos antioxidantes e perceber qual é, ao certo, o efeito que estes têm no organismo humano. Sabe-se que não são capazes de impedir o envelhecimento, e que, em doses elevadas poderão mesmo ser prejudiciais.

Em termos «biológicos», um antioxidante é uma substância sintética ou natural que adicionada a um produto, previne ou retarda a sua deterioração pela acção do oxigénio atmosférico.

Na medicina e bioquímica, os antioxidantes são enzimas ou substâncias orgânicas, tais como a vitamina E e o β -caroteno, capazes de agir contra os efeitos indesejáveis provocados pela oxidação nos tecidos animais.

Como é evidente, a preocupação que a população em geral tem com a saúde leva a querer saber mais sobre os efeitos e forma de actuar dos antioxidantes no organismo humano. Mas, dependendo da disciplina científica, o âmbito e o alvo a proteger da oxidação são diferentes. Na indústria química, geralmente, os antioxidantes são compostos que retardam a auto-oxidação de borrachas e plásticos. Na indústria alimentar, os antioxidantes têm uma aplicação mais generalista, pois para além de alguns prevenirem alguns alimentos de rançar, outros são usados como complementos na dieta diária, de forma a proteger o organismo dos efeitos maléficos dos radicais livres, inibindo-os (Huang *et al.*, 2005).

De acordo com a estrutura do agente antioxidante, podem ser divididos em:

Enzimáticos – incluem a SOD que catalisa a reacção de $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 e H_2O , a catalase que converte H_2O_2 em H_2O e O_2 e a glutathiona peroxidase que reduz H_2O_2 a H_2O .

Não enzimáticos – incluem vitaminas lipo-solúveis como a E e a A, a pró-vitamina A (beta-caroteno) e a vitamina C.

Os antioxidantes também podem ser classificados como: primários (ligando-se directamente aos radicais livres; secundários (quando consomem O_2); terciários (agentes quelantes – ácido cítrico e EDTA, complexam com iões metálicos), dependendo do seu mecanismo de acção.

É necessária uma cuidadosa escolha do antioxidante e da sua concentração, dependendo da substância em causa, pois uma escolha incorrecta pode mesmo levar à catálise ou iniciação da oxidação (Felton *et al.*, 2007).

1.2.1 ANTIOXIDANTES FENÓLICOS

Apesar de os antioxidantes serem estudados há mais de 60 anos, ainda muito pouco se sabe sobre que influência tem cada parte individual do antioxidante na sua actividade e eficiência. Sabe-se por exemplo que a maioria dos poli-hidroxi-fenóis são responsáveis pela rotura de ligações durante a auto-oxidação de radicais, mas o mecanismo da reacção não foi ainda claramente estabelecido. Para além disso, é difícil explicar a actividade dos antioxidantes através da estabilização de moléculas por ressonância devido à enorme capacidade que estas têm para formar pontes de hidrogénio intra-moleculares entre grupos hidroxilo.

Uma das grandes vantagens dos anti-oxidantes fenólicos, e certamente uma das razões por serem tão estudados, é pelo facto de fazerem parte da composição de um vasto leque de substâncias do reino vegetal, sendo que, actualmente, são conhecidas mais de 8000 estruturas fenólicas (Paixão *et al.*, 2007). Existem estudos que têm demonstrado que a sua presença em certos alimentos e bebidas está directamente relacionada com a menor incidência de certas doenças (García-Pérez *et al.*, 2007). Há certas evidências epidemiológicas que indicam existir uma relação entre dietas ricas em frutos e vegetais e a diminuição do risco de certas formas de cancro. Certos compostos poli-fenólicos, existentes em algumas plantas, têm capacidades antioxidantes, anti-mutagénicas, anti-inflamatórias e anti-microbianas (Hatano *et al.*, 2002). No que respeita a compostos fenólicos o chá, em especial chá verde, vinho tinto, cerveja e outros alimentos têm uma composição complexa nestes constituintes. Os componentes fenólicos que mais largamente estão presentes na constituição de plantas são os ácidos hidrocianímicos – ácido *p*-cumárico, cafeico e cerúlico. Estes ácidos são produtos do metabolismo secundário das plantas.

Baseado no esqueleto de carbono da molécula, os poli-fenóis são classificados como compostos não-flavonóides (ácidos hidrocianímicos e ácidos benzóicos) e flavonóides (favonóis, flavonas, flavanóis e isoflavonas). Estas substâncias, demonstram actividades biológicas relevantes, agindo como anti-bacterianos, anti-viricos, imuno-estimulantes e com capacidades estrogénicas, para além do seu efeito anti-proliferativo e com propriedades citotóxicas em algumas células tumorais (Gomes *et al.*, 2003).

No estudo realizado, foram usados antioxidantes fenólicos não vegetais:

- Ácido protocatecuico (e seus ésteres: metílico, etílico e propílico)
- Ácido homoprotocatecuico

Pretende-se estudar o efeito destes antioxidantes fenólicos, tomando como referência o ácido linoleico, que sendo uma gordura (ácido insaturado com duas ligações duplas) sofrerá um processo de auto-oxidação.

1.2.2 MECANISMO DE ACÇÃO DOS ANTIOXIDANTES FENÓLICOS

A função dos antioxidantes fenólicos ($ArOH$) é interceptar e reagir com os radicais livres mais rapidamente do que o substrato.

Existem dois mecanismos mais consensuais propostos para a acção dos antioxidantes fenólicos, denominados transferência de átomo de hidrogénio - HAT (Hydrogen Atom Transfer) e transferência de electrão seguida de transferência de protão - SET-PT (Single Electron Transfer followed by Proton Transfer). Recentemente foi proposto um novo mecanismo designado por perda de protão transferência de electrão sequencial - SPLET (Sequential Proton Loss Electron Transfer).

No mecanismo HAT, a função do antioxidante é a interrupção da seguinte reacção em cadeia:



O segundo mecanismo possível, o antioxidante desactiva um radical livre através da transferência de um electrão, em que o radical catiónico $ArOH^{+\cdot}$ é formado inicialmente e seguidamente ocorre a sua desprotonação:



O resultado final após esta sequência de reacções é igual ao que ocorre com o mecanismo de HAT (Eq. (1.2.4.1)).

Foi confirmado experimentalmente que a vitamina E e outros fenóis podem reagir com 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo ($DPPH\cdot$) e outros radicais deficientes de electrão ($ROO\cdot$) através de dois mecanismos distintos e não exclusivos, o HAT e SPLET.

O mecanismo SPLET pode ser descrito pelas seguintes equações:





A entalpia da reacção do primeiro passo, Eq. (1.2.4.5), corresponde à afinidade de protão do anião fenóxido (ArO^-). No segundo passo, ocorre a transferência de electrão do anião fenóxido para o $ROO\cdot$ e é formado o radical fenóxilo. A entalpia deste passo é denominada a entalpia de transferência de electrão – ETE. Mais uma vez, o resultado final, em termos de acção antioxidante, do SPLET é o mesmo que nos dois mecanismos anteriormente referidos, i.e. $ArOH \rightarrow ArO\cdot + H\cdot$ (E. Klein *et al.*, 2007).

1.3 MÉTODOS PARA AVALIAR A CAPACIDADE ANTI-OXIDATIVA

Existem diferentes métodos para analisar a capacidade anti-oxidativa de certas substâncias. Dependendo das reacções envolvidas, analisadas anteriormente, podem ser classificados em dois grandes grupos:

HAT – Hydrogen Atom Transfer, ensaios baseados na transferência de um átomo de hidrogénio.

ET – Electron Transfer, ensaios baseados na transferência de electrão.

A maioria dos métodos HAT aplica a hipótese da ocorrência de reacções múltiplas, nas quais o antioxidante e substrato competem entre si pelos radicais peróxilo, Estas análises incluem a inibição da auto-oxidação induzida de lipo-proteínas de baixa densidade, a capacidade de absorvância do radical de oxigénio (ORAC – Oxygen Radical Absorbance Capacity), parâmetro antioxidante de captura total de radicais (TRAP – Total Radical Trapping Antioxidant Parameter) e ensaios de descoloração de $C_{44}H_{64}O_{24}$ (*cloacin bleaching*).

Os métodos baseados em ET medem a capacidade dos antioxidantes através da redução de oxidantes, que mudam de cor quando são reduzidos. O grau de mudança de cor é correlacionado com a concentração das amostras de antioxidante. Estes incluem o ensaio de quantidade total de fenóis pelo reagente Folin-Ciocalteu (FCR), a capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC), poder antioxidante na redução do ião férrico (FRAP), ensaio do «potencial total antioxidante» usando um complexo de Cu(II) como oxidante e DPPH. Baseados nestas análises, o ensaio da quantidade total de fenóis por FCR é usado para quantificar a capacidade redutora dos antioxidantes e o ensaio de ORAC é utilizado para a quantificação da capacidade de captura de radicais peróxilo (Huang *et al.*, 2005). O método do DPPH é também usado com enorme frequência devido à sua rapidez e baseia-se no desaparecimento de radicais livres devido à presença dos antioxidantes. O radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH \cdot) é estável e fácil de manusear. A actividade antioxidante é reportada como sendo a concentração de antioxidante capaz de fazer baixar a concentração (em 50%) de DPPH \cdot em relação à inicial, num determinado período de tempo previamente fixado. Este e outros testes são efectuados à temperatura ambiente.

A peroxidação lipídica a temperaturas superiores pode ser avaliada através de testes de oxidação acelerada, estes tornam-se extremamente importantes quando as condições a que os testes ocorrem são similares às que as gorduras e óleos encontram aquando do seu processamento e utilização. Os métodos termoanalíticos são uma alternativa à medição da concentração de peróxidos através de métodos iodométricos e outros métodos clássicos de análise, isto porque estes métodos limitam-se a monitorizar o produto formado enquanto os métodos termoanalíticos analisam a taxa de oxidação. Como a oxidação lipídica, em atmosfera de oxigénio, é um processo exotérmico, este método tem vindo a ser usado com maior frequência nos últimos tempos. Está demonstrado que as técnicas de DSC isotérmicas e não-isotérmicas podem ser aplicadas na análise da auto-oxidação de gorduras (Litwinienko *et al.*, 1998). As experiências isotérmicas são mais morosas e geralmente são efectuadas a elevada pressão de oxigénio (PDSC – Pressure Differential Scanning Calorimetry). Contrariamente, o método não-isotérmico, é mais rápido e permite obter mais informação, não só sobre a primeira fase da oxidação (observada também na análise isotérmica convencional), como também sobre as fases seguintes da oxidação, apenas com um único ensaio.

Apesar de todas estas possibilidades de estudo da actividade antioxidante e/ou anti-radical, a natureza complexa do fenómeno da oxidação faz com que existam ainda muitas dúvidas quanto à relação estrutura-actividade que favorece o(s) mecanismo(s) anti-oxidativo(s) e não se conseguiu ainda determinar qual o processo preponderante. Uma avaliação parcelar pode não descrever o que se passa na realidade uma vez que se suspeita que possam ocorrer simultaneamente diferentes mecanismos de estabilização.

1.4. UTILIZAÇÃO DE UM CALORIMETRO DIFERENCIAL DE VARRIMENTO PARA A AVALIAÇÃO DE ANTIOXIDANTES

Os métodos termoanalíticos têm sido usados frequentemente para caracterizar o comportamento antioxidante a altas temperaturas. Kowalsski (Kowalsski *et.al.* 1991) usou a Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC – Differential Scanning Calorimetry) para determinar a capacidade antioxidante de óleos vegetais e banha de porco aquecendo as amostras até 360°C. Litwinienko (Litwinienko *et al.* 1997) investigou as propriedades cinéticas da termo-oxidação do ácido linoleico por DSC em condições não isotérmicas (50-300°C). Esta técnica foi também usada para medir a eficiência de vários antioxidantes fenólicos comerciais (Breese *et al.* 2000). Outros autores constataram que o DSC é um método relativamente simples, rápido e conveniente para estudar a eficiência dos antioxidantes fenólicos (Garcia-Perez *et al.*, 2007). Em processos que envolvem mudanças de entalpia, o DSC demonstra ser bastante eficaz. Como se sabe, a oxidação lipídica é um processo exotérmico, assim sendo através de análises de DSC é possível monitorizar esse calor libertado.

No presente estudo foi usado o DSC, com o oxigénio como gás de purga, para avaliar a Temperatura de Indução de Oxidação (TIO), como sendo uma ferramenta rápida e eficaz de determinar a estabilidade oxidativa do ácido linoleico na presença de diferentes antioxidantes. Com o mesmo tipo de equipamento pode-se realizar um ensaio isotérmico para a determinação do chamado Tempo de Indução da Oxidação. Nesse caso a amostra é, em primeiro lugar, colocada num cadinho de alumínio e aquecida até uma determinada temperatura, numa atmosfera com um gás de purga não-reactivo (azoto). Após a comutação para oxigénio, como gás de purga, avalia-se o tempo necessário para que se desencadeie a oxidação.

Nos dois métodos o equipamento vai medir o fluxo de calor associado à reacção de oxidação do ácido linoleico.

1.5 ÁCIDO LINOLEICO

O ácido linoleico é um ácido insaturado que contém duas ligações duplas por molécula. A configuração é quase invariavelmente *cis*, de preferência à configuração mais estável *trans*. A existência de insaturação com esta estereoquímica particular tem um efeito aparentemente trivial, mas na realidade tem um significado biológico vital: faz descer o ponto de fusão. No estado sólido, as moléculas de uma gordura ajustam-se umas às outras tanto quanto possível; quanto mais elas se ajustam, maiores são as forças intermoleculares e mais alto é o ponto de fusão. As cadeias de ácidos insaturados, ajustam-se mal umas às outras e às cadeias saturadas. Em consequência, a insaturação *cis*, baixa o ponto de fusão. Esta é uma das principais razões pelas quais este composto foi usado neste trabalho, desta forma, torna-se fácil monitorizar a reacção exotérmica que ocorre a temperaturas relativamente baixas e a uma velocidade considerável, o que permite efectuar análises pouco morosas, quando comparada com outras substâncias. O outro motivo pelo qual foi estudado o ácido linoleico, é pelo facto de esta família de ácidos gordos insaturados (ácido linoleico, ácido linolénico, ácido linoleico conjugado) ser cada vez mais importante nas pesquisas científicas que se dedicam a perceber como a nossa alimentação pode afectar o aparecimento de certas doenças. Como é do conhecimento geral, a sociedade actual preocupa-se cada vez mais com os efeitos que a dieta diária tem nos níveis de colesterol, nas doenças cardio-vasculares, no cancro e diabetes, o que leva a uma atenção redobrada por parte da comunidade científica.

É sabido que apesar de a gordura total ingerida ser de enorme importância, as complexas interacções dos constituintes individuais das gorduras têm um efeito considerável no organismo. De acordo com estudos recentes, as recomendações sugerem a redução da gordura total ingerida para 30% das calorias e a par disso, reduzir a ingestão de ácidos saturados e ácidos gordos poli-insaturados para 10%, e permitir ácidos gordos mono-insaturados a perfazer o restante. Simultaneamente, o colesterol deve ser limitado a 100mg/1000calorias, de modo a reduzir o risco de incidência de doenças coronárias.

O ácido linoleico é também designado por ómega-6, e é importante o seu consumo regular, pois é extremamente importante no desenvolvimento humano. Tem particular efeito na redução do colesterol total, no entanto, um consumo exagerado de ómega-6 pode fazer baixar em demasia o «colesterol bom». Razão pela qual o seu consumo deve ser monitorizado. O ácido linoleico existe nos cereais, peixes gordos e

óleos vegetais. Os seres humanos e outros animais, ao contrário das plantas não possuem as enzimas capazes de sintetizar o ácido linoleico (LA) e o ácido α -linolénico (LNA), logo, estes ácidos gordos essenciais devem ser obtidas através da dieta diária. O LA e LNA são dessaturados e deslocados através do fígado e na sua ausência ocorrem perturbações evidentes do metabolismo.

O ácido α -linolénico é considerado como ácido gordo essencial (EFA – Essential Fatty Acids) e possui várias funções bioquímicas, incluindo a formação de icosanoides importantes, incluindo leucotrienos e prostaglandinas, que são mediadores inflamatórios. O ácido linolénico existe em algumas sementes de plantas e é um dos ácidos gordos com maior teor em ómega-3, a sua deficiência, leva à falta de icosanoides. As dietas ricas em óleo vegetal ou em óleos derivados de peixe, levam também a uma inibição do desenvolvimento de tumores induzidos quimicamente em ratos de laboratório. Para além disso, estas substâncias demonstraram ser benéficas na redução do risco de certas doenças crónicas, em especial doenças cardiovasculares. Os ácidos gordos têm grande influência nos níveis de colesterol e na concentração das lipo-proteínas no sangue, que são os maiores factores de risco no desenvolvimento das doenças cardiovasculares.

Por sua vez, o ácido linoleico conjugado (CLA) é um ácido gordo poli-insaturado natural encontrado em produtos lácteos (em especial na gordura do leite) e na carne dos ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos) e em algumas fontes vegetais. A designação ácido linoleico conjugado é um termo que descreve isómeros geométricos do ácido linoleico. Ambos têm 18 átomos de carbono e duas ligações duplas, a única diferença é a localização dessas ligações duplas. Existem cerca de 28 combinações possíveis (isómeros) de CLA, mas o mais comum tem as ligações duplas no 9º e 11º átomos de carbono e é denominado *cis-9, trans-11* ou ácido ruménico. É formado no rúmen, como um primeiro intermediário da bio-hidrogenação do ácido linoleico, pela enzima ácido-linoleico-isomerase, proveniente da bactéria *Butyrivibrio Fibrisolvens*. A razão pela qual a quantidade de CLA é superior nos ruminantes é devido à hidrólise da gordura dentro do rúmen provocar uma maior produção de ácido linoleico. Esta substância tem sido associada à redução de gordura corporal, aumento do metabolismo e de massa muscular, mas as suas atribuições vão mais além. Tem sido indicado na protecção contra o cancro, no combate ao colesterol e no controlo da diabetes, para além de ser indicado com um possível antioxidante.

Sabe-se que certas gorduras provenientes da comida que ingerimos, encetam um papel importante no organismo humano, quer como fontes de energia bem como meio de transporte de vitaminas e sabores, influenciam um vasto leque de receptores de

membrana e enzimas e fornecem ácidos gordos bioactivos. Uma dieta normal proporciona uma vasta panóplia de ácidos gordos: saturados (palmítico, esteárico, mirístico), monoinsaturados (oleico) e poli-insaturados (linoleico e α -linolenico). Quando absorvidos, realizam funções primordiais: metabólicas, estruturais e reguladoras do organismo. São estas as principais razões para terem um efeito nos lípidos do plasma, colesterol e doenças cardiovasculares, bem como serem alvo de inúmeros estudos.

De modo a avaliar a capacidade anti-oxidativa de alguns antioxidantes fenólicos, através do método de calorimetria diferencial de varrimento, tomou-se como referência o ácido linoleico, que sendo uma gordura, sofrerá um processo de auto-oxidação. Será estudado o efeito que alguns antioxidantes terão na sua estabilização anti-oxidativa.

1.6 OBJECTIVOS DO TRABALHO

Os objectivos deste trabalho foram o estudo da capacidade anti-oxidativa de diferentes compostos, dois ácidos (protocatecuico e homo-protocatecuico) adquiridos em laboratórios comerciais e a sua comparação com três ésteres (etílico, metílico e propílico) sintetizados a partir de um deles (ácido protocatecuico), efectuando a avaliação da temperatura de indução de oxidação do ácido linoleico através de um DSC.

Foram analisados vários factores que poderiam influenciar o poder antioxidante dos compostos estudados, como por exemplo a concentração do antioxidante e o método de preparação das amostras.

1.7 ESTRUTURA DO RELATÓRIO

O relatório é composto por uma Parte Introdutória, contendo as bases que sustentam a investigação realizada e que serviram como suporte à Parte Experimental, que se segue. Nela estão contidas as descrições referentes aos procedimentos usados, incluindo reagentes, amostras, equipamento e breve descrição dos ensaios realizados.

Segue-se a Análise e Discussão de Resultados, em que são expostos os termogramas obtidos com a ajuda do software utilizado e em que se pretende justificar e comentar os resultados obtidos durante a investigação.

O relatório é finalizado com as Conclusões e Sugestões para Trabalhos Futuros, onde se efectua um desfecho com uma crítica final e apreciação da globalidade do trabalho científico, que originam as sugestões para a continuação desta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- L. A. Felton and Jing Yang, Khalid Shah, Hossein Omidian and Jose G Rocca, *A Rapid Technique to Evaluate the Oxidative Stability of a Model Drug*, University of New Mexico, 2007.
- García-Pérez Martha-Estrella, Diouf Papa Niokhor, Tatjana Stevanovic, Comparative study of antioxidant capacity of yellow birch twigs extracts at ambient and high temperatures, *Food Chemistry* 107 (2008) 344-351, 8 August 2007.
- C. A. Gomes, T. G. da Cruz, J. L. Andrade, N. Milhazes, F. Borges and M. Paula M. Marques, *Anticancer Activity of Phenolic Acids of Natural or Synthetic Origin: A Structure – Activity Study*, *J. Med. Chem* 2003. 46, 5395-5401.
- Hatano, T. Miyatake, H. Natsume, M., Osakabe, N., Takizawa, T., Ito, H., et al (2002). Proanthocyanidin glycosides and related polyphenols from cacao liquor and their antioxidant effects: *Phytochemistry*, 59, 749-758.
- D.Huang, Boxin Ou and Ronald L. Prior, *The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays*, *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 1841-1856.
- E. Klein, Vladimir Lukes, *DFT/B3LYP study of the substituent effect on the reaction enthalpies of the individual steps of sequential proton loss electron transfer mechanism of phenols antioxidant action: Correlation with phenolic C-O bond length*, *Journal of Molecular Structure: TEOCHEM* 805 (2007) 153-160.
- Kowalsski B., *Thermal-oxidative decomposition of edible oils and fats. SDC studies*. *Thermochimica Acta*, 184 (1991), 49-57.
- G. Litwinienko, T. Kaprzycka-Guttman, Maciej Studzinski, *Effects of Selected Phenol Derivatives on the Autoxidation of Linolenic Acid investigated by DSC non-isothermal methods*, Department of Chemistry, University of Warsaw, Poland, 8 September 1997.
- G. Litwinienko, T. Kaprzycka-Guttman, D. J Amanek, *DSC study of antioxidant properties of dihydroxyphenols*, *Thermochimica Acta* 331 (1999) 79-86.
- R. M. Loria and D. Pagett, *α -Linolenic acid prevents the hypercholesteremic effects of cholesterol addition to a corn oil diet*, *National Biochemistry* 8: 140-146, 1997.

R. Morrison, R. Boyd, Química Orgânica, 9ª Edição; Fundação Calouste Gulbenkian, 1990.

N. Paixão, Rosa Perestrelo; José C. Marques, José S. Câmara, Relationship Between Antio-Oxidant Capacity of Total Phenolic Content of Red, Rosé and White Wines, Food Chemistry 105 (2007) 201-214.

S. Renz, *Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do Tecido Animal, no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS*, pelo aluno SANDRO VOLNEI RENZ, no primeiro semestre de 2003. Professor Responsável: Félix H.D. González.

P. Silva, *Foto-Oxidação de Poliolefinas*, Tese de Doutoramento em Ciências e Engenharia de Polímeros, Universidade do Minho, Portugal, 2001.

Sobre este tema consultaram-se os seguintes sites:

<http://www.angelfire.com/ar/andret/oxired.html>, 12 Maio 2008

<http://www.doctorslounge.com/primary/articles/antioxidants/>, 12 Maio 2008

<http://www.eatwild.com/cla.html>, 11 Agosto 2008

http://www.estg.ipleiria.pt/files/313502_Electroquimic_43901d0c36119.pdf?swp_estg_website=32b452722cc94035316b4ec515990324, 10 Junho 2008

http://www.positivelycoffee.org/pt/topic_antioxidants_whatarethey.aspx, 10 Junho 2008

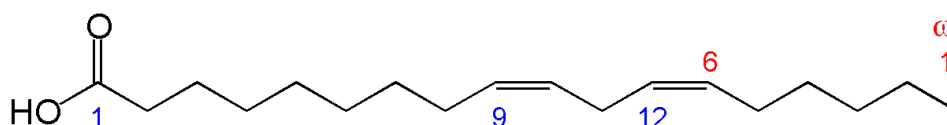
http://pt.wikipedia.org/Ácido_Linoléico_Conjugado, 11 Agosto 2008

http://pt.wikipedia.org/wiki/Estado_de_oxida%C3%A7%C3%A3o, 10 Junho 2008

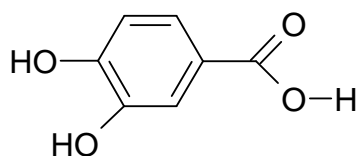
2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 REAGENTES

Ácido Linoleico fornecido por SIGMA-ALDRICH. Grau de pureza $\geq 99\%$. Numero CAS: 60-33-3. Para evitar a degradação, o ácido linoleico foi guardado no frigorífico a 4°C. Para a realização do trabalho foi retirada uma toma da embalagem original que era também ela armazenada no frigorífico e permanecia fora dele o menos tempo possível.

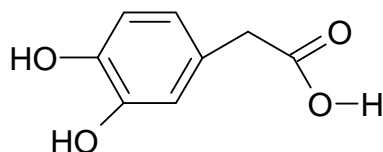


Ácido Protocatecuico (ácido 3,4 di-hidroxi-benzóico): PA, fornecido por SIGMA-ALDRICH. Grau de pureza $\geq 99\%$. Numero CAS: 99-50-03. Este composto foi utilizado no presente trabalho sem qualquer purificação prévia.



O Ácido Protocatecuico é um derivado do ácido benzóico proveniente de frutos e plantas comestíveis e tem um enorme poder antioxidante. A sua presença, mesmo em pequenas quantidades demonstra um grande poder na prevenção do cancro do cólon e carcinogénese oral em ratos de laboratório, tem um poder considerável na inibição da proliferação de algumas células cancerígenas.

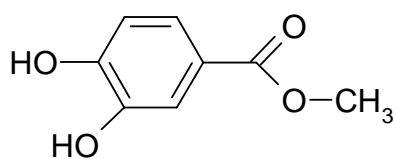
Ácido Homoprotocatecuico (ácido 3,4 di-hidroxi-fenil-acético): DOPA, fornecido por SIGMA-ALDRICH Grau de pureza $\geq 99\%$. Numero CAS: 102-32-9. O composto foi utilizado sem qualquer purificação prévia.



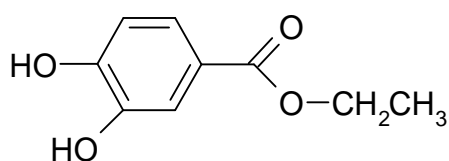
Acetona fornecida por Pronalab Grau de pureza $\geq 99\%$. Numero CAS: 67-64-1. O composto foi utilizado sem qualquer preparação prévia.

Ésteres sintetizados a partir da reacção entre o ácido protocatecuico e álcoois.

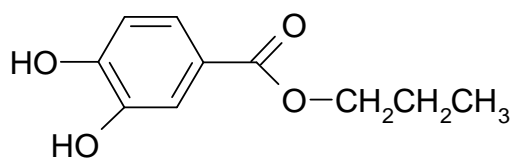
A síntese dos ésteres do ácido protocatecuico, resultou de uma reacção com os seguintes álcoois: etanol, metanol e propanol de forma a obter, respectivamente, o éster etílico, metílico e propílico. Esta reacção ocorreu em recipiente agitado durante cerca de 4 dias e realizou-se TLC de forma a controlar a reacção. Seguidamente foi efectuada a purificação/cristalização.



Éster Metílico – PM



Éster Etílico – PE



Éster Propílico - PP

2.2 EQUIPAMENTO

2.2.1 CALORÍMETRO DIFERENCIAL DE VARRIMENTO

As determinações foram efectuadas num calorímetro diferencial de varrimento da marca Netzsch modelo DSC 204, com controlador TASC 414/3A. O equipamento era monitorizado por computador usando o programa Netzsch DSC 204 Measurement versão 3.4. A introdução de gases na câmara do calorímetro era controlada por um conjunto de medidores de caudal, da marca Netzsch. Foram usados cadinhos de alumínio Netzsch para colocar as amostras de ácido linoleico e antioxidantes de modo a efectuar as determinações respectivas.

Este equipamento foi calibrado, os resultados constam da tabela 8 dos anexos.

2.2.2 BALANÇA ANALÍTICA

As soluções e cadinhos foram pesados numa balança analítica, marca Mettler e modelo AE240, com sensibilidade à centésima do miligrama.

2.2.3 MICROPIPETAS

Foram usadas micro-pipetas de 20 e 1000 μ l da marca Jencons.

2.3 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

2.3.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE ÁCIDO LINOLEICO

A amostra consistia em cerca de 5µl de ácido linoleico retirada através de micro-pipeta de 20µl, posteriormente pesada em balança analítica e colocada em cadinho de alumínio com tampa perfurada. Devido à viscosidade elevada do ácido linoleico, efectuou-se uma pesagem individual de cada amostra em balança analítica, de forma a evitar possíveis diferenças indesejáveis no peso das amostras que tinham sido, anteriormente, medidas com pipeta.

2.3.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE ANTIOXIDANTE

As soluções foram preparadas através da pesagem da quantidade de antioxidante determinada (cerca de 20mg), de forma que a concentração das soluções fosse próxima entre si, em balança analítica e posterior adição de 1000µl de acetona, medida com micro-pipeta. A escolha do solvente foi baseada em algumas referências bibliográficas que apontavam para a acetona como sendo capaz de solubilizar antioxidantes semelhantes aos utilizados neste trabalho (G. Litwinienko *et al.*). Na tabela 1 encontram-se indicados os valores das concentrações das soluções dos antioxidantes.

Tabela 1 – Preparação de soluções dos diferentes antioxidantes em acetona.

Antioxidante	Massa molecular (g/mol)	Massa (g)	Concentração (mol/L)
PA	154,1	18,67	$1,2 \times 10^{-7}$
DOPA	168,2	20,43	$1,2 \times 10^{-7}$
PM	148,0	17,13	$1,2 \times 10^{-7}$
PE	162,0	13,13	$0,8 \times 10^{-7}$
PP	176,0	20,58	$1,2 \times 10^{-7}$

2.3.3 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA DE ÁCIDO LINOLEICO COM ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTE

As misturas de ácido linoleico e antioxidantes foram preparadas directamente nos cadinhos de alumínio utilizados para a análise de DSC. Esta mistura era iniciada com a medição de 5µl de ácido linoleico ao qual eram adicionados diferentes volumes das soluções dos antioxidantes em acetona. Na tabela 2 apresentam-se os volumes das misturas preparadas bem como a concentração final do antioxidante no ácido linoleico.

Tabela 2 – Preparação das misturas do antioxidante com o ácido linoleico.

Massa de Ác. Linoleico ^a (mg)	Antioxidante	Volume de Antioxidante (µl)	Concentração (mol/L) ^b
4,0	PA	5	$1,4 \times 10^{-7}$
4,0	PA	10	$2,7 \times 10^{-7}$
4,0	PA	20	$5,4 \times 10^{-7}$
4,0	DOPA	5	$1,4 \times 10^{-7}$
4,0	DOPA	10	$2,7 \times 10^{-7}$
4,0	DOPA	20	$5,4 \times 10^{-7}$
4,0	PM	10	$2,6 \times 10^{-7}$
4,0	PE	10	$1,8 \times 10^{-7}$
4,0	PP	10	$2,7 \times 10^{-7}$

Notas: (a) valor aproximado da massa de ácido linoleico usado em cada ensaio (b) moles de antioxidante por litro de ácido linoleico.

2.4 CONDIÇÕES INSTRUMENTAIS

2.4.1 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA

Stand-By Inicial

Feito à temperatura ambiente (25°C) em atmosfera de N₂, para eliminar o O₂ da câmara calorimétrica.

Rampa de Temperatura

As amostras são aquecidas desde a temperatura ambiente até à temperatura de 400°C, com uma velocidade de 5K.min⁻¹, em atmosfera de azoto (caudal de 20ml.min⁻¹).

2.4.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA

Stand-By Inicial

Feito à temperatura ambiente (25°C) em atmosfera de O₂.

Rampa de Temperatura

As amostras são aquecidas desde a temperatura ambiente até à temperatura de 220°C, com uma velocidade de 5K.min⁻¹, em atmosfera de oxigénio (caudal de 50ml.min⁻¹).

2.5 ENSAIOS EFECTUADOS

2.5.1 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DOS ANTIOXIDANTES

Ensaio efectuado em atmosfera de azoto, colocando cerca de 4mg de antioxidante em cadinho de alumínio com tampa perfurada.

2.5.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA DOS ANTIOXIDANTES

Foram efectuados ensaios em atmosfera de oxigénio colocando cerca de 4mg de antioxidante em cadinho de alumínio com tampa perfurada.

2.5.3 ANÁLISE DA ESTABILIDADE TÉRMICA DO ÁCIDO LINOLEICO

Para o estudo da termo-estabilidade do ácido linoleico foram realizados ensaios termo-gravimétricos pesando cerca de 4mg (aproximadamente 5 μ l) de ácido linoleico em cadinho de alumínio com tampa perfurada em atmosfera de azoto.

2.5.4 ANÁLISE DA ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA DO ÁCIDO LINOLEICO

Para o estudo da termo-estabilidade do ácido linoleico foram realizados ensaios termo-gravimétricos pesando cerca de 4mg (aproximadamente 5 μ l) de ácido linoleico em cadinho de alumínio com tampa perfurada em atmosfera de oxigénio.

2.5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SOLVENTE NA TERMO-OXIDAÇÃO DO ÁCIDO LINOLEICO

Foram efectuados ensaios de termo-oxidação (em atmosfera de oxigénio), colocando cerca de 4mg (aproximadamente 5 μ l) de ácido linoleico, em cadinho de alumínio com tampa perfurada. Seguidamente, foram repetidos estes ensaios com a adição do solvente – acetona, de forma a garantir que não ocorreria qualquer tipo de influência deste composto na estabilidade do ácido linoleico.

2.5.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS NA TERMO-OXIDAÇÃO DO ÁCIDO LINOLEICO

Foram efectuados ensaios de termo-oxidação, em atmosfera de oxigénio, colocando cerca de 4mg (aproximadamente 5 μ l) de ácido linoleico e 10 μ l de acetona, em cadinho de alumínio fechado e perfurado, após evaporação da acetona.

Os ensaios realizaram-se após diferentes tempos de espera para evaporação da acetona: 1, 24, 48 e 72h de forma a verificar como influíam na estabilidade do ácido linoleico. É indesejável uma auto-oxidação antes da análise em si. Através destes ensaios foi possível determinar qual o tempo de espera adequado, seleccionando aquele cujo termograma representativo indique que não ocorre oxidação do ácido linoleico, e simultaneamente acontece a evaporação do solvente.

2.5.7 ANÁLISE DO EFEITO DOS ANTIOXIDANTES NA ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA DO ÁCIDO LINOLEICO

Para o estudo da influência do efeito destes antioxidantes fez-se análise comparativa da oxidação do ácido linoleico sem antioxidante e com a adição de soluções dos diferentes antioxidantes previamente solubilizados em acetona.

2.5.8 ANÁLISE DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES NA ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA DO ÁCIDO LINOLEICO

Efectuou-se a análise comparativa do efeito dos antioxidantes: PA e DOPA, quando adicionados ao ácido linoleico em diferentes proporções: 5, 10, 20 μ l, correspondentes às seguintes concentrações: 1,4; 2,7 e 5,4 $\times 10^{-7}$ mol/litro (mol de antioxidante por litro de ácido linoleico), respectivamente. Estas quantidades eram adicionadas a cerca de 4mg (aproximadamente 5 μ l) de ácido linoleico e colocadas em cadinho de alumínio com tampa perfurada.

3. ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

3.1 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TÉRMICA DOS ANTIOXIDANTES

No início do trabalho realizou-se o estudo da estabilidade térmica e termo-oxidativa dos diversos antioxidantes. A estabilidade térmica foi estudada desde os 25°C até aos 400°C, em atmosfera de azoto com uma rampa de 5°C/min.

O termograma, em atmosfera de azoto, do PA (figura 1) apresenta 3 picos bem definidos, o primeiro ocorre aos 85°C (temperatura de pico), o segundo aos 204°C e o terceiro aos 245°C, em ambos os ensaios os resultados são semelhantes revelando uma boa repetibilidade da técnica analítica.

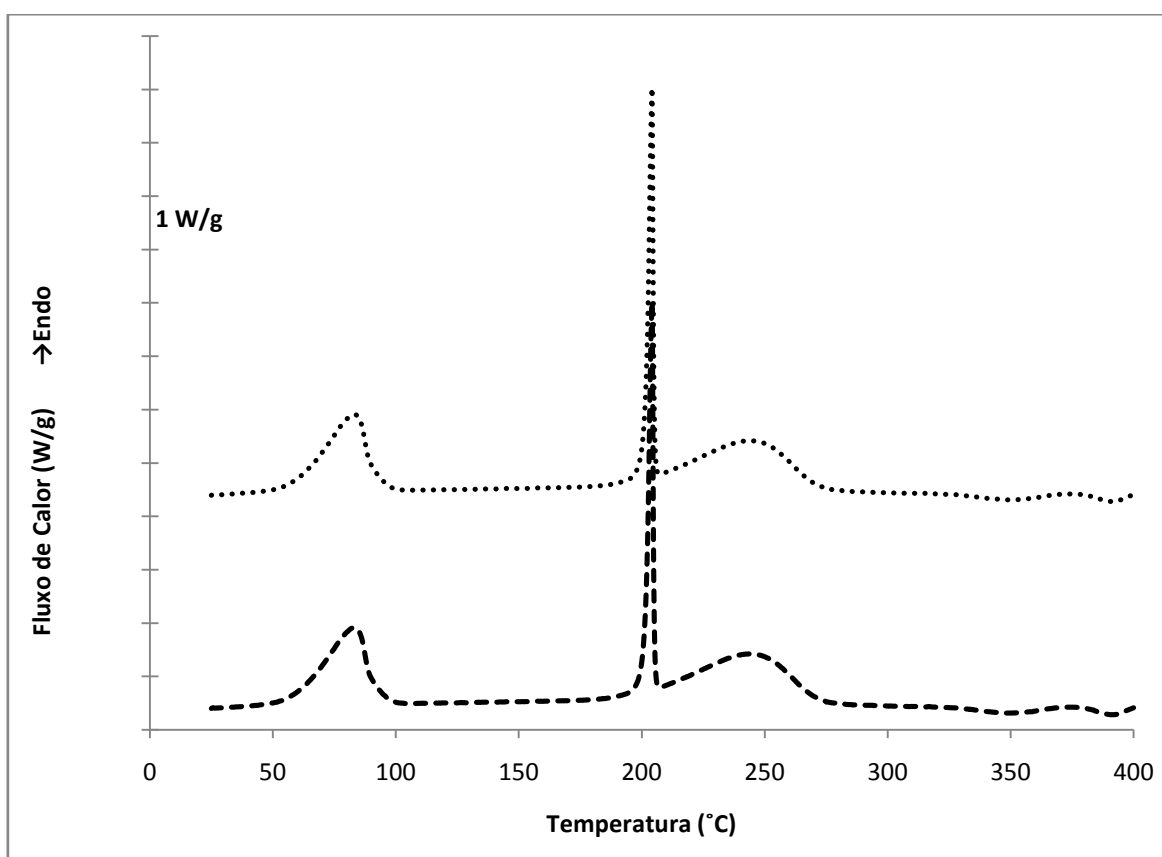


Figura 1 – Estabilidade térmica do PA (2 ensaios em diferentes tomas de amostra). Varrimento desde os 25°C até ao 400°C com uma rampa de 5°C/min em atmosfera de azoto (20 ml/min).

Outros parâmetros dos termogramas são apresentados na tabela 16 em anexos, nomeadamente o *onset* e *endpoint* de cada um dos picos, a sua área, altura e largura.

Estes parâmetros são dados relevantes para a caracterização dos materiais em estudo. Neste caso, os picos são bem definidos, sendo que o primeiro pico deverá corresponder à desidratação do composto (transformação endotérmica). O pico evidenciado aos 204°C é consequência da fusão do PA. Após o pico de fusão, surge um novo acontecimento endotérmico, que se estende por um intervalo de temperaturas alargado (*onset* a 212°C *endpoint* a 271°C) a, que deverá corresponder à descarboxilação do antioxidante.

Na figura 2 apresentam-se dois termogramas do DOPA em atmosfera de azoto. Como se pode verificar através da análise do termograma e com a ajuda da tabela 17 dos anexos, existem dois picos, o primeiro ocorre aos 129°C e o segundo aos 273°C (temperaturas de pico).

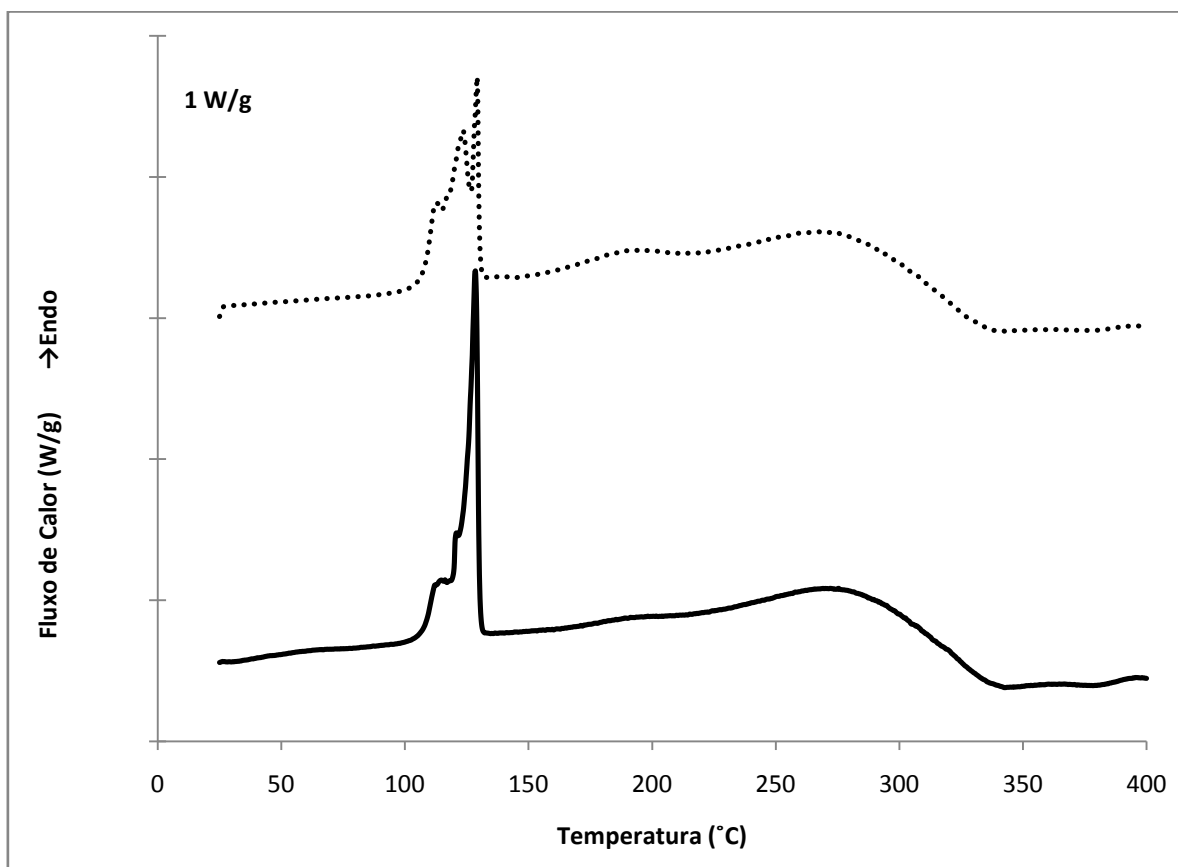


Figura 2 – Estabilidade térmica do DOPA (2 ensaios em diferentes tomas de amostra). Varrimento desde os 25°C até ao 400°C com uma rampa de 5°C/min em atmosfera de azoto (20 ml/min).

O primeiro pico não apresenta uma boa definição, o que nos leva a suspeitar da possível presença de algumas impurezas, podemos prever que este pico se refere à fusão do composto. O segundo pico surge a uma temperatura semelhante ao observado para o terceiro pico do PA (figura 1). Em ambos os casos este evento térmico deve corresponder à descarboxilação do antioxidante. Neste caso, e ao contrário do que se observava para

o PA, a fusão e descarboxilação encontram-se muito mais separadas em virtude deste composto fundir a uma temperatura pouco acima dos 100°C.

Seguidamente, estudou-se a estabilidade térmica dos antioxidantes do grupo dos ésteres. O termograma, em atmosfera de azoto, do éster metílico do ácido protocatecuico é apresentado na figura 3. Como se pode verificar no termograma, e com a ajuda da tabela 18 dos anexos, existe um pico bem definido e posteriormente ocorre uma perturbação.

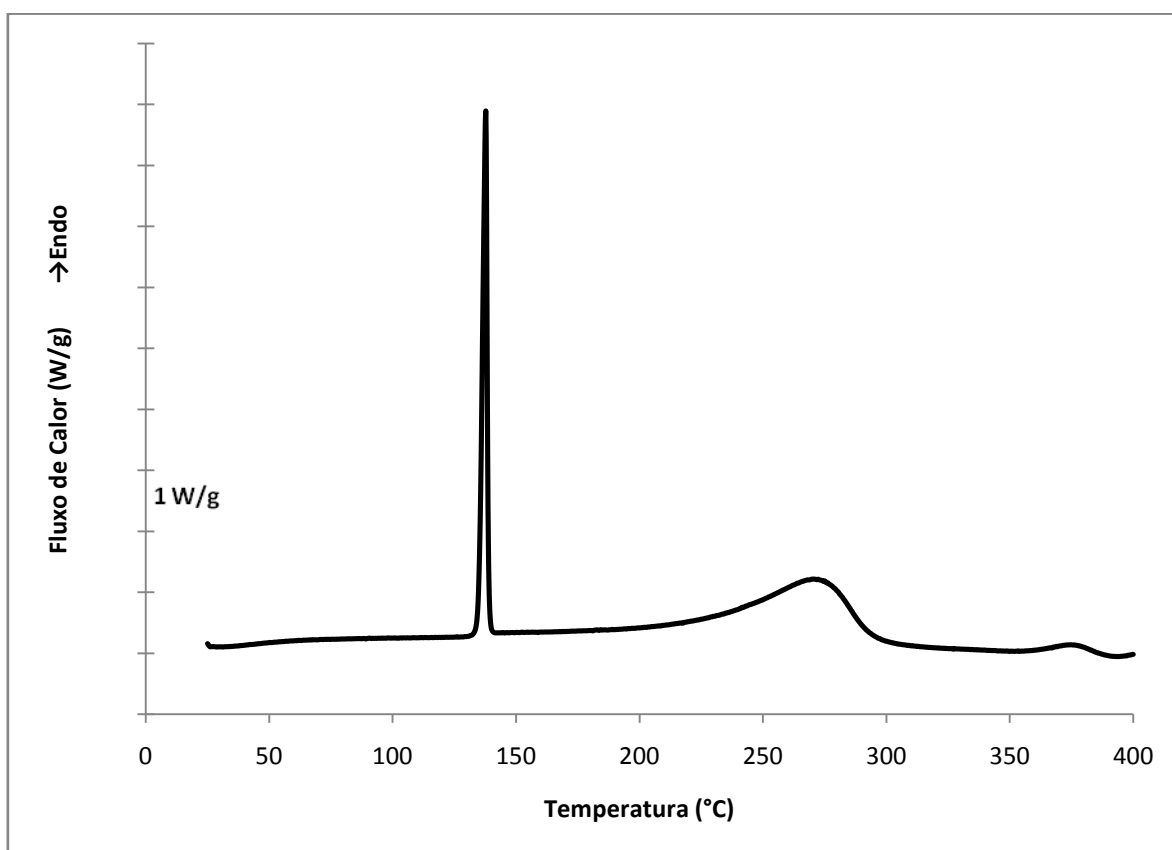


Figura 3 – Estabilidade térmica do PM. Varrimento desde os 25°C até ao 400°C com uma rampa de 5°C/min em atmosfera de azoto (20 ml/min).

O pico extremamente bem definido ocorre aos 138°C, sendo que o seu *onset* ocorre aos 135°C e o *endpoint* aos 139°C e corresponde à fusão do material, que é um fenómeno endotérmico. Existe uma perturbação aos 275°C, como consequência da absorção de energia resultante da eventual quebra de ligações do material, correspondendo a uma termodegradação. Tal como no caso dos ácidos anteriormente estudados este fenómeno deverá corresponder à descarboxilação do antioxidante.

Posteriormente, foi efectuado o termograma representativo da estabilidade térmica do éster etílico do ácido protocatecuico (PE). O resultado obtido encontra-se

representado na figura 4. Pela análise da tabela 19 dos anexos evidencia-se a ocorrência de um pico bem definido aos 135°C.

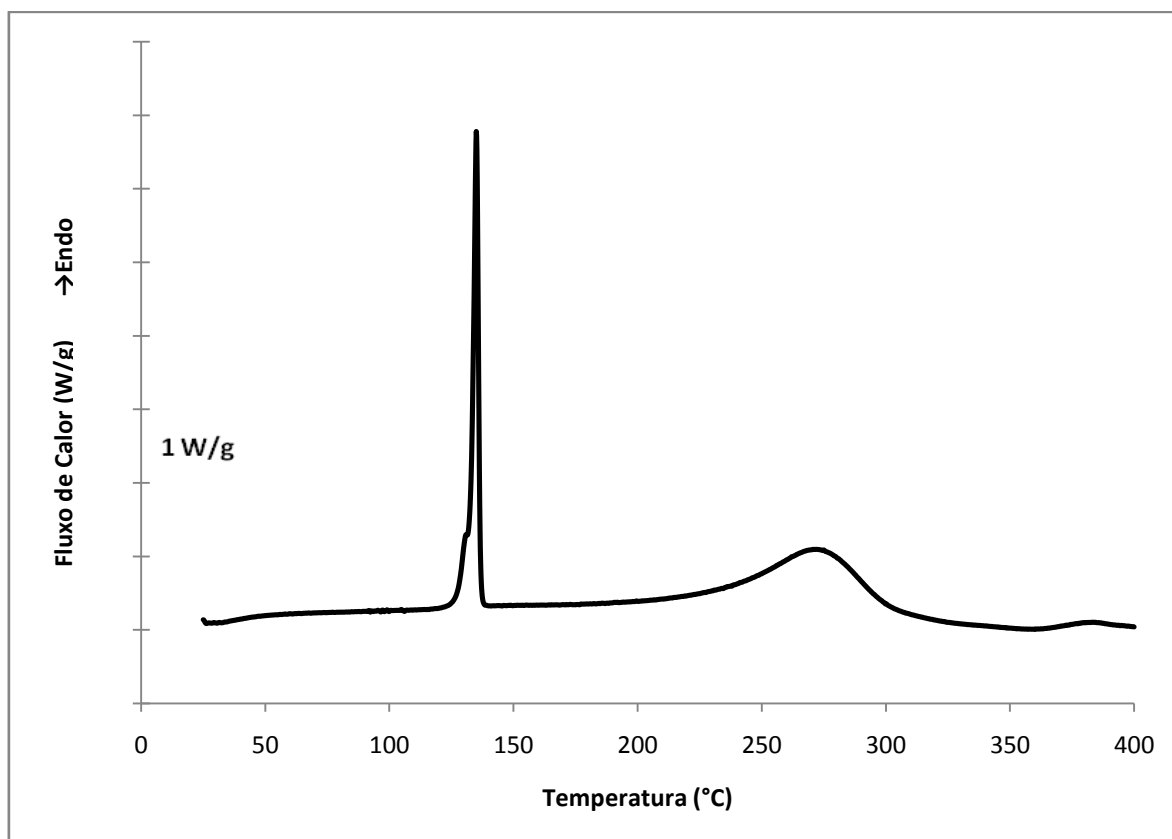


Figura 4 – Estabilidade térmica do PE. Varrimento desde os 25°C até ao 400°C com uma rampa de 5°C/min em atmosfera de azoto (20 ml/min).

Pela análise do gráfico representativo da estabilidade térmica do PE, deduz-se que o primeiro pico bem definido aos 135°C (temperatura de pico) corresponde à fusão do material. Verifica-se também a perturbação aos 272°C que poderá ser consequência da quebra de ligações, em que ocorre absorção de energia, depreende-se que se verifica a descarboxilação do composto a essa temperatura.

Analisou-se, de seguida, o termograma representativo do estudo da estabilidade térmica do PP (figura 5). Pela consulta da tabela 20 dos anexos verifica-se a ocorrência de um pico e seguidamente uma perturbação, como aconteceu nos restantes ésteres do ácido protocatecuico anteriormente analisados.

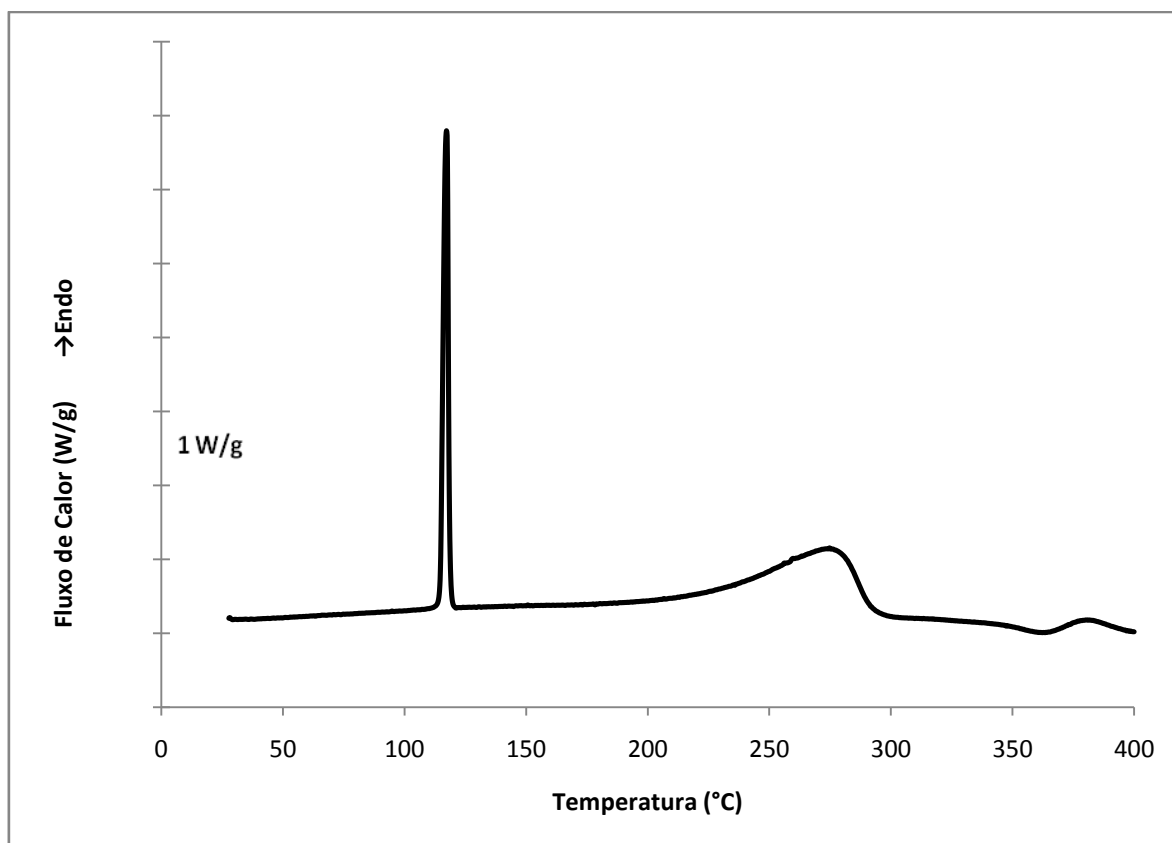


Figura 5 – Estabilidade térmica do PP. Varrimento desde os 25°C até ao 400°C com uma rampa de 5°C/min em atmosfera de azoto (20 ml/min).

A fusão deste éster propílico do ácido protocatecuico ocorre aos 117°C. É um pico com boa definição, tal como acontece nos ésteres metílico e propílico do ácido protocatecuico (PE e PM). Aos 275°C ocorre uma ligeira irregularidade, que poderá ser resultante de um fenómeno de descarboxilação.

Uma comparação dos resultados do estudo da termo-estabilidade dos antioxidantes analisados é apresentada na tabela 3.

Tabela 3 – Avaliação da estabilidade térmica dos antioxidantes em atmosfera de azoto.

	PA	DOPA	PM	PE	PP
Pico de fusão (°C)	204	129	138	135	117
Temperatura de degradação (°C)	245	272	275	272	275

A introdução de um grupo CH₂ entre o anel benzénico e o grupo ácido tem uma expressiva influência na temperatura de fusão. A temperatura de fusão do PA é significativamente superior à do DOPA. A degradação térmica dos compostos ácidos

acontece a uma temperatura relativamente próxima mas a do PA é inferior à observada para o DOPA. Para o PA observa-se a particularidade de os fenómenos de fusão e de descarboxilação serem muito próximos um do outro em termos de temperatura. Como o DOPA tem uma temperatura de fusão muito inferior, para este composto não existe uma proximidade tão grande na ocorrência destes dois fenómenos.

Relativamente aos ésteres do ácido protocatecuico, salientam-se as enormes semelhanças entre os três termogramas. No entanto as temperaturas de fusão não são afectadas pelo crescimento do radical do grupo éster. Como seria de esperar a temperatura de fusão vai baixando com o aumento do radical do grupo éster. Este efeito é mais notado ao passar do éster etílico para o éster propílico. Em termos de termoestabilidade, os ésteres testados apresentam comportamentos muito semelhantes. Nas condições de ensaio, em todos eles ocorre descarboxilação na gama de temperaturas 250-300°C. A este fenómeno corresponde um pico entre os 272 e os 275°C. Observa-se ainda que a termo-estabilidade dos ésteres é muito próxima do DOPA e superior ao observado para o PA, que se revela o antioxidante com mais baixa estabilidade térmica.

3.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA DOS ANTIOXIDANTES

Para avaliar a estabilidade termo-oxidativa dos antioxidantes foram realizados ensaios de DSC desde a temperatura ambiente (25°C) até aos 220°C, na presença de uma corrente de oxigénio com um caudal de 50ml/min. Tal como nos ensaios de termo-estabilidade usou-se uma rampa de 5°C/min.

A figura 6 representa a estabilidade oxidativa do PA, em que se pode assinalar a presença de dois picos endotérmicos, um aos 85°C e outro aos 204°C.

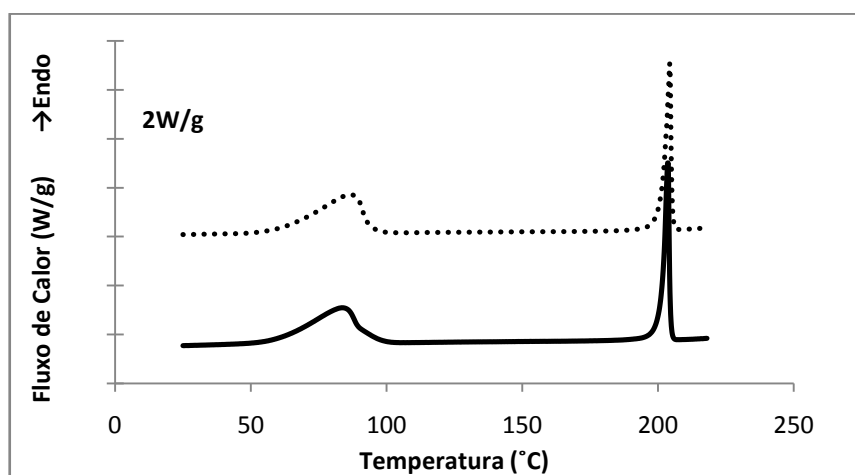


Figura 6 – Estabilidade oxidativa do PA (2 ensaios em diferentes tomas de amostra). Varrimento desde os 25°C até aos 220°C, com uma rampa de temperatura de 5°C/min, em atmosfera de oxigénio (50 ml/min).

Pela análise do termograma acima representado, prevê-se que o pico que ocorre aos 85°C corresponde à desidratação do PA, enquanto o pico posterior, cuja temperatura de pico é 204°C é indicativo da fusão do material em estudo.

Para uma melhor análise dos fenómenos ocorridos, estudaram-se os termogramas resultantes dos ensaios efectuados em atmosfera de oxigénio e em atmosfera de azoto (figura 7).

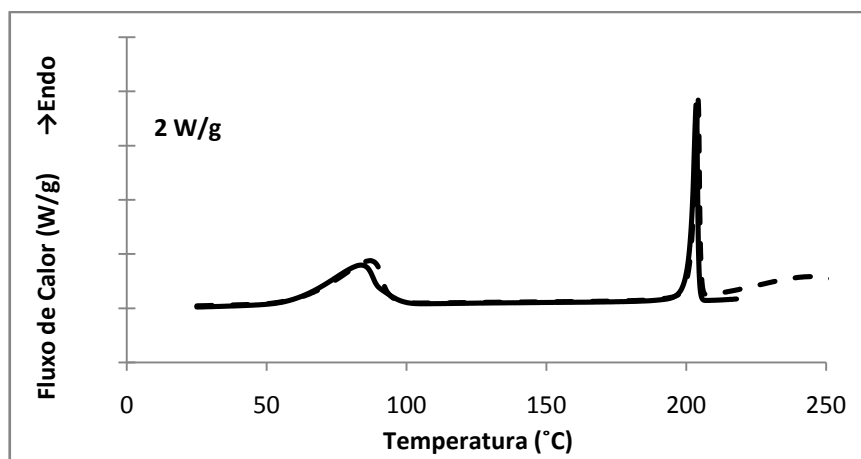


Figura 7 – Comparação da estabilidade térmica (----) com a estabilidade termo-oxidativa (—) do PA.

Pode-se verificar que os dois picos existentes no termograma representativo do estudo da estabilidade termo-oxidativa também surgem no gráfico referente à análise da estabilidade térmica. Não ocorrendo qualquer outro fenómeno térmico até aos 220°C, deduz-se que não ocorre oxidação do PA no intervalo de temperaturas e nas condições utilizadas durante o ensaio.

No termograma da figura 8 apresentam-se dois ensaios da estabilidade termo-oxidativa do DOPA. É evidente a ocorrência de um pico representativo da fusão do composto aos 128°C (temperatura de pico). Existe uma ligeira depressão que inicia aos 190°C e que deverá ser indicativa de oxidação do material, nestas condições.

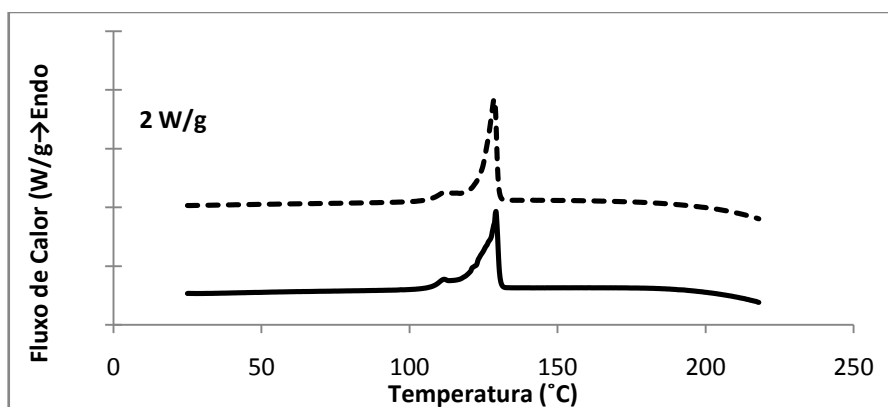


Figura 8 – Estabilidade oxidativa do DOPA (2 ensaios em diferentes tomas de amostra). Varrimento desde os 25°C até aos 220°C, com uma rampa de temperatura de 5°C/min, em atmosfera de oxigénio (50 ml/min).

Através da sobreposição dos termogramas efectuados em atmosfera de oxigénio e em atmosfera de azoto (figura 9) torna-se evidente que o DOPA oxida claramente para

temperaturas acima dos 200°C pois a depressão que ocorre no termograma representativo da estabilidade termo-oxidativa, não é evidente no termograma referente à estabilidade térmica.

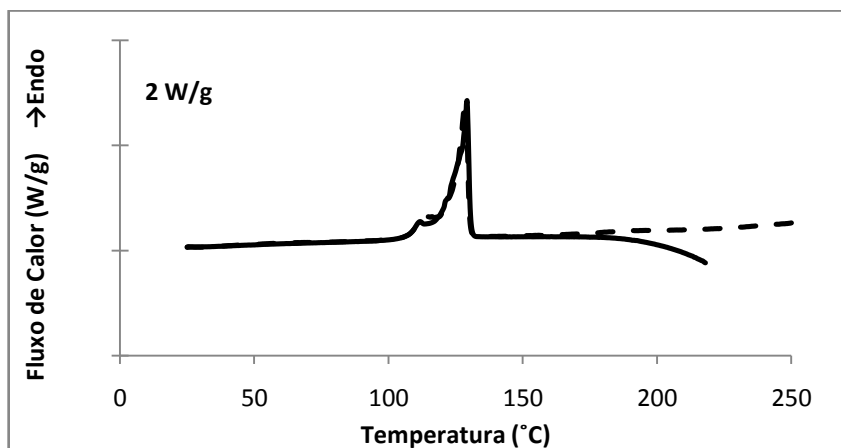


Figura 9 – Comparação da estabilidade térmica (----) com a estabilidade termo-oxidativa (—) do DOPA.

Nas condições testadas, a partir dos 175°C já ocorre oxidação do DOPA.

Na figura 10 encontra-se representada a estabilidade termo-oxidativa do éster metílico do ácido protocatecuico.

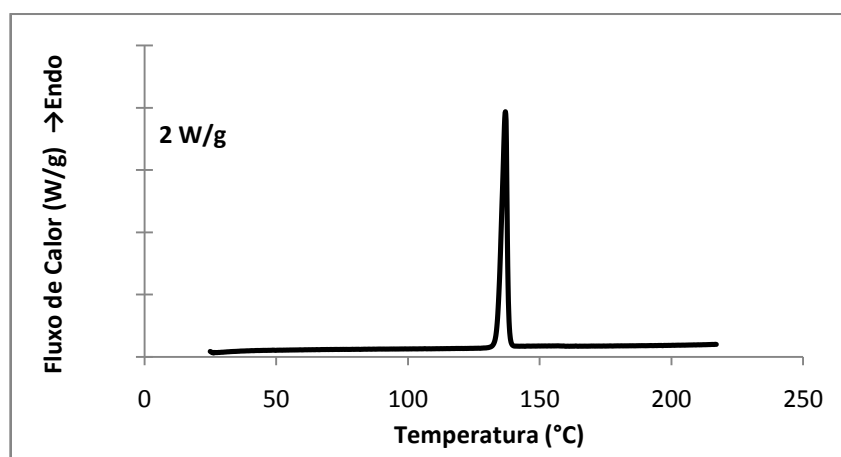


Figura 10 – Estabilidade termo-oxidativa do PM. Varrimento desde os 25°C até aos 220°C, com uma rampa de temperatura de 5°C/min, em atmosfera de oxigénio (50 ml/min).

Em atmosfera de oxigénio, o termograma representativo da estabilidade termo-oxidativa do PM, apresenta um pico endotérmico, característico de um fenómeno de fusão, à temperatura de 138°C (temperatura de pico). Não é observado qualquer outro fenómeno de cariz térmico na escala de temperaturas estudada.

Através da sobreposição do termograma representativo da estabilidade térmica e o termograma representativo da estabilidade oxidativa (figura 11), verifica-se a ocorrência do pico referente à fusão do composto aos 138°C, em ambos, sendo que não ocorre oxidação do PM na gama de temperaturas estudada.

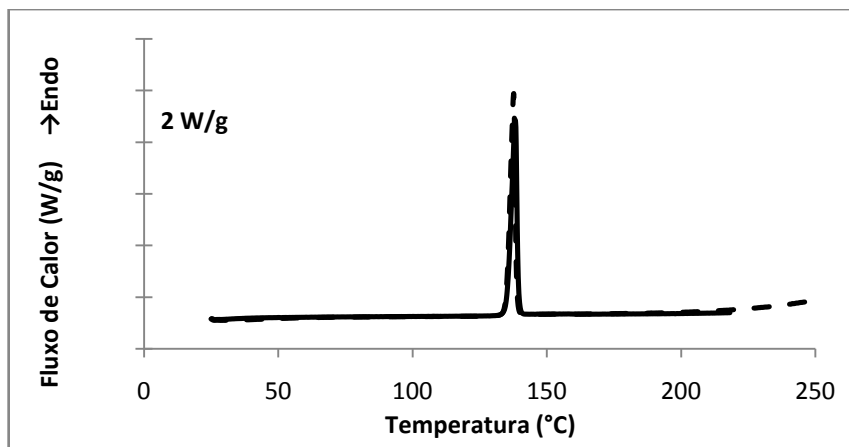


Figura 11 – Comparação da estabilidade térmica (----) com a estabilidade termo-oxidativa (—) do PM.

Da análise da figura 11, conclui-se que a alteração do gás no interior do calorímetro não provoca qualquer alteração no pico de fusão do material.

Na figura 12 apresenta-se o termograma do PE em atmosfera de oxigénio. O espectro térmico apresenta um pico representativo da sua fusão aos 135°C, como se pode verificar na tabela 19 dos anexos. A sua altura é de cerca de 5mW/mg. Não ocorre qualquer outro fenómeno térmico até aos 250°C.

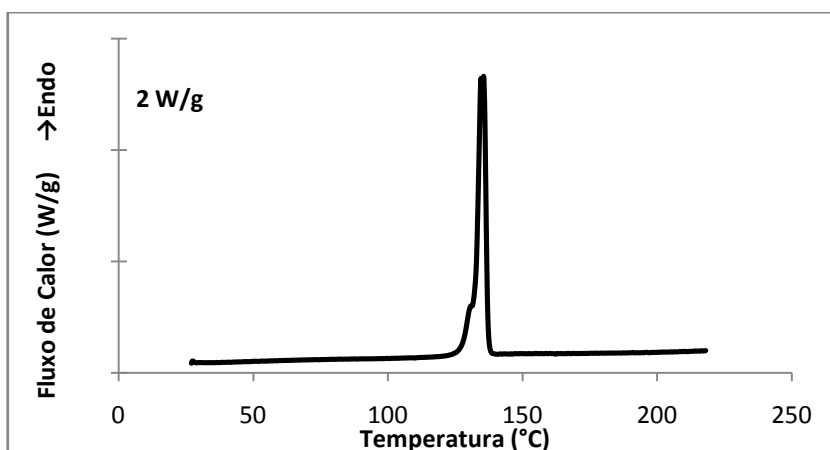


Figura 12 – Estabilidade termo-oxidativa do PE. Varrimento desde os 25°C até aos 220°C, com uma rampa de temperatura de 5°C/min, em atmosfera de oxigénio (50 ml/min).

Da análise da figura 12, pode concluir-se que o PE é um composto estável, em termos térmicos, quando submetido a uma atmosfera de oxigénio e a altas temperaturas.

Através da sobreposição dos termogramas em atmosfera de oxigénio e de azoto (figura 13), observa-se uma sobreposição do pico representativo da fusão do composto.

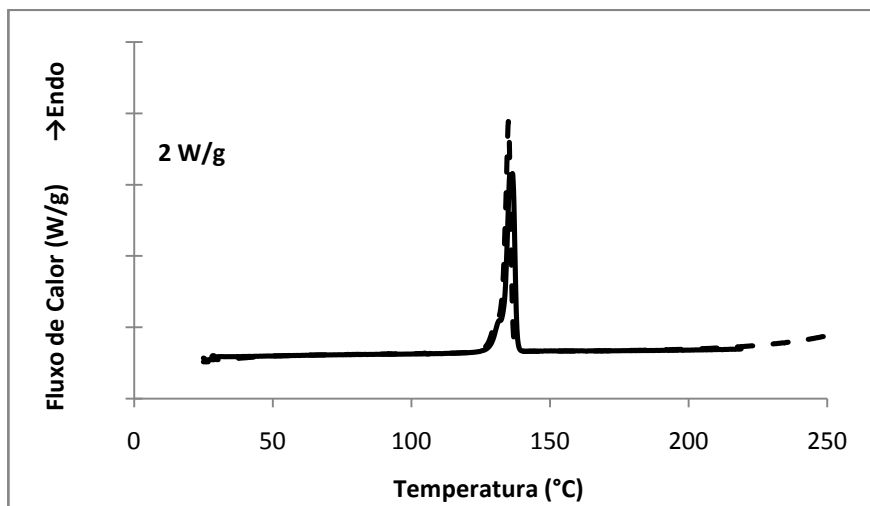


Figura 13 – Comparação da estabilidade térmica (----) com a estabilidade termo-oxidativa (—) do PE.

Pode-se concluir-se, pela comparação da estabilidade térmica com a estabilidade termo-oxidativa, que não ocorre auto-oxidação do PE até à temperatura estudada (220°C). Ao efectuar-se a análise do termograma representativo da estabilidade oxidativa do éster propílico do ácido protocatecuico (figura 14), verifica-se somente a existência de um pico bem definido aos 117°C.

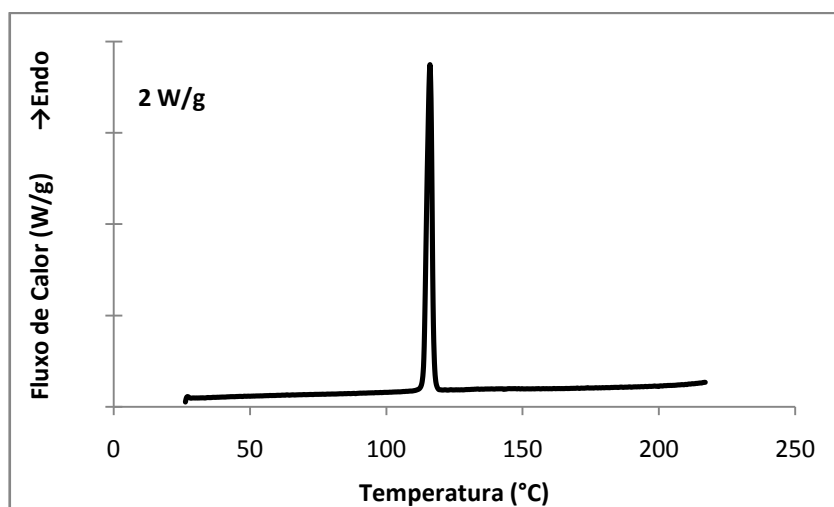


Figura 14 – Estabilidade termo-oxidativa do PP. Varrimento desde os 25°C até aos 220°C, com uma rampa de temperatura de 5°C/min, em atmosfera de oxigénio (50 ml/min).

Pelo estudo da estabilidade termo-oxidativa do PP, para além da fusão do composto, não é detectável qualquer outro fenómeno térmico na gama de temperaturas estudada.

Pela sobreposição dos termogramas em atmosfera de oxigénio e em atmosfera de azoto, comprova-se a ocorrência de um pico alusivo à fusão do PP.

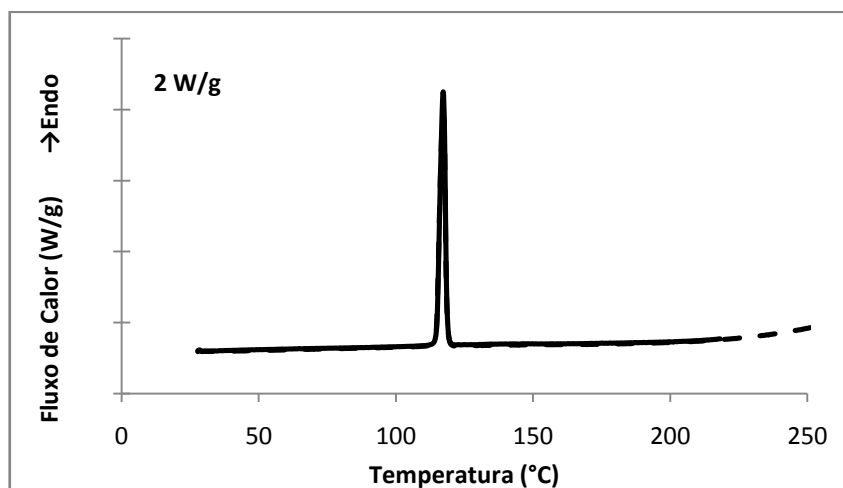


Figura 15 – Comparação da estabilidade térmica (----) com a estabilidade termo-oxidativa (—) do PP.

Pela análise da figura 15, verifica-se que o PP funde à temperatura de 117°C e desde os 25°C até aos 220°C não ocorre oxidação do éster.

Efectuando uma análise geral comparativa entre a estabilidade térmica e a estabilidade termo-oxidativa dos cinco antioxidantes, verifica-se que, nas condições testadas, até aos 220°C apenas o DOPA demonstra tendência para se oxidar na presença de atmosfera de oxigénio, essa oxidação surge logo acima dos 175°C mas é especialmente notória a partir dos 200°C.

3.3 ANÁLISE DA ESTABILIDADE TÉRMICA DO ÁCIDO LINOLEICO

O ácido linoleico tem temperatura de fusão de -11°C e à temperatura ambiente apresenta-se na forma de líquido transparente. Ao submetermos o ácido linoleico a uma rampa de temperatura desde os 25°C aos 400°C , a $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, em atmosfera de azoto é possível estudar a sua estabilidade térmica. Dois termogramas efectuados deste modo são apresentados na figura 16.

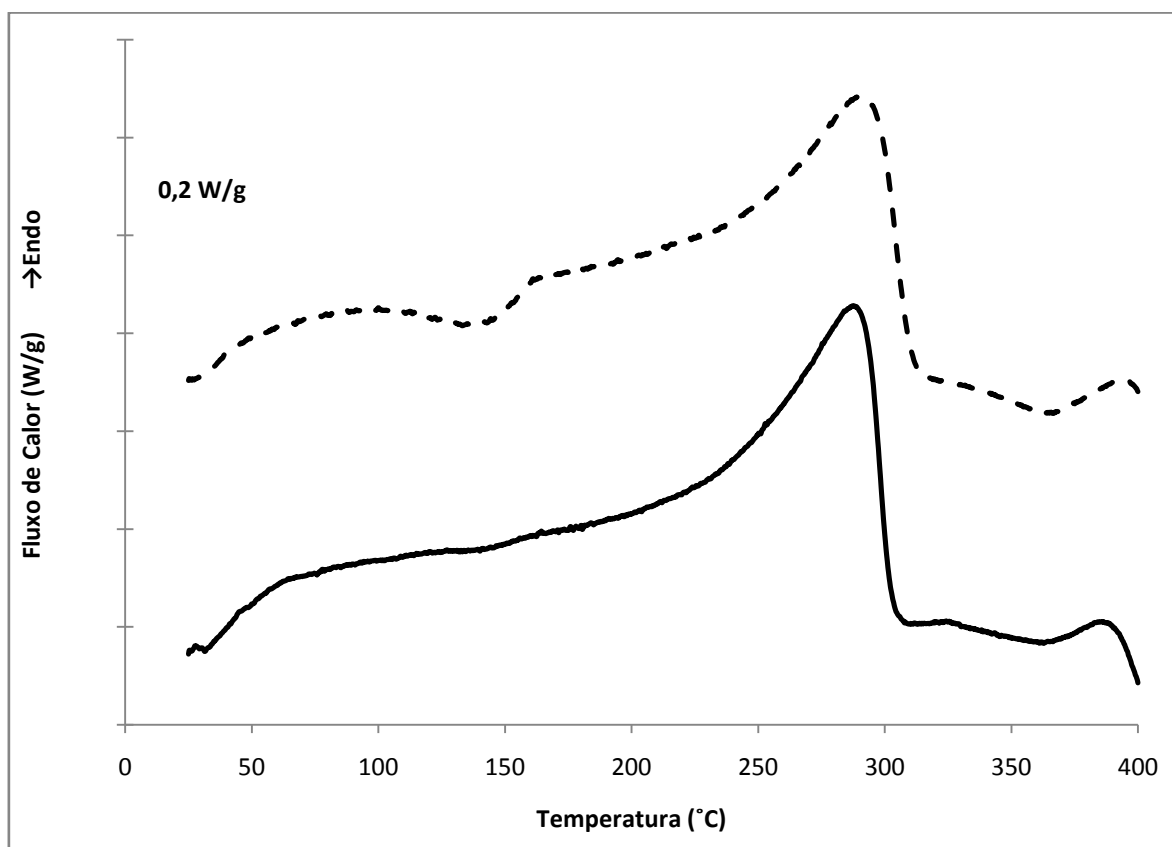


Figura 16 – Estabilidade térmica do ácido linoleico (dois ensaios em diferentes tomas de amostra). Varrimento desde os 25°C até ao 400°C com uma rampa de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ em atmosfera de azoto ($20\text{ ml}/\text{min}$).

Nos termogramas acima apresentados (figura 16), observa-se a existência de um evento térmico com uma temperatura de pico a rondar os 280°C e que se deverá à evaporação do composto. Esse pico é bastante largo, sendo difícil determinar correctamente a sua temperatura de *onset*. No entanto é claro que a absorção de calor só é significativa acima dos 200°C . Este dado permite-nos concluir que o estudo da oxidação do ácido linoleico a temperaturas muito elevadas não será viável para a análise e comparação da capacidade antioxidante dos compostos em ensaio. Esta análise acabou por ser fundamental para a

selecção da temperatura máxima a que se estudará a oxidação do ácido linoleico estabilizado com os antioxidantes testados neste trabalho.

3.4 ANÁLISE DA ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA DO ÁCIDO LINOLEICO

Para avaliar o efeito dos polifenóis anteriormente descritos como antioxidantes vai-se avaliar a capacidade destas espécies químicas limitarem ou retardarem a oxidação do ácido linoleico. Neste estudo começou por se estudar a oxidação do ácido linoleico em atmosfera de oxigénio, registando os efeitos térmicos associados a essa transformação. A oxidação é um processo exotérmico em que ocorre libertação de calor, o DSC mede as trocas de calor que ocorrem quando se submete o ácido linoleico às condições de ensaio determinadas anteriormente. Verifica-se assim, que esta gordura essencial é oxidada nas condições acima descritas. Ao efectuar-se o estudo da estabilidade termo-oxidativa, apresentado na figura 17, verifica-se que ocorre uma depressão evidente, que tem o seu início aos 106°C, a esse ponto denomina-se Temperatura de Indução de Oxidação e consta da tabela 21 dos anexos. Estes termogramas apresentam uma curva com um ponto de inflexão aos 123°C.

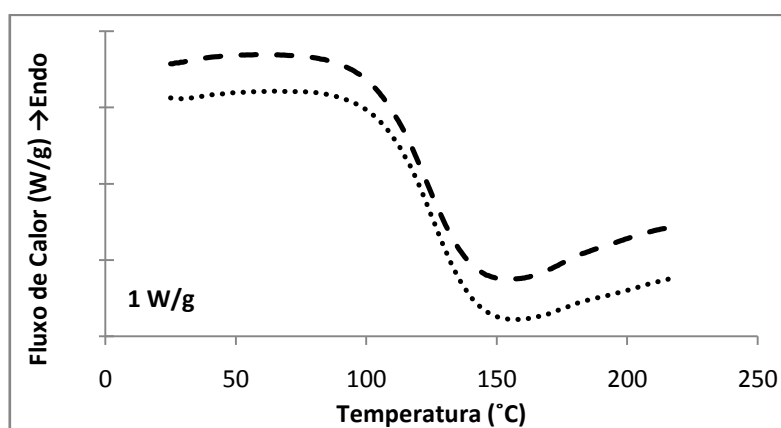


Figura 17 – Estabilidade oxidativa do ácido linoleico (dois ensaios em diferentes tomas de amostra). Varrimento desde os 25°C até ao 220°C com uma rampa de 5°C/min em atmosfera de azoto (50 ml/min).

A comparação deste resultado com a análise da termo-oxidação do ácido linoleico na presença das espécies antioxidantes vai permitir avaliar e confrontar a capacidade desses compostos para evitar a oxidação.

A figura 18 representa uma comparação da estabilidade térmica com a estabilidade termo-oxidativa do ácido linoleico.

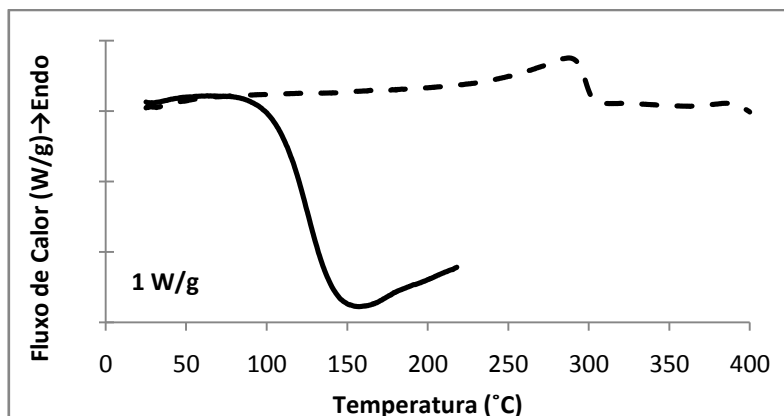


Figura 18 – Comparação da estabilidade térmica (----) com a estabilidade oxidativa (—) do ácido linoleico.

Através da sobreposição do gráfico representativo do estudo da estabilidade térmica com aquele que representa a estabilidade oxidativa do ácido linoleico, verifica-se que numa atmosfera inerte não ocorre a depressão a partir dos 106°C, que se verifica numa atmosfera de oxigénio. Este facto corrobora a anterior análise em que se prevê que esta depressão seja provocada pela oxidação do ácido linoleico. Esta comparação permite-nos, ainda, concluir que o evento térmico da vaporização do ácido linoleico não se vai sobrepor ao processo de oxidação, uma vez que ocorre a uma temperatura muito mais elevada.

O facto da oxidação do ácido linoleico ocorrer na gama de temperaturas 25-250°C, de uma forma bem definida e significativa, vai-nos permitir avaliar a capacidade que os antioxidantes terão na limitação do processo de oxidação.

3.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO SOLVENTE NA TERMO-OXIDAÇÃO DO ÁCIDO LINOLEICO

Antes de incorporar o antioxidante no ácido linoleico foram preparadas soluções dos antioxidantes em acetona, estas soluções eram depois adicionadas aos cerca de 4mg (aproximadamente 5 μ l) de ácido linoleico previamente colocado em cadinho de alumínio. Revelou-se, por isso, importante verificar a possível influência da acetona na oxidação do ácido linoleico. Para avaliar se o solvente escolhido para solubilizar os antioxidantes influiria na estabilidade do ácido linoleico foram efectuados ensaios termo-oxidativos sobre o ácido linoleico, com e sem acetona. Em cadinhos com ácido linoleico (cerca de 4mg) eram adicionados 10 μ l de acetona, sem colocar a tampa. Os cadinhos foram deixados à temperatura ambiente durante cerca de uma hora, agitando-os regularmente com movimentos circulares. Os termogramas comparativos da termo-oxidação do ácido linoleico com e sem acetona estão evidenciados na figura 19.

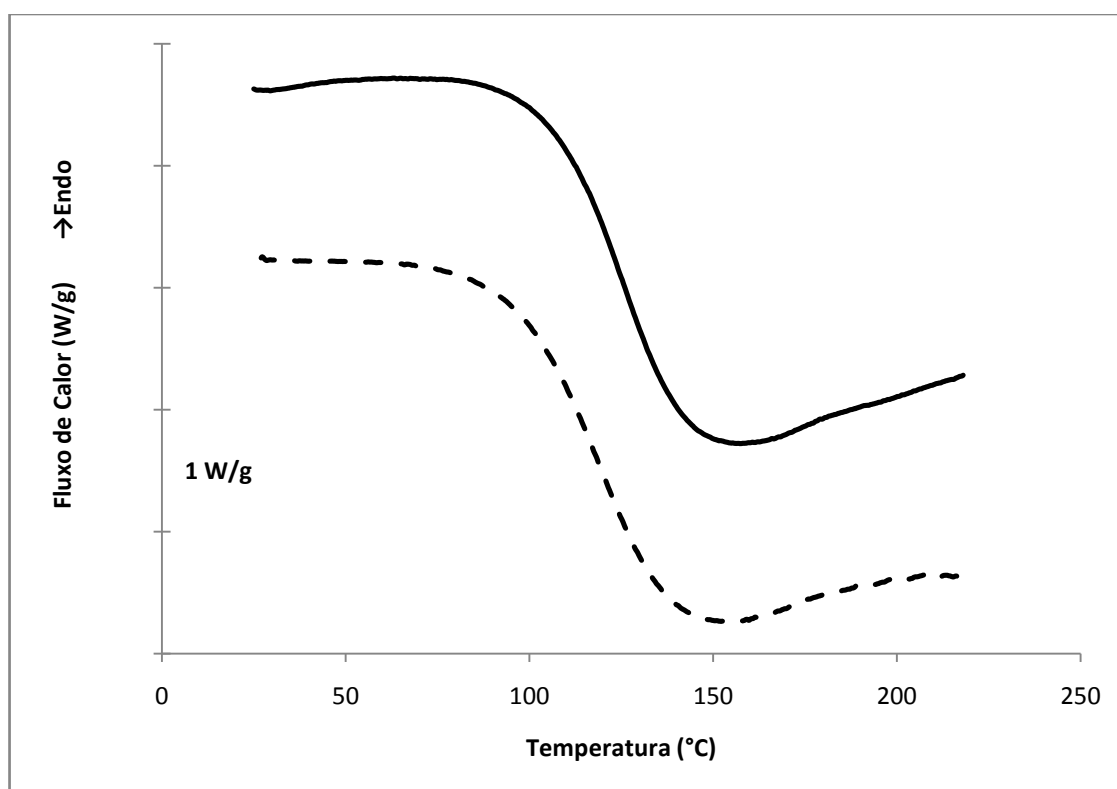


Figura 19 – Comparação da estabilidade oxidativa do ácido linoleico sem acetona (—) e com acetona (----).

Verificou-se que o solvente escolhido para solubilizar os antioxidantes tinha apenas uma muito ligeira influência na estabilidade oxidativa do ácido linoleico. Através

da análise do termograma da figura 19, pode-se observar que a temperatura de indução da oxidação de ambas as preparações é muito próxima, logo, não haverá uma considerável interferência por parte do solvente acetona no comportamento oxidativo do ácido linoleico. No caso do ácido linoleico sem acetona, pode-se verificar na tabela 21 dos anexos que a TIO é de 107°C, enquanto no caso do ácido linoleico com acetona verifica-se que aos 103°C é iniciada a oxidação.

3.6 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS NA TERMO-OXIDAÇÃO DO ÁCIDO LINOLEICO

De modo a determinar qual o método adequado para a preparação das amostras e tendo em consideração que a acetona deveria evaporar e que o ácido linoleico não deveria sofrer oxidação, efectuaram-se ensaios com diferentes tempos de espera após a adição do solvente ao ácido linoleico. Os resultados estão evidenciados na figura 20. Verifica-se que quanto maior o tempo de espera para evaporação do solvente mais baixa é a TIO, o que significa que a termo-oxidação do ácido linoleico se inicia mais rapidamente quanto maior for o tempo de espera da amostra quando deixada à temperatura ambiente.

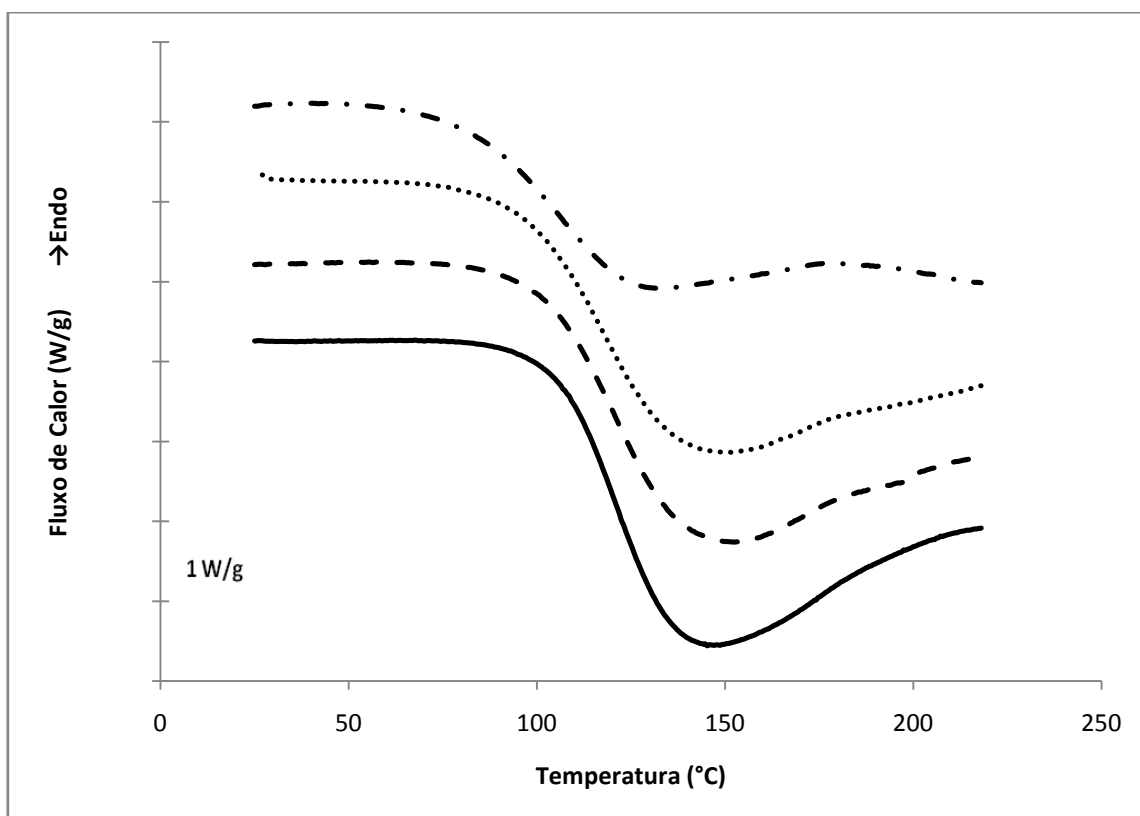


Figura 20 – Estudo da oxidação do ácido linoleico com acetona depois de o deixar à temperatura ambiente do laboratório durante 1 hora (—), 24h (----), 48h (....), e 72h (—·—).

Tomando como ponto de referência a curva (—), que representa a estabilidade oxidativa do ácido linoleico com acetona analisado após uma hora, pode-se verificar que a TIO é 105°C e o ponto de inflexão ocorre aos 121°C. Pela análise do termograma representado pela curva (----) correspondente a um tempo de espera de 24h para que

ocorra evaporação da acetona, a TIO é de 103°C. A curva (····) representa o que sucede com um tempo de espera de 48h, pode-se apurar que a TIO correspondente é 99°C. Neste caso, já é notória a influência do tempo de espera na oxidação do ácido linoleico. Esta análise é corroborada pela observação da curva (---), correspondente a um tempo de espera de 72h, na qual a TIO respectiva é 82°C e o ponto de inflexão é 102°C. Nesta situação, que pode ser considerada como a mais díspar em relação ao termograma (—), surge um desvio da TIO de 23°C e um desvio do ponto de inflexão de 19°C. Como suporte à figura 20, pode-se analisar a tabela 4 onde constam as TIO e as temperaturas dos pontos de inflexão correspondentes (TPI) aos diferentes tempos a que a amostra permaneceu à temperatura ambiente, préviamente à análise da sua estabilidade termo-oxidativa.

Tabela 4 – Avaliação do efeito da preparação da amostra na estabilidade termo-oxidativa do ácido linoleico.

Tempo à temperatura ambiente (h)	TIO (°C)	TPI (°C)
1	105	121
24	103	119
48	99	116
72	82	102

A termo-oxidação do ácido linoleico inicia mais rapidamente quanto maior for o tempo de espera da amostra quando deixada à temperatura ambiente. É de salientar que a TIO do ácido linoleico sem acetona ocorre aos 107°C, assim sendo, o tempo de espera para evaporação do solvente cujo efeito será menos notório é para 1h. Tendo em consideração esta observação, todos os ensaios seguintes foram efectuados uma hora a seguir à adição do solvente.

3.7 ANÁLISE DO EFEITO DOS ANTIOXIDANTES NA ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA DO ÁCIDO LINOLEICO

De forma a verificar qual o efeito que cada antioxidante teria na estabilização oxidativa do ácido linoleico, foram efectuados ensaios termo-oxidativos em que, a cerca de 4mg de ácido linoleico eram adicionados 10 μ l da solução de antioxidante, como descrito em 2.3.3. Deste modo, comparando o termograma representativo da termo-oxidação do ácido linoleico sem qualquer aditivo com o do ácido linoleico aditivado com o antioxidante respectivo (PA, neste caso, figura 21), pode-se identificar o aumento da TIO e consequentemente estimar qual o efeito que o antioxidante teve na estabilidade termo-oxidativa.

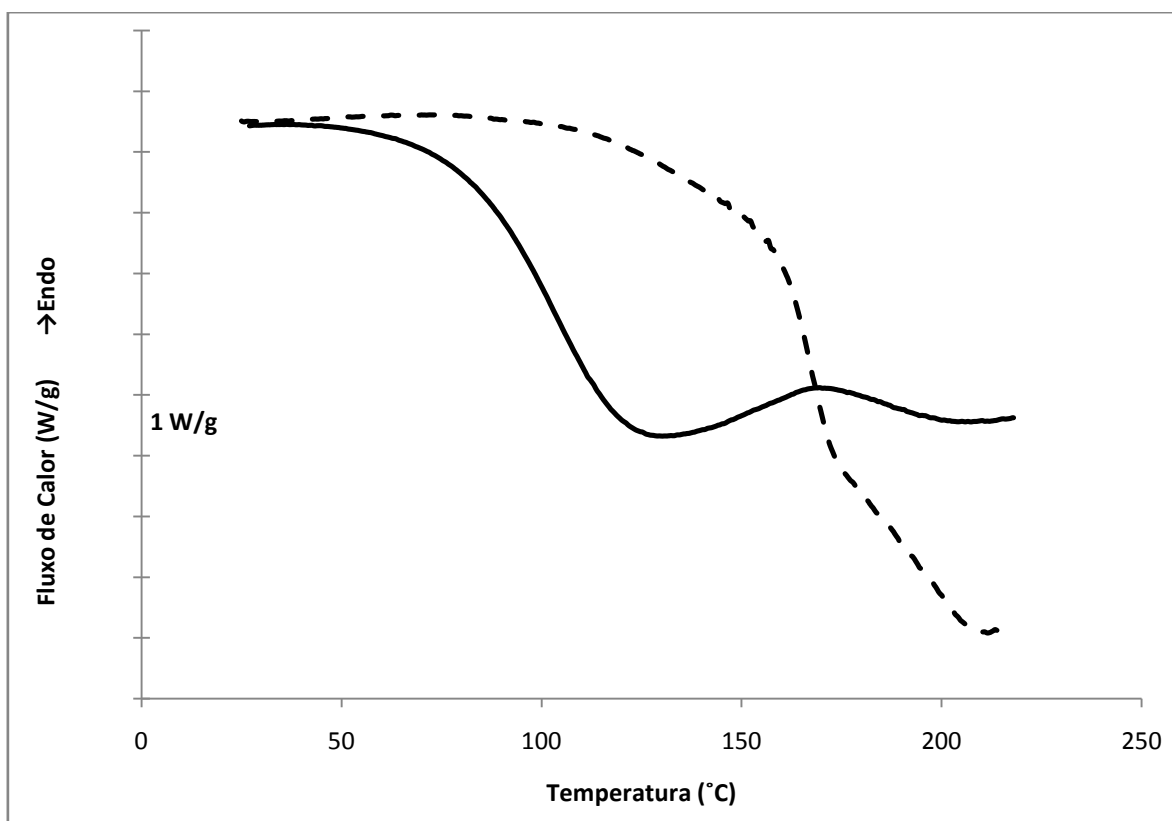


Figura 21 – Oxidação do ácido linoleico sem a presença de antioxidante (—) e estabilizado com PA (----).

É possível verificar que existe uma diferença considerável entre a TIO do ácido linoleico sem aditivo e com a adição do antioxidante PA. Pela análise da tabela 21 dos anexos verificamos que a TIO do ácido linoleico ocorre aos 106°C, enquanto com a adição de

PA, a TIO é desviada para 166°C. Logo, há um deslocamento de 60°C na TIO, pois ocorre uma estabilização do ácido linoleico ao adicionar o antioxidante PA.

Observa-se o mesmo processo no caso do DOPA. Tomando, novamente, como referência o termograma representativo da termo-oxidação do ácido linoleico, sobrepõe-se o termograma descritivo da termo-oxidação do ácido linoleico estabilizado com DOPA. O resultado é apresentado na figura 22.

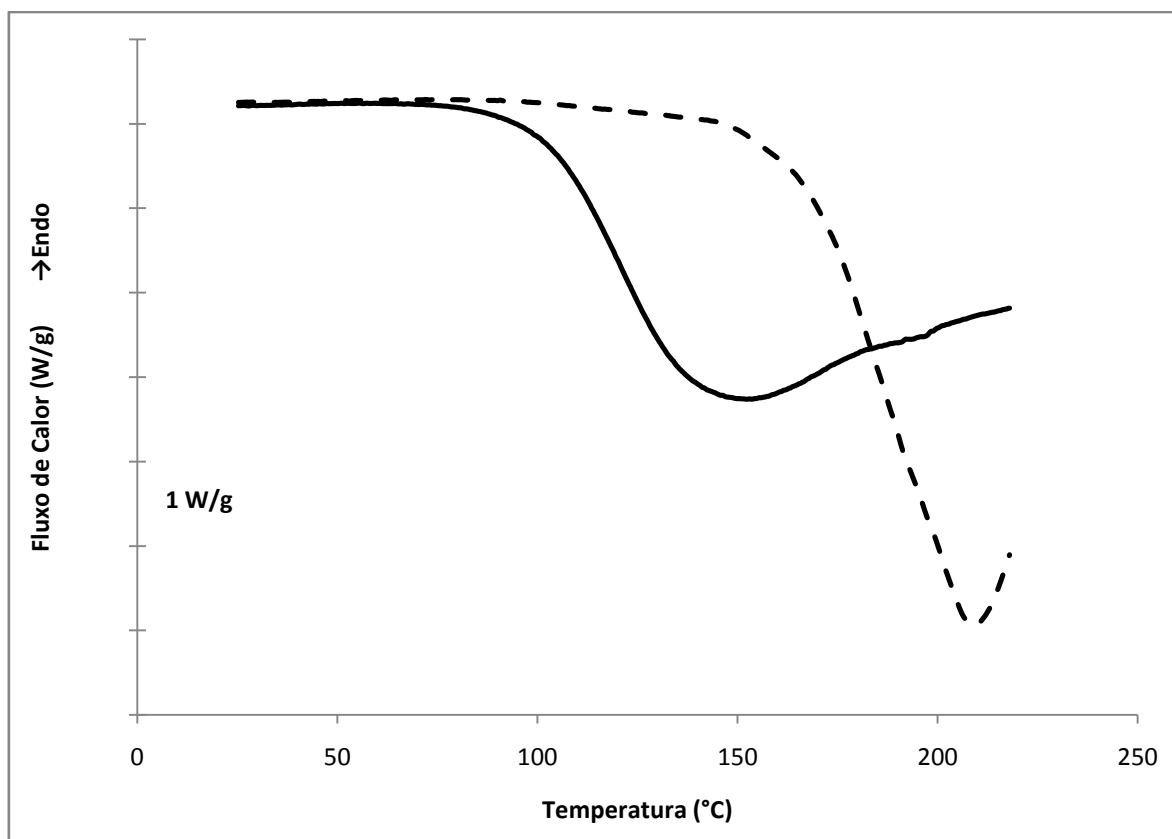


Figura 22 – Oxidação do ácido linoleico sem a presença de antioxidante (—) e estabilizado com DOPA (----).

É evidente uma clara melhoria da estabilização termo-oxidativa do ácido linoleico quando lhe é adicionado o antioxidante DOPA. Através da consulta da tabela 21 dos anexos verifica-se que a TIO no caso do ácido linoleico é 106°C, enquanto no termograma do ácido linoleico com DOPA a TIO correspondente é 191°C. Logo, existe uma diferença de 85°C que significa a ocorrência de estabilização do ácido linoleico quando lhe é adicionado o antioxidante DOPA. Assim, intercalação do grupo CH_2 entre o anel e o grupo ácido favoreceu e aumentou a capacidade antioxidativa.

No caso dos ésteres do ácido protocatecuico, a análise efectuada foi semelhante à anteriormente descrita para o PA e DOPA. O resultado do estudo comparativo da

estabilização termo-oxidativa do ácido linoleico sem aditivo ou com a adição de PM é evidenciada na figura 23.

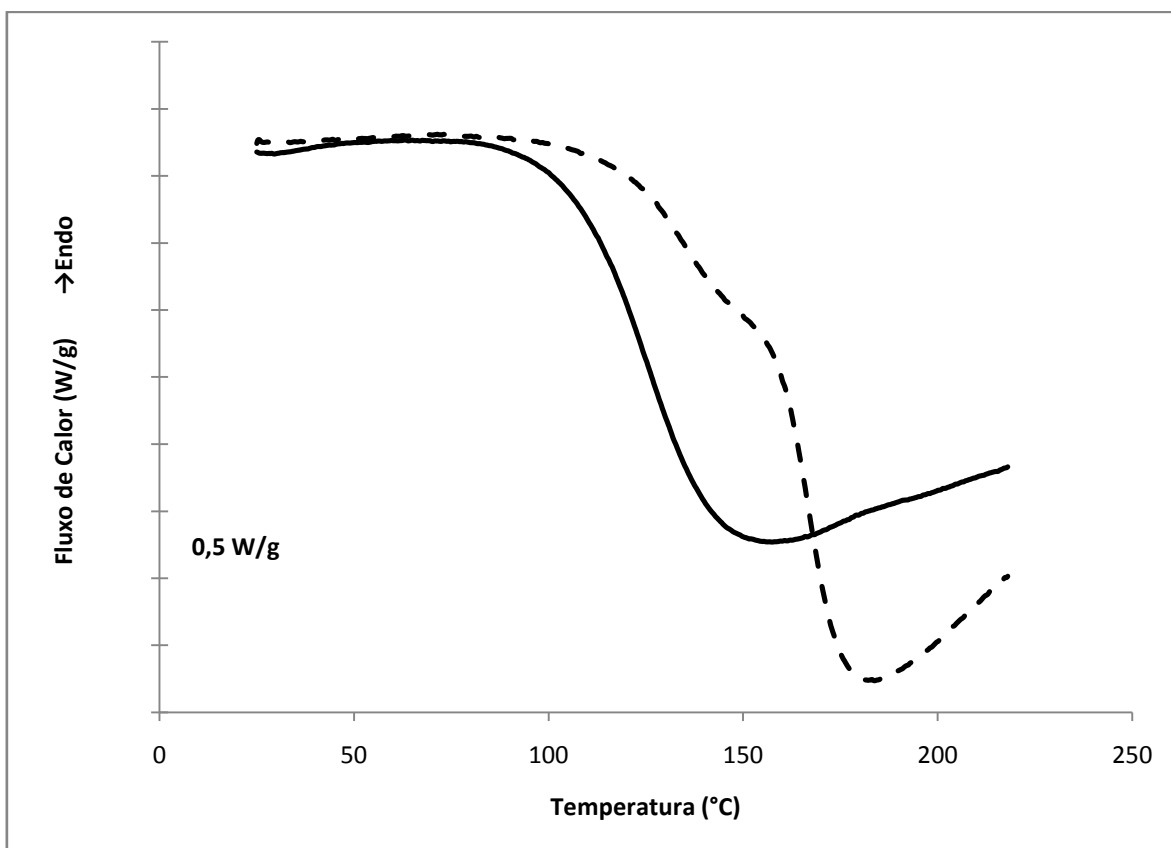


Figura 23 – Oxidação do ácido linoleico sem a presença de antioxidante (—) e estabilizado com PM (----).

Numa primeira análise do termograma é possível verificar que a libertação de calor resultante da oxidação do ácido linoleico difere da que ocorre no caso do ácido linoleico com adição do éster metílico do ácido protocatecuico (PM). Na oxidação do ácido linoleico estabilizado o início de oxidação ocorre aos 124°C. Verifica-se que a partir dos 154°C aumenta o declive (em valor absoluto) do termograma, indicando um aumento de velocidade de libertação de calor a partir dessa temperatura, que designaremos por TIO*. Como era esperado, a presença de antioxidante aumenta a temperatura de indução de oxidação, mas neste caso observa-se que na fase inicial de oxidação o antioxidante tem capacidade para travar o processo de oxidação. A partir de uma temperatura mais elevada (neste caso 154°C) o processo de oxidação sofre uma aceleração. Este fenómeno é evidenciado em todos os termogramas referentes ao estudo do efeito destes ésteres do ácido protocatecuico na estabilidade termo-oxidativa do ácido linoleico.

Igualmente, no caso do PE, efectuou-se uma comparação entre o termograma do ácido linoleico sem aditivo com o do ácido linoleico com o éster etílico do ácido protocatecuico. O resultado desse comparativo surge na figura 24.

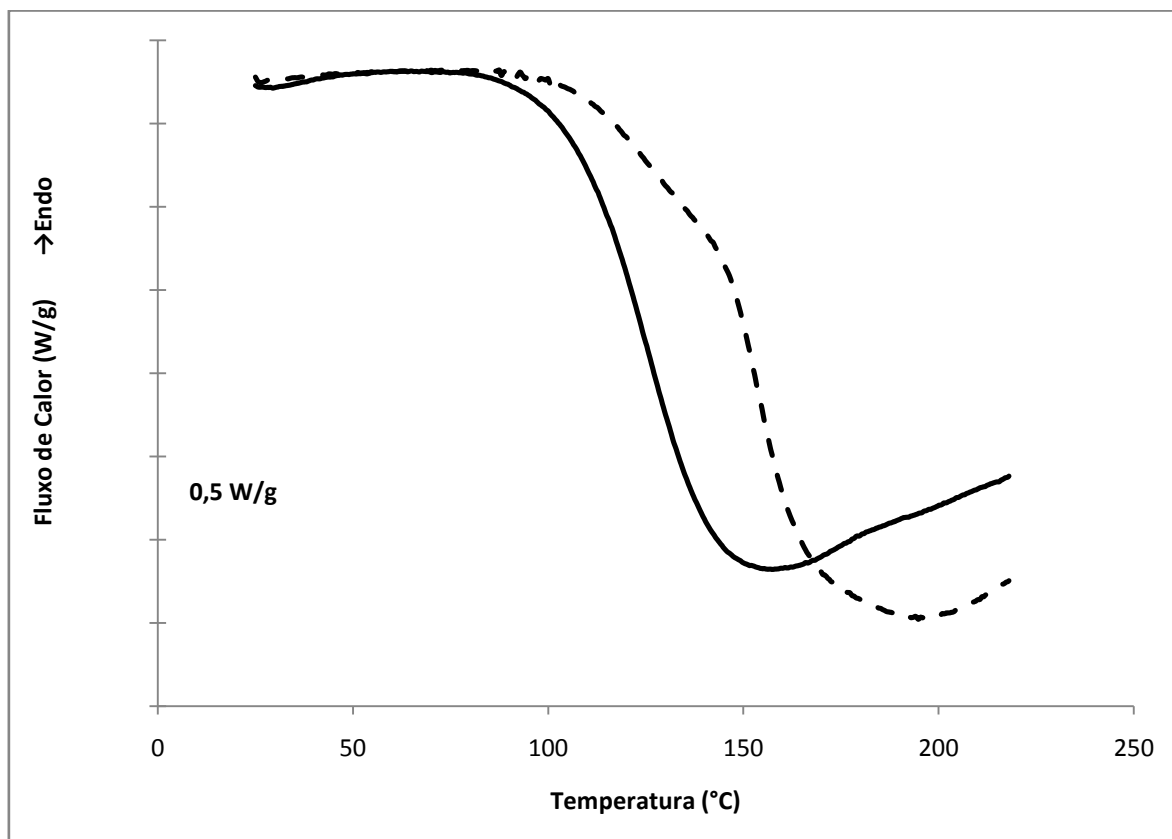


Figura 24 – Oxidação do ácido linoleico sem a presença de antioxidante (—) e estabilizado com PE (----).

Através da interpretação do termograma, é possível conferir que a TIO do ácido linoleico com PE é superior à que ocorre com o ácido linoleico sozinho. Com a ajuda da tabela 21 dos anexos identifica-se que a TIO do ácido linoleico com PE acontece aos 109°C, enquanto no ácido linoleico a TIO ocorre aos 106°C. É de salientar que, tal como no termograma representativo da estabilidade termo-oxidativa do PM, existe uma segunda aceleração do processo de oxidação aos 145°C (TIO*).

O estudo comparativo entre a estabilidade termo-oxidativa do ácido linoleico sem aditivo e com a adição de PP, é evidenciado na figura 25.

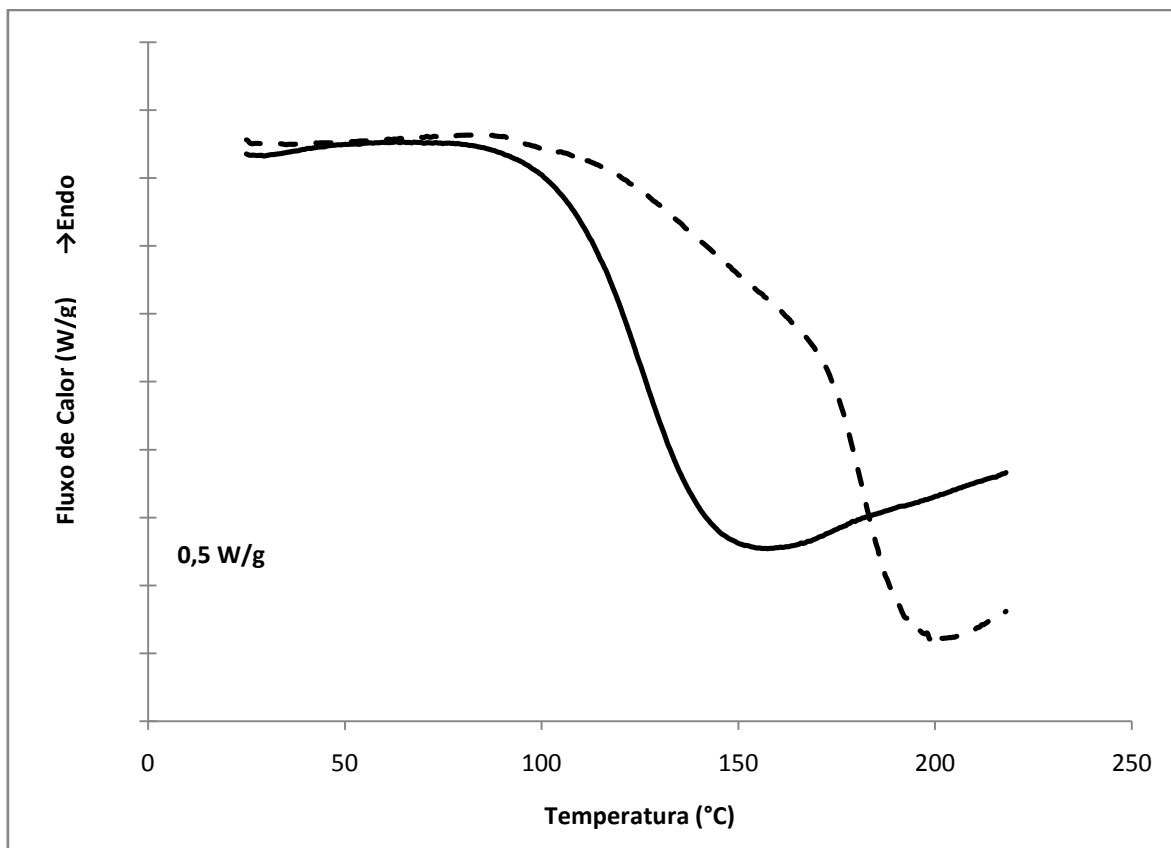


Figura 25 – Oxidação do ácido linoleico sem a presença de antioxidante (—) e estabilizado com PP (----).

Tal como no termograma representativo da estabilidade termo-oxidativa do PM e PE, após a fase de indução surge uma primeira rampa, que se inicia aos 91°C (TIO). A partir dos 167°C (TIO*) observa-se, claramente, o aumento da velocidade de libertação de calor resultante de um aumento da velocidade de oxidação.

De forma a obter uma visão global do efeito dos cinco antioxidantes, na estabilização do ácido linoleico, foram transpostos os respectivos termogramas para um mesmo gráfico (figura 26), no qual se evidenciam as diferenças na termo-oxidação do ácido linoleico simples ou aditivado com as diferentes espécies estudadas.

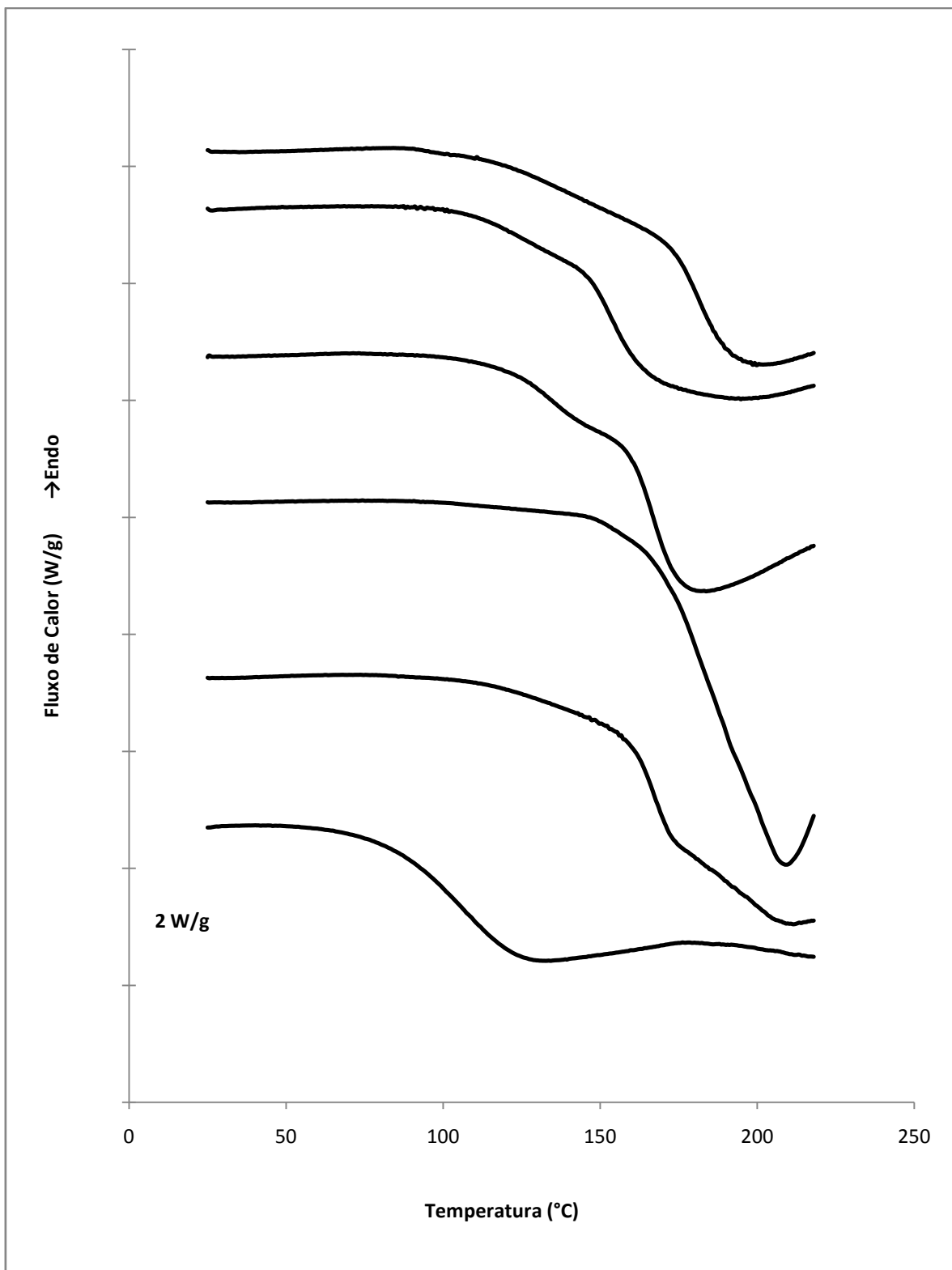


Figura 26 – Termogramas da oxidação do ácido linoleico na presença de antioxidantes. De baixo para cima: sem antioxidante, com PA, com DOPA, com PM, com PE e com PP.

Verifica-se, em todos os termogramas representativos da estabilidade termo-oxidativa do ácido linoleico com antioxidante, uma melhoria em relação ao ácido linoleico. É também notório que o antioxidante que adicionado ao ácido linoleico mais eleva a TIO é o DOPA (191°C), aquele em que a sua adição ao ácido linoleico tem menos efeito na estabilização termo-oxidativa é o PP, cuja TIO da mistura é 91°C. É possível visualizar as TIO referentes a cada termograma, bem como as TIO* da segunda rampa dos ésteres do ácido protocatecuico através da consulta da tabela 5.

Tabela 5 – Avaliação do efeito dos antioxidantes na estabilidade termo-oxidativa do ácido linoleico.

	Sem*	PA	DOPA	PM	PE	PP
TIO (°C)	106	166	191	125	109	91
TIO*(°C)	-	-	-	154	145	167

Nota: * Ácido linoleico sem antioxidante.

Existem diferenças evidentes entre os termogramas dos antioxidantes PA e DOPA e os dos ésteres do ácido protocatecuico. No caso do PA e DOPA, a rampa que ocorre no termograma e que corresponde à TIO é bem definida. No caso dos ésteres, existe uma primeira rampa representativa do início da oxidação, correspondente à TIO e posteriormente ocorre uma segunda depressão, representativa de um aumento da velocidade de oxidação, à qual foram medidas as respectivas TIO*. Comparando os termogramas dos ácidos protocatecuico e homoprotocatecuico, verifica-se que a introdução do grupo CH₂ entre o anel benzénico e o grupo ácido, fez aumentar a TIO.

Quanto aos ésteres do ácido protocatecuico, verifica-se que quanto maior o número de átomos de carbono no radical do grupo éster, menor é a TIO que corresponde à temperatura à qual se inicia a oxidação.

No entanto, quando se considera o parâmetro TIO*, observa-se que a oxidação (depois arrancar) é mais lenta na presença do éster com o maior número de carbonos (PP). A TIO* do ácido linoleico na presença de PE é a menor de todas, mas este resultado é atribuído ao facto de se ter utilizado uma menor concentração de antioxidante utilizado aquando do ensaio do ácido linoleico estabilizado com o éster etílico.

Como em princípio estamos interessados que o ácido linoleico não sofra alterações as conclusões obtidas a partir do TIO deverão ser mais relevantes do que as obtidas para a análise do TIO*.

3.7.1 ANÁLISE DO EFEITO DOS ANTIOXIDANTES NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÁCIDO LINOLEICO – TERMOGRAMAS DIFERENCIAIS

Em algumas análises, em particular quando não ocorre uma oxidação muito rápida após o período de indução, torna-se mais complexa a determinação da TIO através dos termogramas anteriormente apresentados. Numa tentativa de encontrar um outro parâmetro mais robusto para analisar a capacidade antioxidativa das substâncias testadas efectuou-se a derivada dos resultados analíticos obtidos. Esta transformação matemática vai originar um traço que apresenta um pico bem evidente que corresponde ao ponto de inflexão do termograma original. A título de exemplo apresenta-se na figura 27 o termograma directo e o termograma diferencial correspondentes ao estudo da estabilidade oxidativa do ácido linoleico na presença do PM.

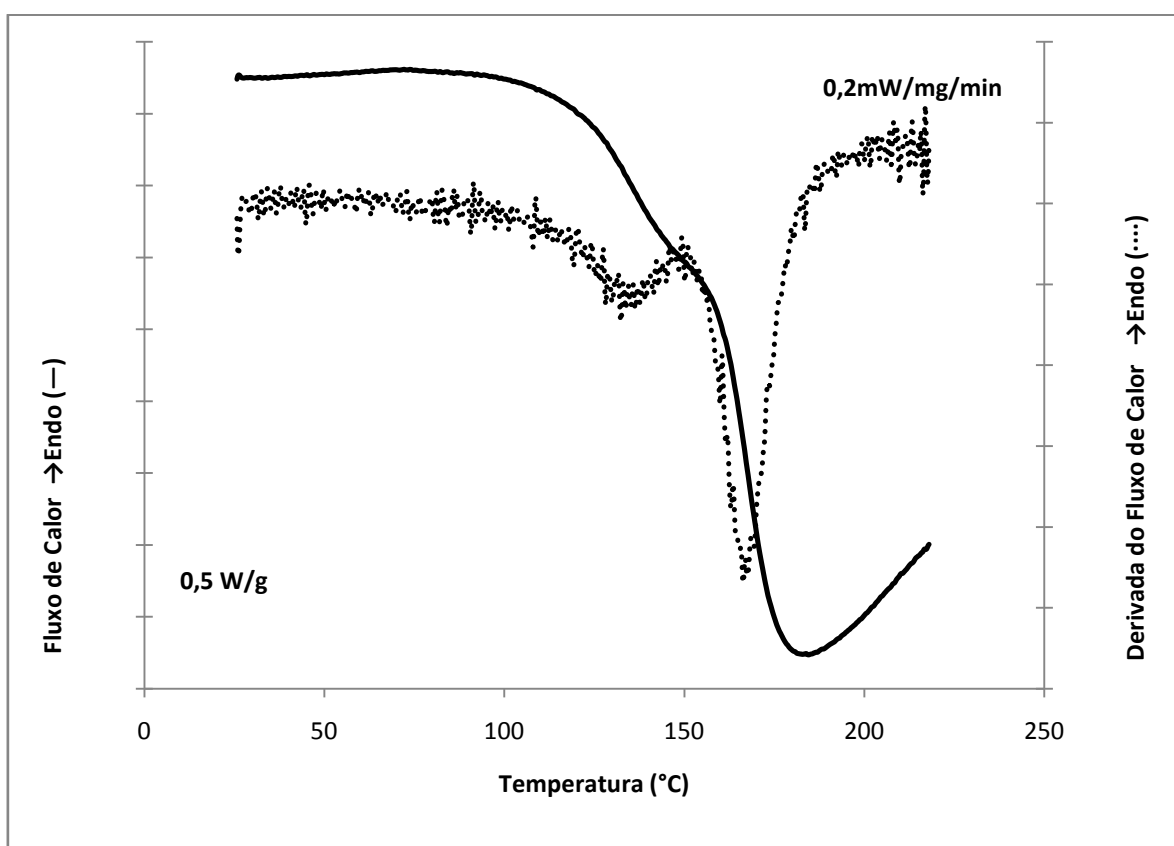


Figura 27 – Estudo comparativo da estabilidade oxidativa do PM: termograma (—), termograma diferencial (....).

Pela análise do termograma normal observa-se a ocorrência de um fenómeno exotérmico que apresenta dois andamentos distintos, após uma primeira libertação de calor ocorre

uma segunda ainda mais rápida. Através do termograma diferencial é possível determinar a temperatura de pico da derivada (TPD) correspondente, que neste caso é 166°C. Fazemos referência unicamente ao pico, no termograma diferencial, de maiores dimensões. Neste caso em particular é notório o surgimento de um primeiro pico, mais pequeno, que corresponde ao ponto de inflexão da primeira descida do termograma normal. Aparentemente depois do início da oxidação o antioxidante tem, ainda, capacidade para limitar o processo de oxidação. Com o crescente aumento da temperatura, a velocidade de oxidação volta a crescer até atingir um segundo ponto de inflexão à temperatura anteriormente indicada (166°C).

Em comparação com a determinação da TIO pelo método clássico, a determinação da temperatura de pico dos termogramas diferenciais (DDSC vs temperatura) é mais fácil. Iremos avaliar a possibilidade de utilizar este novo parâmetro para avaliar a capacidade antioxidativa dos compostos estudados.

Seguidamente apresentam-se os termogramas diferenciais estabilidade oxidativa do ácido linoleico sem qualquer aditivo e com a adição dos ácidos: PA e DOPA (figura 28). Verifica-se que o DOPA é o ácido com maior capacidade de retardar a oxidação do ácido linoleico pois a temperatura de pico da derivada correspondente a este antioxidante é 203°C, enquanto no caso do PA, a respectiva TPD é 179°C. No entanto, verificam-se melhorias significativas em relação ao ácido linoleico sem anti-oxidante, cuja TPD correspondente é 112°C. Na figura 29, representa-se o estudo comparativo dos termogramas diferenciais da oxidação do ácido linoleico na presença dos ésteres do ácido protocatecuico. Como referência volta-se a incluir o termograma diferencial da oxidação do ácido linoleico não estabilizado.

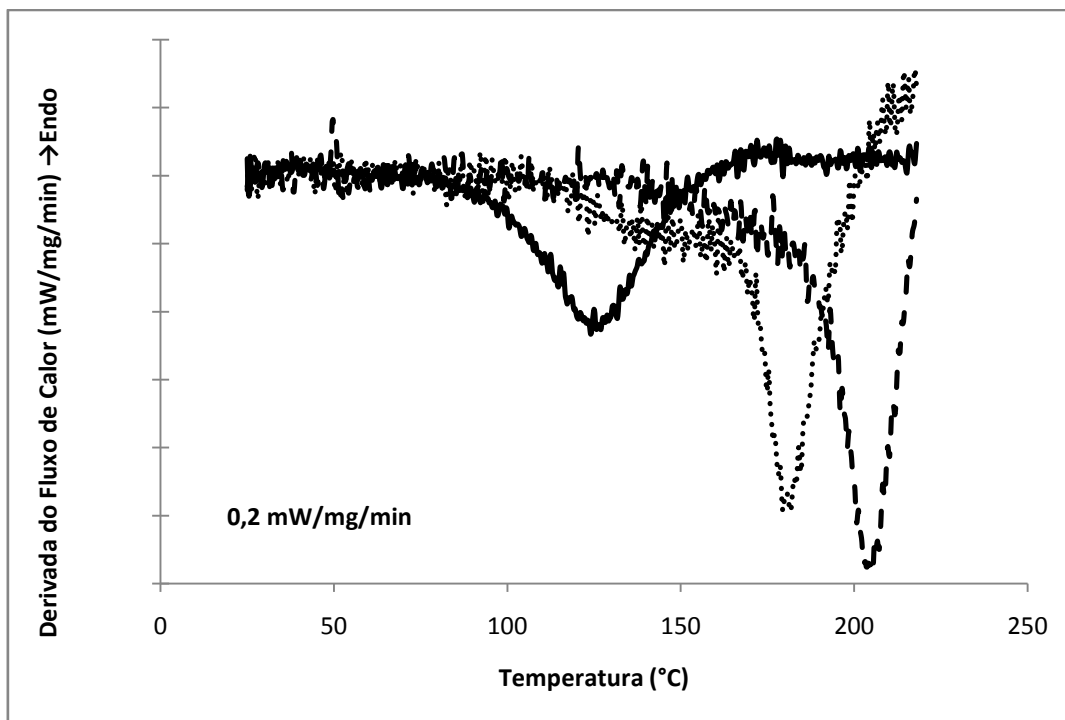


Figura 28 – Termogramas diferenciais representativos da estabilidade oxidativa do ácido linoleico (—), ácido linoleico com PA (...), ácido linoleico com DOPA (---).

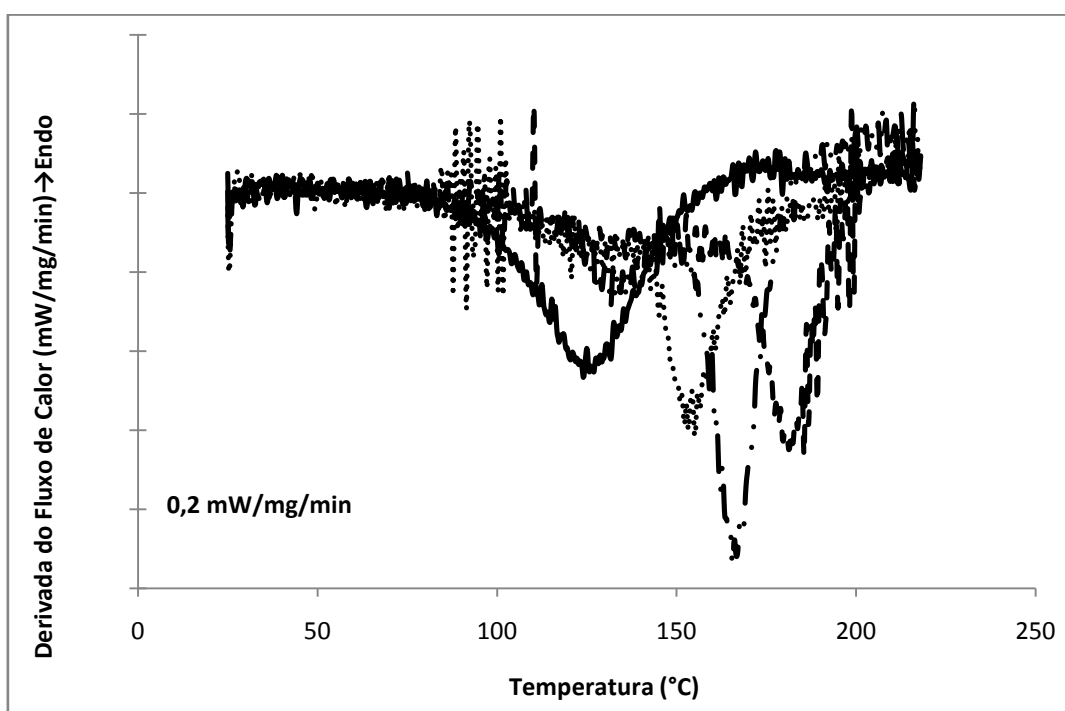


Figura 29 – Termogramas diferenciais representativos da estabilidade oxidativa do ácido linoleico (—), ácido linoleico com PM (---), ácido linoleico com PE (...), ácido linoleico com PP(-.-).

No estudo do efeito dos ésteres na estabilidade oxidativa do ácido linoleico existem duas rampas nos três termogramas (figura 26). Através do termograma diferencial (figura 29),

pode-se efectuar uma análise mais conclusiva, sabendo que o pico da derivada corresponde à velocidade máxima de oxidação. Verifica-se que o PP é o éster com maior poder estabilizador do ácido linoleico, cuja TPD da mistura é 186°C. Segue-se o PM cuja temperatura de pico da derivada correspondente é 166°C, e por último o PE com uma TPD de 153°C. Relembramos que o ácido linoleico sem aditivo tem uma TPD de 112°C, logo, todos os ésteres promovem a estabilização do ácido linoleico.

Um resumo dos resultados obtidos encontra-se na tabela 6, onde se indicam os valores da TPD do ácido linoleico estabilizados com os vários compostos estudados neste trabalho.

Tabela 6 – Análise do efeito dos antioxidantes na estabilidade termo-oxidativa do ácido linoleico, TPD's para os diferentes antioxidantes adicionados ao ácido linoleico.

	Sem*	PA	DOPA	PM	PE	PP
TPD (°C)	112	179	203	166	153	186

Nota: * Ácido linoleico sem antioxidante.

Verifica-se que o DOPA é o antioxidante com maior capacidade de estabilização anti-oxidativa do ácido linoleico, seguido por ordem decrescente dos seguintes antioxidantes: PP, PA, PM, PE.

3.7.2 COMPARAÇÃO ENTRE OS TERMOGRAMAS E OS TERMOGRAMAS DIFERENCIAIS

Foi efectuado um estudo comparativo entre os termogramas representativos da estabilidade térmica do ácido linoleico com os termogramas diferenciais, de forma a analisar as semelhanças e diferenças entre ambos, e consequentemente entender o efeito que cada antioxidante terá na estabilização termo-oxidativa do ácido linoleico. Os resultados obtidos encontram-se indicados na tabela seguinte, que aglutina os resultados apresentados nas duas tabelas anteriores.

Tabela 7a – Análise comparativa entre a TIO, TIO* e TPD do ácido linoleico.

	Sem*	PA	DOPA	PM	PE	PP
TIO (°C)	106	166	191	125	109	91
TIO*(°C)	-	-	-	154	145	167
TPD (°C)	112	179	203	166	153	186

Nota: * Ácido linoleico sem antioxidante.

Para a generalidade dos compostos existe uma relação entre os valores obtidos para as TIO e as TPD. Para os compostos ácidos, e como seria de esperar observa-se um acréscimo da TPD em relação à TIO, de 13 e 12°C (para o PA e para o DOPA, respectivamente).

No caso dos ésteres do ácido protocatecuico, a determinação das temperaturas de indução da oxidação (TIO e TIO*) são dificultadas pelo facto dos termogramas não possuírem depressões (oxidações) tão marcantes, o que pode levar a que as tangentes traçadas não estejam localizadas no ponto exacto, ocorrendo em desvios da determinação dos parâmetros experimentais. Tendo em conta que a TPD corresponde à localização do segundo ponto de inflexão faz mais sentido que exista uma correlação deste parâmetro com o TIO*.

A partir dos resultados obtidos, traçou-se um gráfico comparativo, onde se relacionam os vários valores obtidos (figura 30).

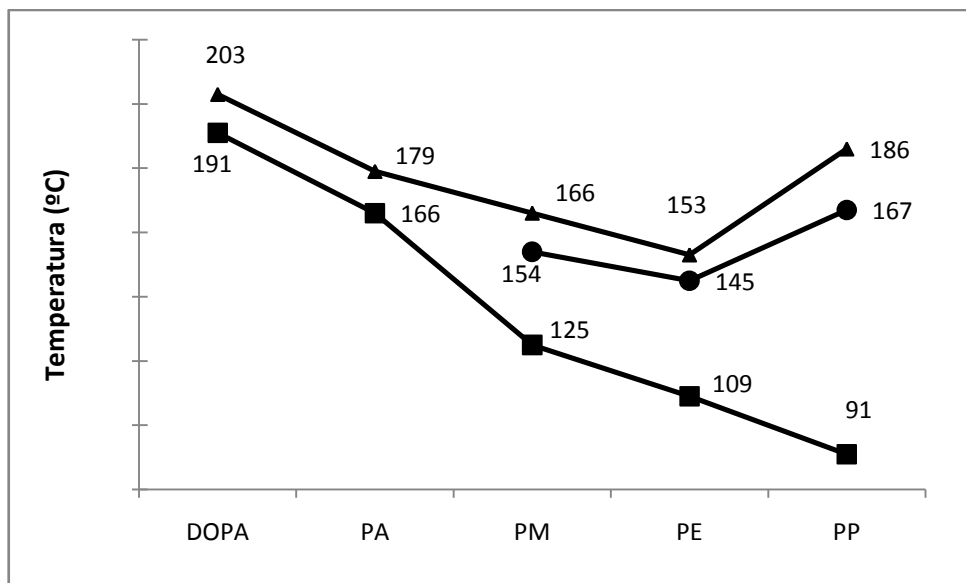


Figura 30 – Gráfico comparativo das diferentes TIO (quadrados), TIO* (círculos) e TPD (triângulos).

Torna-se bastante claro que há uma relação existente entre a TIO e a TPD referente aos antioxidantes ácidos estudados: PA e DOPA.

No caso dos ésteres, é a TIO* que está correlacionada com a TPD. Pelo contrário, a TIO dos ésteres não tem o mesmo tipo de variação associada à TPD.

A determinação da temperatura do pico do termograma diferencial revela-se, assim, um parâmetro com potencial para ser tido em conta na comparação do poder antioxidante dos compostos fenólicos. Mas a sua aplicação pode ser influenciada pela forma do termograma, em particular que após o período de indução a oxidação não se desencadeia de um modo mais lento.

3.8 ANÁLISE DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÁCIDO LINOLEICO

Foi estudada a estabilidade termo-oxidativa do ácido linoleico com diferentes concentrações de PA e DOPA (expressas em mol de antioxidante por litro de ácido linoleico) de forma a verificar qual o efeito desta variável na estabilização oxidativa do ácido linoleico. O termograma representativo da consequência do que ocorre no caso do PA é apresentado na figura 31.

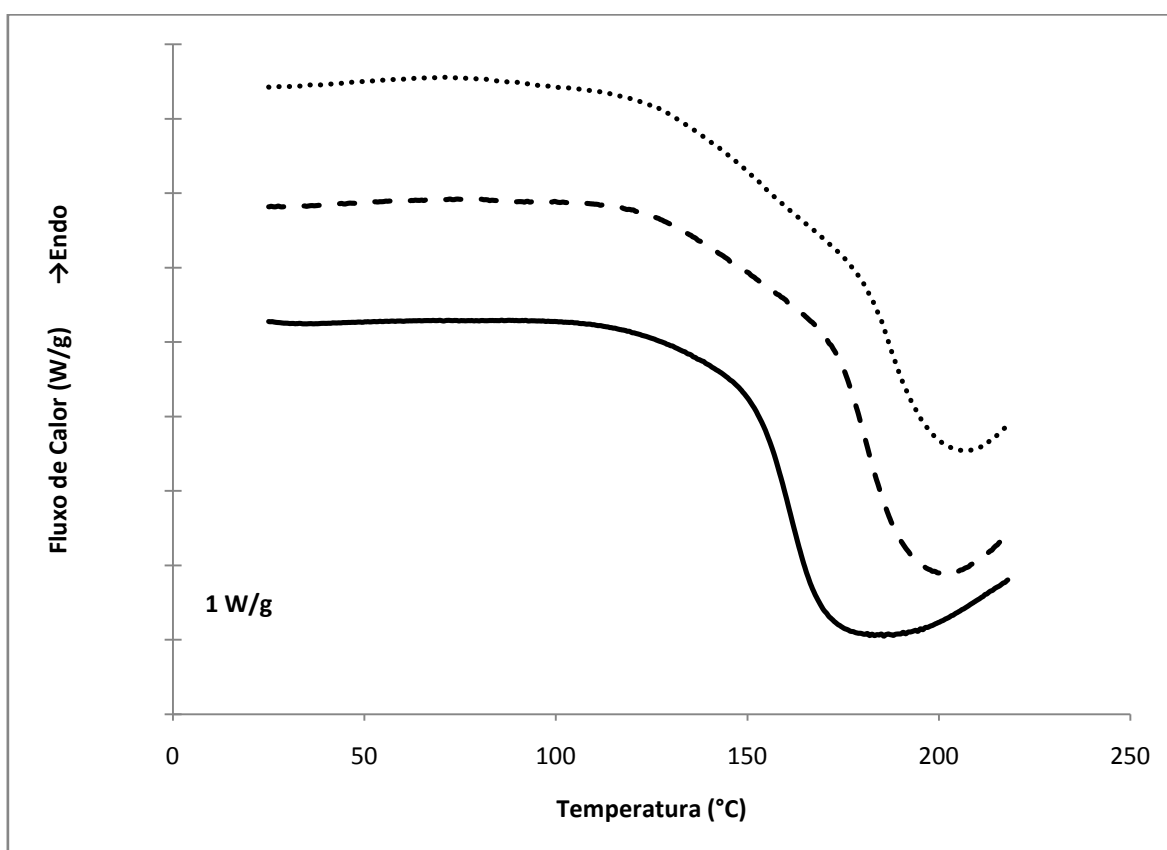


Figura 31 – Estabilidade térmica do ácido linoleico estabilizado com diferentes concentrações de PA: $1,4 \times 10^{-7}$ (—); $2,7 \times 10^{-7}$ (----) e $5,4 \times 10^{-7}$ (.....) (mol/L).

É notória uma queda abrupta na linha do termograma representativo da concentração mais baixa ($1,4 \times 10^{-7}$ mol/L). Para as concentrações mais elevadas, 2,7 e $5,4 \times 10^{-7}$ mol/L, existe uma rampa inicial em que se inicia a oxidação e uma segunda rampa correspondente a um aumento da velocidade de oxidação. Verifica-se a existência de uma relação proporcional entre o aumento da concentração e o aumento da TIO. Com

o aumento da concentração, o ponto de inflexão do termograma correspondente desloca-se para a direita, ou seja, para a zona de maiores temperaturas.

O mesmo estudo foi aplicado a amostras de ácido linoleico estabilizado com DOPA e os resultados obtidos são apresentados na figura 32.

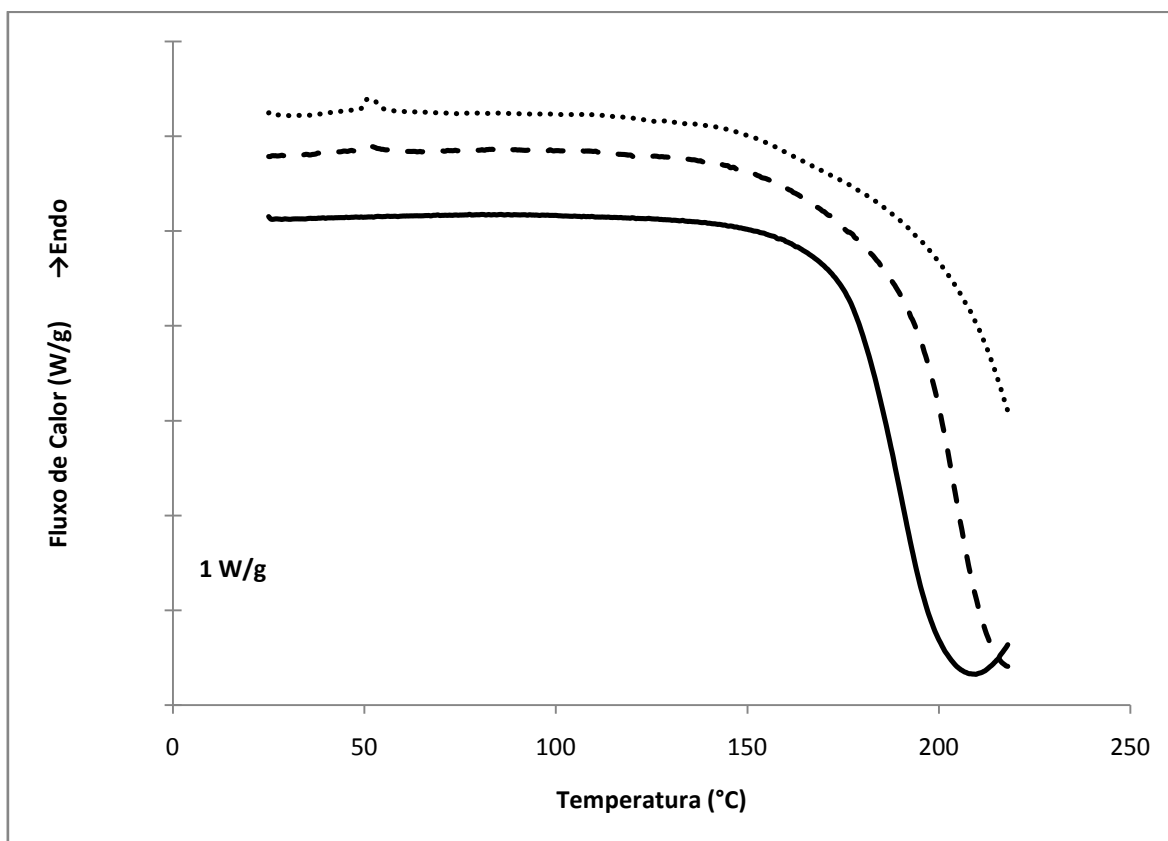


Figura 32 – Estabilidade térmica do ácido linoleico estabilizado com diferentes concentrações de DOPA: $1,4 \times 10^{-7}$ (—); $2,7 \times 10^{-7}$ (----) e $5,4 \times 10^{-7}$ (····) (mol/L).

Em primeiro lugar é de realçar o aparecimento de um ligeiro pico, mais notório na concentração mais elevada, antes dos 50°C, este fenómeno é devido à evaporação do solvente remanescente no cadinho. Analogamente ao que ocorre no PA, para a concentração mais baixa ($1,4 \times 10^{-7}$ mol/L) ocorre uma queda abrupta após o início da oxidação, enquanto para as concentrações 2,7 e $5,4 \times 10^{-7}$ mol/L é notória a existência de duas rampas distintas. É de salientar que também no caso do DOPA o ponto de inflexão desloca-se para a direita com o aumento da concentração do antioxidante, o que comprova que um aumento de concentração induz num aumento da estabilização termo-oxidativa do ácido linoleico, como se pode verificar sucintamente na tabela 7b.

Tabela 7b – Análise comparativa entre a TIO do PA e DOPA para diferentes concentrações.

Cx10⁷ (mol/L)	PA TIO (°C)	DOPA TIO (°C)
1,4	151,4	176,1
2,7	166,3	191,1
5,4	171,8	197,5

3.8.1 ANÁLISE DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÁCIDO LINOLEICO – TERMOGRAMAS DIFERENCIAIS

Verificou-se anteriormente que um aumento de concentração se traduz num aumento da TIO, mas existe também alteração na configuração dos termogramas, que para baixas concentrações demonstram um comportamento distinto do que acontece para concentrações mais elevadas em que é evidente a existência de duas velocidades de oxidação distintas. Devido à dificuldade que esse facto coloca na leitura correcta das TIO dos termogramas foi efectuado o estudo das derivadas dos termogramas diferenciais. A figura 33 mostra os termogramas diferenciais obtidos aquando do estudo do efeito da concentração do PA na estabilidade termo-oxidativa do ácido linoleico.

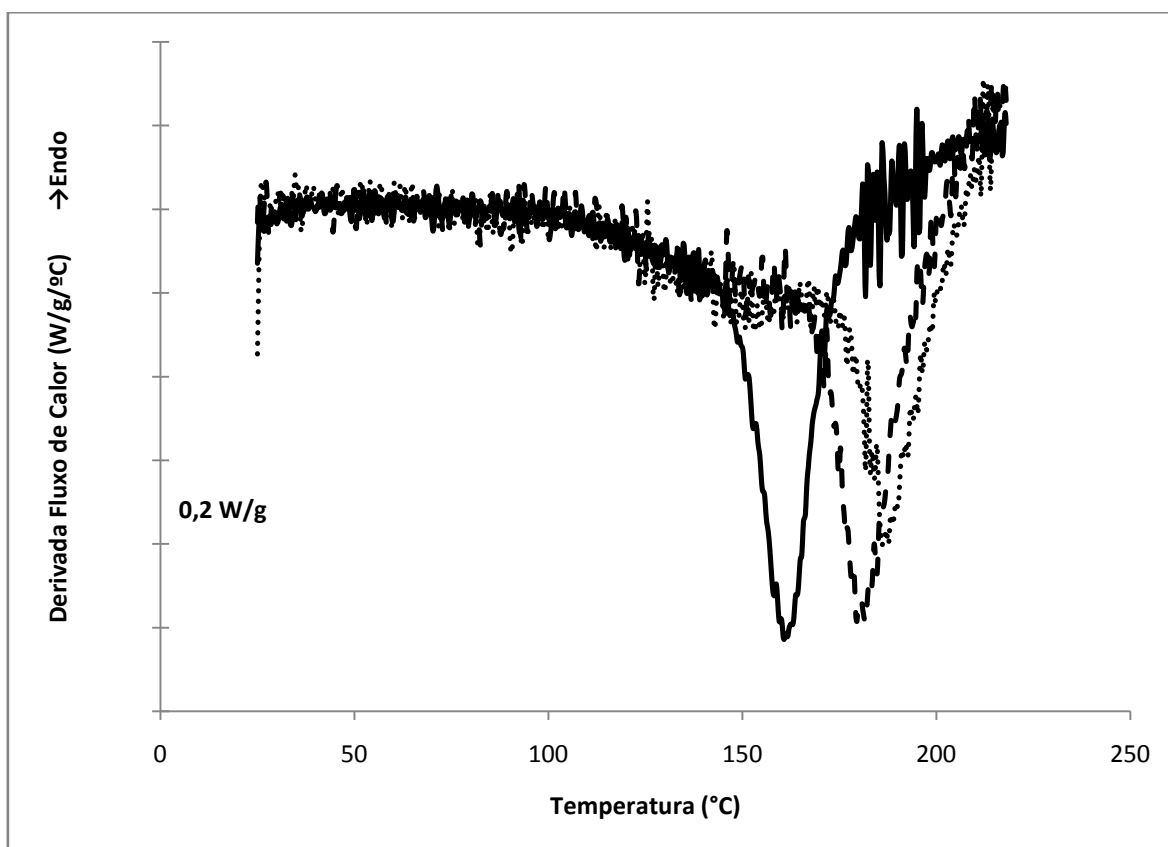


Figura 33 – Derivadas dos termogramas representativos da estabilidade térmica do ácido linoleico com diferentes concentrações de PA: $1,4 \times 10^{-7}$ (—); $2,7 \times 10^{-7}$ (----) e $5,4 \times 10^{-7}$ (.....) (mol/L).

Seguidamente, estudaram-se as derivadas correspondentes aos termogramas representativos do efeito da concentração do DOPA na estabilidade termo-oxidativa do ácido linoleico (figura 34).

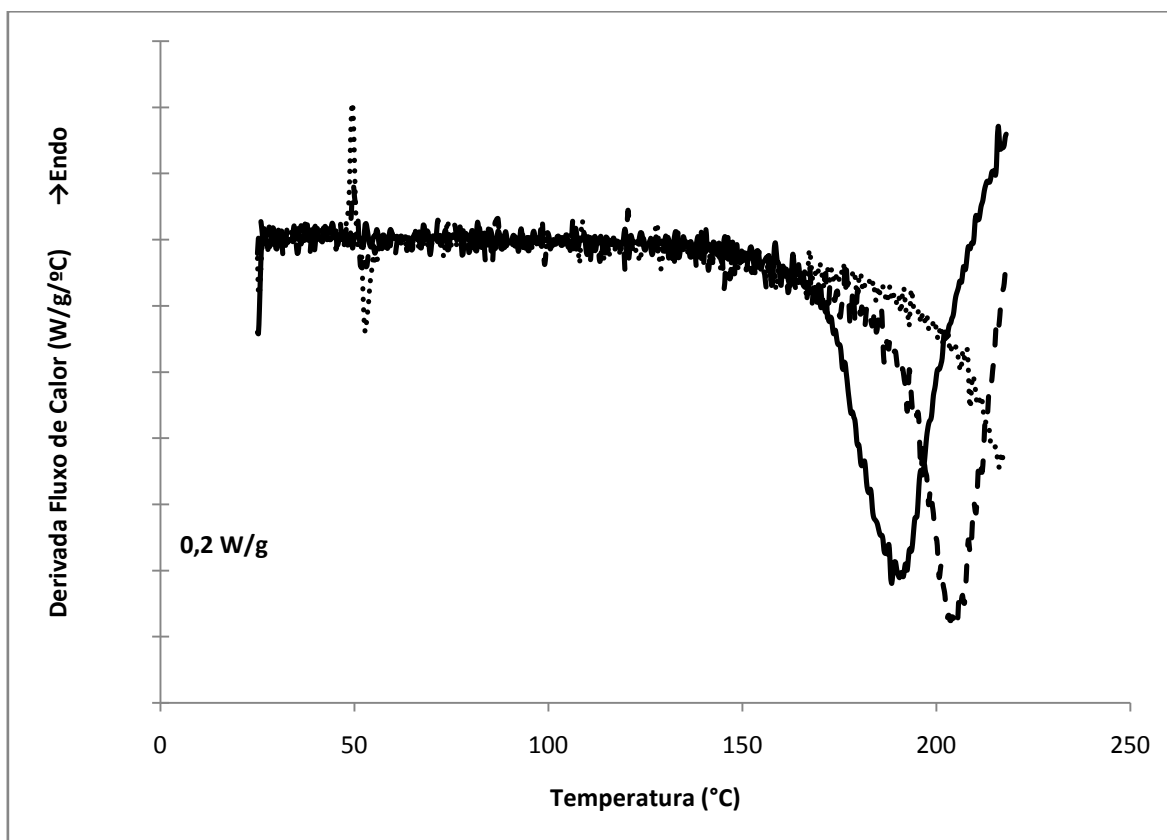


Figura 34 – Derivadas dos termogramas representativos da estabilidade térmica do ácido linoleico com diferentes concentrações de DOPA: $1,4 \times 10^{-7}$ (—); $2,7 \times 10^{-7}$ (----) e $5,4 \times 10^{-7}$ (····) (mol/L).

Nota-se, em ambos os termogramas, a influência da concentração dos antioxidantes na estabilidade termo-oxidativa do ácido linoleico. Com o aumento da concentração existe um deslocamento para a direita dos picos dos termogramas, o que significa que a TPD será tanto maior quanto maior for a concentração do antioxidante. Em termos térmicos, sabe-se que a TPD corresponde à temperatura onde ocorre a mais rápida libertação de calor. Com a ajuda da tabela 7c pode-se compara as TPD obtidas nos termogramas das figuras 33 e 34 com as TIO anteriormente estudadas.

Tabela 7c – Análise comparativa da TIO e TPD para o PA e DOPA para diferentes concentrações.

Cx10 ⁷ (mol/L)	PA		DOPA	
	TIO (°C)	TPD (°C)	TIO (°C)	TPD (°C)
1,4	151,4	160,5	176,1	188,3
2,7	166,3	179,3	191,1	203,5
5,4	171,8	185,8	197,5	*

*O gráfico não permite leitura.

4. CONCLUSÕES E SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Quanto ao método analítico de avaliação da capacidade antioxidativa utilizando um calorímetro diferencial de varrimento, usado neste trabalho podemos concluir que se conseguiu desenvolver uma metodologia analítica eficaz e muito rápida. A utilização de pequenas quantidades de ácido linoleico em cada ensaio foi um aspecto muito importante, porque nos permite reduzir os custos de análise. O método de preparação das amostras de ácido linoleico estabilizado com antioxidante revelou-se, também, muito eficaz quer em termos de utilização de reagentes quer em termos de tempo e material utilizados para a preparação das amostras a analisar. As experiências laboratoriais realizadas revelaram ainda, que se a preparação da amostra ocorresse à temperatura ambiente do laboratório, durante um período longo, existia uma clara possibilidade do ácido linoleico se degradar. Este fenómeno poderá introduzir desvios significativos nos resultados analíticos obtidos. Por isso mesmo, a técnica analítica exige um controlo rigoroso da manutenção das propriedades do ácido linoleico, sendo fundamental o seu armazenamento a uma temperatura suficientemente baixa para que a respectiva oxidação não seja significativa. Esta instabilidade vai ser um factor que vai limitar a comparação de resultados obtidos em condições semelhantes no mesmo laboratório ou em laboratórios distintos. Para a comparação da acção dos diferentes antioxidantes será fundamental garantir que controlamos rigorosamente os parâmetros que condicionam os resultados obtidos.

A análise da capacidade antioxidativa das diferentes substâncias testadas permitiu obter várias conclusões. A comparação dos resultados obtidos da oxidação do ácido linoleico estabilizado com PA e com DOPA mostrou que, em situações análogas, a introdução de um grupo CH_2 entre o anel aromático e o grupo ácido aumenta a eficácia do poder antioxidante da espécie química. Este resultado pode ser justificado pela, esperada maior estabilidade do radical formado a partir do DOPA em relação ao do PA.

No que diz respeito aos resultados observados para a estabilização do ácido linoleico pelos ésteres derivados do PA observaram-se dois resultados aparentemente contraditórios. Os valores obtidos para a temperatura de indução da oxidação, pelo método clássico, levam-nos a concluir que os ésteres com o radical menor são mais eficazes na estabilização do ácido linoleico. Em oposição, a temperatura de pico dos termogramas diferenciais parece indicar que o aumento do número de átomos de

carbono do radical do grupo éster tem um efeito positivo na capacidade antioxidativa da espécie química.

Os resultados dos testes de estabilização oxidativa do ácido linoleico com ésteres, mostrou ainda que, apesar de ocorrer relativamente cedo a oxidação do ácido linoleico, estes compostos têm capacidade para desacelerar a oxidação do ácido linoleico quando ela já se encontra após o período de indução da oxidação. Neste caso observa-se que o éster com o maior radical tem mais capacidade para evitar o aumento da velocidade de oxidação.

A comparação dos poder de estabilização dos compostos ácidos com os ésteres revelou que os ácidos são mais eficazes. Este resultado foi surpreendente porque se esperava que os ésteres, por serem mais lipofílicos, fossem mais eficazes que os compostos ácidos.

Como seria de esperar, a concentração do antioxidante desempenha um papel relevante na estabilidade do ácido linoleico. Os resultados da estabilização do ácido linoleico com diferentes quantidades de PA e DOPA assim o evidenciaram. O aumento para o dobro da concentração do antioxidante aumentou em 21°C a temperatura de indução da oxidação.

A utilização de termogramas diferenciais para analisar a capacidade antioxidativa mostrou-se muito prometedora. Estes termogramas mostram picos bem evidentes correspondentes aos pontos de inflexão do termograma original. A avaliação da temperatura de pico é mais fácil de executar do que a determinação da temperatura de indução da oxidação pelo método clássico. Falta no entanto esclarecer com mais profundidade se este parâmetro (pico da derivada) é uma boa medida do poder oxidante das várias espécies químicas.

No que respeita às possibilidades existentes para trabalhos futuros, o estudo do efeito da concentração dos ésteres do ácido protocatecuico na estabilização do ácido linoleico seria de enorme importância. Para além da óbvia avaliação do efeito da concentração dos antioxidantes na estabilidade do ácido linoleico, este estudo permitiria ainda estabelecer a influência da concentração do antioxidante na forma dos termogramas e a relação entre a temperatura de indução da oxidação obtida pelo método clássico e o valor do pico do termograma diferencial.

O estudo de outros antioxidantes como por exemplo os ácidos hidrocianímicos, como o cafeico e ferrulico, permitirá avaliar a influência da modificação das moléculas na

acção como antioxidantes e o cruzamento com os resultados obtidos por outras técnicas analíticas permitirá validar os resultados obtidos pela técnica analítica utilizada neste estudo.

ANEXOS

Tabela 8 – Calibração do calorímetro diferencial de varrimento.

ELEMENTO	FICHEIRO	TEMPERATURA (°C)	μVS/mg	Média	
				°C	μVS/mg
In	Cal_In01	156,59	68,318	156,48	68,76
	Cal_In02	156,44	68,339		
	Cal_In03	156,41	69,620		
Bi	Cal_Bi01	270,25	130,74	270,25	130,74
	Cal_Bi02	270,02	131,86		
	Cal_Bi03	270,03	132,16		
Sn	Cal_Sn01	231,14	156,03	231,14	156,03
	Cal_Sn02	230,94	155,96		
	Cal_Sn03	230,99	155,93		
Zn	Cal_Zn01	416,44	237,10	416,32	242,48
	Cal_Zn02	416,27	243,99		
	Cal_Zn03	416,26	246,35		
KNO ₃	Cal_K01	129,83	143,47	130,20	142,71
	Cal_K02	130,87	141,16		
	Cal_K03	129,89	143,50		

Tabela 9 – Estudo da estabilidade térmica e oxidativa dos antioxidantes e do ácido linoleico.

ANTIOXIDANTE	ATMOSFERA	FICHEIRO	m amostra (mg)	m cadinho (mg)
PA	AZOTO	a1_01	2,23	39,52
		a1_02	2,44	38,89
	OXIGÉNIO	a1_11	2,39	39,32
		a1_12	3,30	39,30
DOPA	AZOTO	a2_01	5,23	39,60
		a2_02	4,57	39,58
	OXIGÉNIO	a2_11	4,60	39,10
		a2_12	3,73	39,78
PE	AZOTO	pe_01	3,54	39,42
	OXIGÉNIO	pe_11	3,55	39,73
PM	AZOTO	pm_01	3,10	39,39
	OXIGÉNIO	pm_11	4,34	39,66
PP	AZOTO	pp_01r	3,27	39,67
	OXIGÉNIO	pp_11	3,08	40,12

Tabela 10 – Estudo da estabilidade térmica e oxidativa do ácido linoleico.

ATMOSFERA	FICHEIRO	m amostra (mg)	m cadinho (mg)
AZOTO	a3_01	3,06	39,58
	a3_02	3,45	39,27
OXIGÉNIO	a3_11	3,30	39,66
	a3_12	3,25	39,10
	(após 24h) lin02	4,14	39,88
	(após 48h) lin03	3,53	39,34

Tabela 11 – Estudo da estabilidade oxidativa do ácido linoleico (5 μ L) com acetona (10 μ L) à temperatura ambiente – diferentes tempos de espera para evaporação do solvente.

Tempo (horas)	FICHEIRO	m amostra (mg)	m cadinho (mg)
24h	linac02	2,69	39,59
48h	linac03	2,87	39,15
72h	a4_01	6,84	39,63
	a4_02	5,34	40,08
	a5_01	4,81	39,53
	a5_02	4,93	39,50

Tabela 12 – Estudo do efeito dos antioxidantes (10 μ L de solução do antioxidante em acetona) na estabilidade oxidativa do ácido linoleico (5 μ L).

Antioxidante	FICHEIRO	m amostra (mg)	m cadinho (mg)
PA	a4_03	4,27	39,53
	a4_04	4,77	39,90
DOPA	a5_03	4,61	39,58
	a5_04	4,29	39,22
PE	a6-PE	4,71	39,60
PM	a6-PM	4,08	39,11
PP	a6-PP	3,04	39,21

Tabela 13 – Estudo do efeito da concentração do antioxidante PA na estabilidade oxidativa do ácido linoleico.

V solução (μ L)	FICHEIRO	m amostra (mg)	m cadinho (mg)
5 μ l	pa5	3,37	39,31
10 μ l	pan	2,84	39,36
20 μ l	pa20	2,57	39,73

Tabela 14 – Estudo do efeito da concentração do antioxidante DOPA na estabilidade térmica e oxidativa do ácido linoleico.

V solução (μL)	FICHEIRO	m amostra (mg)	m cadinho (mg)
5 μl	dopa5	3,44	39,64
10 μl	dopan	2,66	39,59
20 μl	dopa20	3,56	39,15

Tabela 15 – Análise gráfica do estudo da estabilidade térmica do ácido linoleico.

Ácido Linoleico com AZOTO			
a3_01	a3_02	MÉDIA	
288,13	291,64	289,89	Peak (°C)
242,39	261,30	251,85	Onset (°C)
301,84	309,83	305,34	Endpt (°C)
402,76	403,59	403,18	Area (J/g)
47,54	53,52	50,53	Width (50%)
0,6163	0,5418	0,5791	Height (mV/mg)

Tabela 16 – Análise gráfica do estudo da estabilidade térmica e oxidativa do PA

PA com AZOTO									
a1_01			a1_02			MÉDIA			
87,03	204,24	245,83	83,34	204,19	244,01	85,19	204,20	244,92	Peak (°C)
63,75	201,49	213,00	60,73	201,60	211,38	62,24	201,55	212,19	Onset (°C)
93,33	205,27	271,91	90,19	205,11	271,07	91,76	205,19	271,49	Endpt (°C)
374,03	209,59	368,12	350,21	210,73	341,48	362,12	210,16	354,8	Area (J/g)
17,07	2,05	36,76	18,04	1,92	36,95	18,00	1,99	36,86	Width (50%)
1,571	7,242	0,8226	1,422	7,271	0,7793	1,497	7,260	0,800	Height (mV/mg)
PA com OXIGÉNIO									
a1_11		a1_12		MÉDIA					
83,51	203,61	86,75	204,27	85,04	203,94	Peak (°C)			
61,84	201,27	63,48	201,37	62,66	201,32	Onset (°C)			
91,28	204,54	93,21	205,28	92,15	204,91	Endpt (°C)			
360,37	221,86	374,71	224,06	367,54	222,96	Area (J/g)			
18,83	1,87	18,57	2,13	18,7	2,00	Width (50%)			
1,439	7,375	1,551	6,816	1,495	7,096	Height (mV/mg)			

Tabela 17 – Análise gráfica do estudo da estabilidade térmica e oxidativa do DOPA.

DOPA com AZOTO						
a2_01		a2_02		MÉDIA		
128,36	275,43	129,29	270,07	128,83	272,75	Peak (°C)
124,19	238,96	125,70	234,20	124,95	236,58	Onset (°C)
130,20	332,70	130,28	270,98	130,24	301,84	Endpt (°C)
212,95	346,49	188,20	313,61	200,58	330,05	Area (J/g)
4,12	70,95	2,48	68,93	3,30	69,94	Width (50%)
2,582	0,425	1,432	0,4032	2,007	0,4141	Height (mV/mg)

DOPA com OXIGÉNIO						
a2_11		a2_12		MÉDIA		
128,24		128,20		128,22		Peak (°C)
124,48		124,34		124,41		Onset (°C)
131,51		131,51		131,51		Endpt (°C)
211,00		225,97		218,49		Area (J/g)
3,93		3,72		3,83		Width (50%)
2,637		3,465		3,051		Height (mV/mg)

Tabela 18 – Análise gráfica do estudo da estabilidade térmica e oxidativa do PM

PM com AZOTO		PM com OXIGÉNIO		
pm_01		pm_11		
137,72		138,01		Peak (°C)
135,03		134,92		Onset (°C)
138,81		139,21		Endpt (°C)
232,56		226,31		Area (J/g)
2,10		2,37		Width (50%)
8,602		7,545		Height (mV/mg)

Tabela 19 – Análise gráfica do estudo da estabilidade térmica e oxidativa do PE

PE com AZOTO		PE com OXIGÉNIO		
pe_01		pe_11		
135,07	272,05	135,52		Peak (°C)
132,60	238,92	132,28		Onset (°C)
136,62	300,53	137,12		Endpt (°C)
232,27	517,67	234,20		Area (J/g)
2,24	44,26	3,16		Width (50%)
6,479	0,8712	5,003		Height(mV/mg)

Tabela 20 – Análise gráfica do estudo da estabilidade térmica e oxidativa do PP.

PP com AZOTO		PP com OXIGÉNIO		
pp_01r		pp_11		
117,35	274,74	117,03		Peak (°C)
114,75	250,20	114,64		Onset (°C)
118,57	292,24	118,38		Endpt (°C)
189,40	497,25	190,15		Area (J/g)
2,34	42,79	2,18		Width (50%)
6,48	0,8952	7,125		Height(mV/mg)

Tabela 21 – Análise gráfica da Temperatura de Indução de Oxidação e Ponto de Inflexão para os Diferentes Compostos .

SUBSTÂNCIA	ATMOSFERA	FICHEIRO	TIO (°C)	Ponto inflexão (°C)
ÁC. LINOLEICO	OXIGÉNIO	a3_11	107,54	124,09
		a3_12	104,82	122,53
		MÉDIA	106,18	123,31
ÁC. LINOLEICO + ACETONA	OXIGÉNIO	a4_01	82,06	102,04
		a4_02	82,60	102,04
		a5_01	84,61	112,00
		a5_02	83,32	109,60
		linac02	103,16	119,45
		linac03	98,75	116,04
	MÉDIA	89,08	110,20	
ÁC. LINOLEICO + PA	OXIGÉNIO	a4_03	157,21	168,90
		a4_04	130,12	145,06
		MÉDIA	143,66	156,98
	OXIGÉNIO	pa5	151,44	160,73
pan		166,29	181,64	
pa20		171,79	187,66	
ÁC. LINOLEICO + DOPA	OXIGÉNIO	a5_03	167,59	189,89
		a5_04	114,42	129,62
		MÉDIA	141,01	159,76
	OXIGÉNIO	dopa5	176,14	188,42
		dopan	191,06	205,27
dopa20		197,48	216,63	
ÁC.LINOL. + PM	OXIGÉNIO	a6_pm	124,46	132,42
ÁC.LINOL. + PE	OXIGÉNIO	a6_pe	109,06	155,15
ÁC.LINOL. + PP	OXIGÉNIO	a6_pp	91,22	110,54

CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO DE ANTIOXIDANTES NO ÁCIDO LINOLEICO ANALISADO

C: Concentração do antioxidante no ácido linoleico expressa em mol/L.

M₁: Massa de antioxidante usado na preparação da solução em acetona (g).

V₁: Volume de acetona (1000 µL).

V₂: Volume da toma adicionada ao ácido linoleico (µL).

M₂: Massa de ácido linoleico colocado no cadinho (0,004g).

MM: Massa molecular do antioxidante (g/mol).

D: Massa volúmica do ácido linoleico (902g/L).

$$C = \frac{M_1}{MM} \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{D}{M_2}$$

Tabela 22 – Concentrações dos diferentes antioxidantes nas amostras de ácido linoleico analisadas.

Antioxidante	MM	M ₁	V ₁	Cx10 ⁷ (mol/L)
PA	154,1	0,01867	5	1,4
			10	2,7
			20	5,4
DOPA	168,2	0,02043	5	1,4
			10	2,7
			20	5,4
PM	148,0	0,01713	10	2,6
PE	162,0	0,01313	10	1,8
PP	176,0	0,02058	10	2,7