

Avaliação da influência de antioxidantes na estabilização de Biodiesel

Nelson Augusto Esteves Preto

Avaliação da influência de antioxidantes na estabilização de Biodiesel

Orientador: Professor Doutor Jorge Manuel Pinto de Jesus Garrido

"Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis."

Bertolt Brecht

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Jorge Garrido, pela sua orientação e apoio incondicional neste trabalho, pelos seus preciosos ensinamentos, assim como, pela sua amizade, paciência e incentivo sempre presente.

Às minhas grandes amigas, Isabel Guerra e Vânia Luís pelo incentivo constante, pela profunda e intensa amizade, agradeço-lhes especialmente.

A todos os meus amigos do laboratório, em especial, às minhas amigas Marta Martins, Vanoushe Rahemi, pela vossa amizade e pela ajuda prestada nesta fase.

Aos Sr. (s) Eng. (s) e Sra. (s) Eng. (as), que me apoiaram e contribuíram para a minha formação durante este percurso académico, tanto no que diz respeito aos conhecimentos técnico- científicos, como também quanto aos sociais.

A todos os amigos e colegas, que me incentivaram, ajudaram e contribuíram para o fim desta etapa da minha vida.

A Deus por dar-me o pão e a luz da vida em cada dia que o sol nasce...

Resumo

O biodiesel é uma fonte de energia renovável, que se pode obter pela transformação dos resíduos domésticos, e é ambientalmente inócuo, e fácil de transportar, pois tem um ponto de fulgor elevado.

Atualmente tem-se focado a atenção nos efeitos da oxidação do biodiesel causados pelo contato com o ar ambiente durante o seu armazenamento. Os produtores, fornecedores e consumidores, pretendem garantir que a qualidade do biodiesel e das suas misturas com combustíveis destilados do petróleo, mantém-se durante longos períodos de armazenamento. A maioria dos óleos vegetais e das gorduras animais, usados como matéria – prima, são triacilgliceróis com grupos ácido gordos de cadeia longa (C16 – C18) ligados por ligações éster a uma estrutura de glicerol.

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência do ácido gálico e seus derivados alquilo ésteres aumentando a resistência relativa à oxidação do ácido linoléico, inibindo a peroxidação ácido gordos de cadeia longa insaturados.

Outro objetivo foi estudar a taxa de inibição da auto-oxidação do ácido linoleico.

Foi, ainda estudado o efeito que a concentração do antioxidante, tinha na estabilidade do ácido linoleico. No caso do ácido gálico verificou-se que o aumento para o dobro da concentração do antioxidante utilizada, obteve-se quase o dobro da taxa de inibição da oxidação do ácido linoleico.

A auto-oxidação de ácido linoleico é acompanhada pela formação do seu dieno conjugado, o qual foi medido sua absorvância, durante 7 dias, por espectrofotometria de absorção UV a 234 nm. Uma diminuição da taxa de formação de dieno conjugado, indica o aumento da atividade antioxidante do composto adicionado à micela de ácido linoleico.

Os resultados obtidos permitem concluir que de todos os antioxidantes testados o galhato de butilo é o que possibilita uma maior inibição da oxidação do ácido linoleico para as duas concentrações de antioxidantes testadas (0,1 mM e 1mM), obteve-se uma percentagem de inibição do ácido linoleico de 54,0% e 63,6%, respetivamente.

O estudo comparativo da estabilização do ácido linoleico com o antioxidante de referência, o butil -hidroxitolueno, mostrou que este composto tem um poder de estabilização inferior a qualquer dos antioxidantes estudados.

Os resultados deste estudo demonstraram que a utilização de compostos fenólicos, em especial o galhato de butilo, constitui uma boa alternativa para a estabilização de matrizes lipídicas, nomeadamente de combustíveis como o biodiesel.

Palavras-chave: antioxidantes, ácido gálico, biodiesel, autoxidação, ácido linoleico.

Abstract

Biodiesel is a renewable fuel that is derived from domestic feedstock and described to be environmentally innocuous and safe to handle because it has a relatively high flash point.

Currently, it has focused attention on the effects of biodiesel oxidation caused by contact with ambient air during storage. The manufacturers, suppliers and consumers want to ensure that the quality of biodiesel and their mixtures with petroleum distillate fuels, maintained for long storage periods. Most vegetable oils and animal fats, used as raw material, are triacylglycerols with fatty acid groups of long chain (C16 - C18) connected by ester linkages to a structure glycerol.

The aim of this study was to examine the effectiveness of gallic acid and its alkyl esters derivatives in increasing the relative resistance to oxidation of linoleic acid by inhibiting unsaturated long-chain fatty acid peroxidation.

Also, another aim, was to study the rate of inhibition of the linoleic acid autoxidation.

The effect that concentration of the antioxidant had on the linoleic acid stability was investigated. Phenolic acids showed that the increase for the double of concentration resulted in improvement for the double on the the rate of inhibition of oxidation of linoleic acid.

The linoleic acid autoxidation is accompanied by the formation of its conjugated diene, which absorbance was measured, for 7 days, by UV absorption spectrophotometry at 234 nm. A decrease in the rate of conjugated diene formation, indicate the increase of antioxidant activity of the compound added to the micelle of linoleic acid.

The results obtained indicate that of all antioxidants tested the best antioxidant inhibiting the oxidation of linoleic acid is butyl gallate. Thus, for the two concentrations of antioxidants tested (0.1 mM and 1 mM), was obtained a percentage of linoleic acid inhibition of 54.0% and 63.6%, respectively.

The comparative study of stability of linoleic acid with the reference antioxidant, butylhydroxytoluene, showed that this compound has a stabilizing power less than any of the antioxidants studied.

The results of this study demonstrated that the use of phenolic compounds, especially butyl gallate, provides a good alternative for the stabilization of lipid matrices, such as biodiesel fuel.

Keywords: antioxidants, gallic acid, biodiesel, auto – oxidation, linoleic acid.

Índice

1.	Introdução	1
1.1.	Enquadramento	1
1.2.	História do biodiesel	2
1.3.	Características do biodiesel	4
1.3.1.	Composição química dos ácidos gordos - influência no biodiesel	4
1.3.2.	Produção do Biodiesel	7
1.3.3.	Oxidação do Biodiesel	9
1.4.	Antioxidantes	12
1.4.1.1.	Antioxidantes Naturais	12
1.4.1.2.	Antioxidantes Sintéticos	13
1.4.2.	Compostos fenólicos	14
1.5.	Métodos analíticos para avaliar a estabilidade oxidativa do biodiesel	17
1.5.1.	Análise por Teste de Rancimat	17
1.5.2.	Análise por cromatografia gasosa e cromatografia líquida	17
1.5.3.	Análise por técnicas termoanalíticas	18
1.5.4.	Análise por espectrofotometria Ultravioleta-visível	19
1.5.4.1.	Absorvância específica no UV a 232 e 270 nm	19
1.6.	Bibliografia:	20
2.	Procedimento experimental	27
2.1.	Reagentes	27
2.2.	Equipamento	28
2.3.	Preparação da solução tampão de fosfato de pH 6,9	29
2.4.	Preparação da emulsão	29
2.5.	Preparação das soluções-mãe de antioxidante	30
2.6.	Avaliação da influência do antioxidante na oxidação do ácido linoleico	30
2.6.1.	Preparação das misturas para análise	30
2.6.2.	Análise das soluções por espectrofotometria de ultravioleta - visível	31
2.7.	Bibliografia:	33
3.	Resultados e Discussão	35
3.1.	Avaliação do efeito dos antioxidantes na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico	35
3.2.	Bibliografia:	45
4.	Conclusões e Sugestões para trabalho futuro	47

Índice Figuras

Figura 1.1	Estruturas de ácidos gordos de origem natural	5
Figura 1.2	Reação de transesterificação	7
Figura 1.3	Mecanismo de oxidação do éster do ácido linoleico	10
Figura 1.4	Estrutura química do ácido benzoico e alguns dos seus derivados	12
Figura 1.5	Estabilização por ressonância do radical fenóxilo	15
Figura 1.6	Oxidação ácidos gordos poli - insaturado – formação hidroperóxido	19
Figura 2.1	Reação de esterificação de Fisher	28
Figura 2.2	Espectrofotómetro de ultravioleta - visível (UV – VIS) usado nos ensaios experimentais.	29
Figura 2.3	Estufa usada nos ensaios de estabilidade oxidativa a 50 °C	29
Figura 2.4	Soluções preparadas para cada antioxidante.	31
Figura 3.1	Estudo da influência do ácido gálgico (0,1mM) na estabilidade termo -- oxidativa do ácido linoleico.	34
Figura 3.2	Estudo da influência do ácido gálgico (1 mM) na estabilidade termo -- oxidativa do ácido linoleico.	34
Figura 3.3	Estudo da influência do butil - hidroxitolueno (0,1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.	35
Figura 3.4	Estudo da influência do butil - hidroxitolueno (1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.	35
Figura 3.5	Estudo da influência do galhato de metilo (0,1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.	36
Figura 3.6	Estudo da influência do galhato de metilo (1 mM) na estabilidade termo – oxidativa do ácido linoleico	36
Figura 3.7	Estudo da influência do galhato de etilo (0,1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.	37
Figura 3.8	Estudo da influência do galhato de etilo (1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico	37
Figura 3.9	Estudo da influência do galhato de propilo (0,1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.	38
Figura 3.10	Estudo da influência do galhato de propilo (1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.	38
Figura 3.11	Estudo da influência do galhato de butilo (0,1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.	39
Figura 3.12	Estudo da influência do galhato de butilo (1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.	39
Figura 3.13	Estabilização por efeito de ressonância do radical fenóxilo formado a partir do ácido gálgico	44

Índice Tabelas:

Tabela 1.1	Teor em ácidos gordos de alguns óleos vegetais	5
Tabela 2.1	Preparação das soluções - mãe dos diferentes antioxidantes em água desionizada.	30
Tabela 3.1	Percentagem de inibição do ácido linoleico por parte dos diferentes antioxidantes em estudo para as duas concentrações testadas (0,1 mM e 1 mM).	42

Índice de siglas

Abs –absorvância

AL – ácido linoleico

AG – ácido gálgico

BHA – butil-hidroxianisol

BHT-butil-hidroxitolueno

CC – cromatografia em coluna

EDTA ácido etilenodiaminotetraacético

GB – galhato de butilo

GE – galhato de etilo

GM – galhato de metilo

GP – galhato de propilo

HPLC – high pressure liquid chromatography

I.O – inibição oxidativa

I.V – infravermelho

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

nm – nanómetro

R.M.N –Ressonância magnetic nuclear

TBHQ – terc – butil hidroquinona

TLC – thin layer chromatography

UV- ultravioleta visível

1. Introdução

1.1. Enquadramento

A maior parte da energia consumida no mundo provém de fontes fósseis, como o petróleo, o carvão e o gás natural. Como são fontes limitadas e com previsão de esgotamento num futuro relativamente próximo a busca por fontes alternativas de energia é de máxima importância.

Perante a necessidade crescente e atual de procura por fontes de energia limpas e renováveis, o estudo e produção de biocombustível, tem-se apresentado como uma alternativa viável para a resolução de problemas como a poluição e o efeito de estufa [1].

Dos diversos biocombustíveis atualmente usados, destaca-se o biodiesel, que é definido, quimicamente, como éster mono alquílico de ácidos gordos derivados de óleos ou gorduras, de ocorrência natural, produzido através da reação de transesterificação de triglicerídeos com etanol ou metanol, na presença de um catalisador ácido ou básico [2].

A diretiva de 2003/30/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 8 de maio de 2003 relativa à promoção da utilização de biocombustíveis ou de outros combustíveis renováveis nos transportes, define no seu artigo 2º, os biocombustíveis, como sendo o combustível líquido ou gasoso – biomassa, bio etanol, o biodiesel e o biogás.

Um dos principais problemas relativos à utilização de biocombustíveis depreende-se com a dificuldade de assegurar as características e a qualidade destes. Assim, fatores como o tempo de armazenamento, exposição ao calor, oxigénio, presença de traços de metais e de peróxidos podem acelerar os processos oxidativos e afetar a sua qualidade.

Desta forma é fundamental a procura de soluções tecnológicas que permitam reduzir os processos de degradação do biodiesel e aumentar o período de armazenamento sem ocorrer perda das características do mesmo.

1.2. História do biodiesel

A história do biodiesel teve início nos finais do século XIX, quando Rudolf Diesel descobriu que os óleos vegetais poderiam ser utilizados como combustíveis. Em 1893, Rudolph Diesel desenvolveu o primeiro modelo do motor a diesel que funcionou de forma eficiente, tendo sido registrada a primeira patente deste tipo de motor [3].

Os primeiros motores eram de tipo injeção por compressão. Nessa época eram alimentados por petróleo filtrado, óleos vegetais e óleos de peixe. Depois na década de 20, foram criados os motores de injeção direta, passando a ser usado gasóleo (combustível mineral cujo preço era inferior ao destes óleos). Posteriormente foram evoluindo, sendo utilizado somente **diesel** mineral, deixando de se usar diretamente óleos vegetais como combustíveis, devido à grande viscosidade destes [4].

Ao longo do tempo foram sendo desenvolvidas várias tecnologias para o aproveitamento de óleos vegetais como combustível. Assim e desde o final do século XVIII que se utiliza a transesterificação de óleos vegetais, para produzir glicerina, usada na produção de sabões [4], sabonetes e cosmética. Os subprodutos dessa reação, são os ésteres metílicos e etílicos que compõem o biodiesel. Os produtos desta transesterificação são 80-90% biodiesel e 10-20% de glicerina [4].

A procura mundial de produtos derivados do óleo vegetal tem aumentado fortemente nos últimos anos. Este interesse acrescido resulta de fatores tais como:

- os conflitos entre países e crises de abastecimento, durante as duas guerras mundiais .
- o aumento do preço do petróleo, as razões ambientais (efeito estufa) e o fornecimento de subsídios para o desenvolvimento de combustíveis de fontes renováveis durante os vários choques petrolíferos do século XX.
- Aparecimento/desenvolvimento de motores, com bombas de injeção ciclo-rotativas e de injeção eletrônica, fazendo desse biocombustível o concorrente ao diesel mineral derivado do petróleo.

Atualmente estes combustíveis, já são adicionados nos combustíveis atuais e prevê-se que essa quantidade aumente [4].

A importância dos biocombustíveis advém, também da Diretiva Europeia 2003/30/CE, a que Portugal está vinculado, que visa, até 2020, a substituição de 20% dos combustíveis tradicionais (gasóleo e gasolina) do setor do transporte rodoviário por biocombustíveis, sendo que essa substituição será obtida com a contribuição de 5,75 % de biocombustíveis até 2010 e pelo menos 8 % até 2020 [5].

Com a publicação do Decreto-Lei nº 62/2006, de 21 de março, foi transposta para a legislação nacional a Diretiva 2003/30/CE [6]. Este Decreto “visa a colocação no mercado de biocombustíveis e de outros combustíveis renováveis, em substituição dos combustíveis fósseis”. Com o Decreto-Lei nº 66/2006, os objetivos estabelecidos para a incorporação mínima de biocombustível no mercado eram de 2% para o ano de 2006, 3% para o ano de 2007 e 5,75% (em média anual) para o período de 2008 a 2010. A Resolução do Conselho de Ministros n.º 21/2008 de 7 de janeiro ajustou estes objetivos para 1,75% em 2009, 4,25% em 2010, 6,5% em 2011 e 10% em 2012 [6].

A Galp que produz 95% do gasóleo vendido em Portugal atualmente já incorpora 5% de biodiesel no gasóleo vendido. Previa-se o aumento de incorporação no **diesel** até 10%, para 2012) O objetivo da Galp é a utilização de 25% de biodiesel incorporado nos combustíveis até 2030 [4].

Quanto à comercialização do biodiesel o governo Português aprovou, em março de 2006, a isenção parcial e total do imposto sobre os produtos petrolíferos e energéticos (ISP) aos biocombustíveis, sendo os seus custos de produção ainda elevados relativamente ao diesel convencional. Contudo, essa isenção deixou de estar em vigor a partir do ano de 2011 para os biocombustíveis que são incorporados na gasolina e no gasóleo [7].

1.3. Características do biodiesel

A utilização de biodiesel é uma alternativa aos combustíveis convencionais, pois possui propriedades físico-químicas e térmicas semelhantes às do gasóleo. O biodiesel pode ser utilizado diretamente em motores diesel, desde que os materiais das juntas, vedações e tubagens sejam compatíveis, ou em mistura com o gasóleo em proporções que podem ir até 20% sem necessidade de qualquer alteração no motor [5].

O biocombustível em questão apresenta vantagens lubrificantes, mesmo em misturas tão baixas como 2 a 3%. Os benefícios ambientais relacionados com a utilização de biodiesel são tanto maiores quanto maior for a percentagem de biodiesel na mistura. Além disso, incluem a diminuição de emissões para a atmosfera de CO e de CO₂, de SO_x, partículas e hidrocarbonetos [8].

A emissão dos gases resultantes da combustão dos motores que utilizam biodiesel, não contém óxidos de enxofre, que são os principais causadores da chuva ácida. As matérias-primas usadas para a produção do biodiesel captam o CO₂ da atmosfera durante o período de crescimento e só parte deste é libertado durante a combustão no motor, o que contribui para controlar o efeito de estufa. Assim, o uso de biodiesel como combustível possibilita melhorias ambientais, proporcionando a fixação do CO₂, diminuição da poluição e do efeito estufa [9].

Comparando com outros países da Europa, em Portugal os recursos para a produção das matérias-primas tradicionais, utilizadas na produção de biodiesel (colza, girassol e soja) são escassos. Assim, a investigação procura novas matérias-primas disponíveis adequadas à transformação em biodiesel, como os óleos alimentares usados na fritura e resíduos de origem animal (sebo) [10].

1.3.1. Composição química dos ácidos gordos - influência no biodiesel

Os ácidos gordos são caracterizados por terem cadeias lineares que podem ser saturadas (sem duplas ligações) ou insaturadas (com duplas ligações). Os óleos, apresentam ácidos gordos livres que são responsáveis pela sua acidez.

Os ácidos gordos classificam-se como: saturados, monoinsaturados e polinsaturados.

O comprimento das cadeias de carbono nos óleos e gorduras variam entre 4 e 24 átomos de carbono e podem conter até três ligações duplas, representadas simbolicamente por C - n:p, sendo n o número de átomos de carbono da cadeia e p o número de ligações duplas [11].

Os saturados mais abundantes são o ácido láurico (C-12:0), o ácido palmítico (C-16:0) e o ácido esteárico (C-18:0). Quanto aos monoinsaturados mais importantes pode-se referir o ácido oleico (C-18:1) e o ácido erúico (C-22:1). Relativamente aos polinsaturados salientam-se o ácido linoleico (C-18:2) e o ácido linolénico (C-18:3).

Fisicamente, as gorduras e os óleos são diferentes pois as primeiras são sólidas à temperatura ambiente e os segundos são líquidos. A diferença de propriedades é, determinada pela composição em ácidos gordos e pelo grau de insaturação destes.

A figura 1.1, apresenta algumas estruturas de ácidos gordos de origem natural:

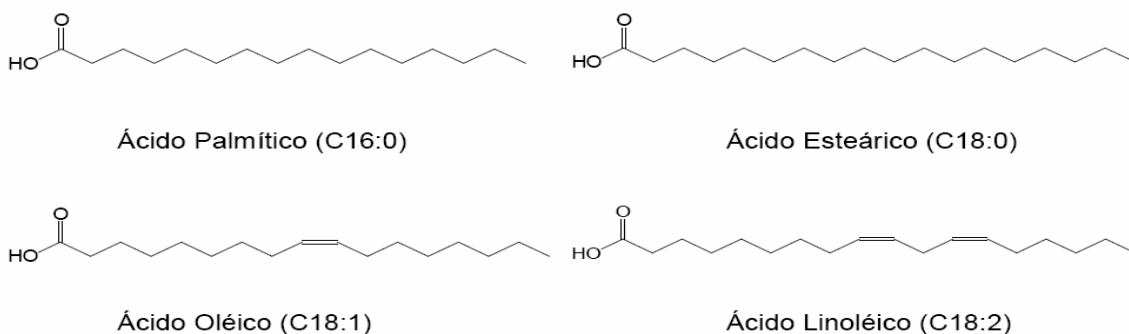


Figura 1.1 - Estruturas de ácidos gordos de origem natural [adaptado de 12].

Na tabela 1.1 apresenta-se, de forma resumida, a composição em ácidos gordos de alguns dos óleos vegetais mais comuns.

Observa-se que o ácido oleico e o ácido linoleico, são os principais constituintes da maior parte dos óleos vegetais.

Tabela 1.1- Teor em ácidos gordos de alguns óleos vegetais [adaptado de13].

Ácido gordos	Óleo de Soja	Sementes de algodão	Óleo de palma	Banha de porco	sebo	óleo de coco
Ácido láurico	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	46,5
Ácido mirístico	0,1	0,7	1,0	1,4	2,8	19,2
Ácido palmítico	10,2	20,1	42,8	23,6	23,3	9,8
Ácido esteárico	3,7	2,6	4,5	14,2	19,4	3,0
Ácido oleico	22,8	19,2	40,5	44,2	42,4	6,9
Ácido linoleico	53,7	55,2	10,1	10,7	2,9	2,2
Ácido linolénico	8,6	0,6	0,2	0,4	0,9	0,0

A estabilidade à oxidação é um parâmetro importante para o controle da qualidade do biodiesel. O processo de degradação oxidativa deste depende da natureza dos ácidos gordos usados na sua produção, do grau de insaturação dos ésteres que o compõe, assim como a humidade, temperatura e absorção de luz [14].

Assim, a instabilidade oxidativa do biodiesel é devida ao facto deste ter um alto teor de ésteres insaturados, podendo estes ser facilmente oxidados, nomeadamente o linoleato de metilo (C18:2) e o linolenato de metilo (C18:3). Além disso, dão origem à formação de compostos de decomposição como ácidos, aldeídos, ésteres, cetonas, peróxidos e álcoois [15]. Estes produtos não afetam somente as propriedades do biodiesel, mas também criam problemas ao motor, no que diz respeito ao seu funcionamento [16]. Esta instabilidade é um obstáculo à aceitação do biodiesel pelos fabricantes de motores, assim como ao aumento do mercado para esse combustível [17].

As cadeias de ácidos gordos possuem vários níveis de insaturação, com duplas ligações em configuração *cis*. Quando existem múltiplas insaturações, estas não se encontram conjugadas, mas sim separadas por um grupo metileno. Tais grupos adjacentes a duas insaturações são locais de oxidação muito reativos, pois sofrem uma rápida isomerização formando-se estruturas conjugadas estáveis. Por último, estas reagem diretamente com o oxigénio, originando peróxidos [18].

A rancificação oxidativa não acontece com ácidos gordos saturados, pois a formação de radicais livres, é energeticamente desfavorável. A rancidez nos óleos é causada pela existência de ácidos gordos insaturados (o ácido oleico, linoleico e linolénico).

A oxidação advém de sucessivas reações radicalares, as quais acontecem nas insaturações dos ésteres das cadeias gordas, em contacto com o oxigénio atmosférico, sendo acelerada pela presença de iões metálicos, luz, temperatura, radiação ionizante e outros agentes oxidantes, de modo a formar peróxidos e, conseqüentemente, outros produtos oxidativos [14].

Os ácidos gordos diferem no tamanho da cadeia hidrocarbonada, no número de insaturações e na presença de grupos químicos. Estes alteram as características do combustível produzido.

Para medir o tempo de atraso na ignição de combustíveis para motores do ciclo **diesel**, estabeleceu-se uma escala – designada por escala de cetanos.

O hexadecano (cetano) é adotado como padrão, sendo o seu valor igual a 100 na escala de cetano, enquanto para o 2,2,4,4,6,8,8-heptametilnonano é atribuído o valor igual a 15 [19]. Em relação ao número de cetanos, quanto menor o número de insaturações nas moléculas, maior o número de cetano do combustível, melhorando a ignição do motor. Além disso, aumenta com o comprimento da cadeia carbonada não ramificada.

Comparado com o **diesel** mineral, o biodiesel possui maiores valores de número de cetanos.

Quanto maior for a cadeia hidrocarbonada, maior a lubricidade do combustível. O número de cetano é indicativo da qualidade de ignição do combustível e a lubricidade é uma medida do poder de lubrificação.

A baixa temperatura, o biodiesel tende a solidificar ou a diminuir a sua fluidez, interrompendo o fluxo do combustível e entupindo o sistema de filtração, dificultando a ignição do motor. O aumento da cadeia hidrocarbonada causa um maior ponto de névoa (temperatura em que o líquido, por refrigeração, começa a formar os primeiros cristais de cera) e um maior ponto de entupimento de filtro a frio (temperatura em que o combustível perde a sua filtrabilidade quando é arrefecido).

1.3.2. Produção do Biodiesel

O biodiesel é uma mistura de ésteres alquílicos de cadeia linear, obtida principalmente a partir da transesterificação dos triglicerídeos de óleos e gorduras com álcoois de cadeia curta. Esta reação tem como coproduto o glicerol, sendo o produto principal

uma mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos (biodiesel, designado também por *FAME - Fatty Acid Methyl Ester*) (Figura 1.2).

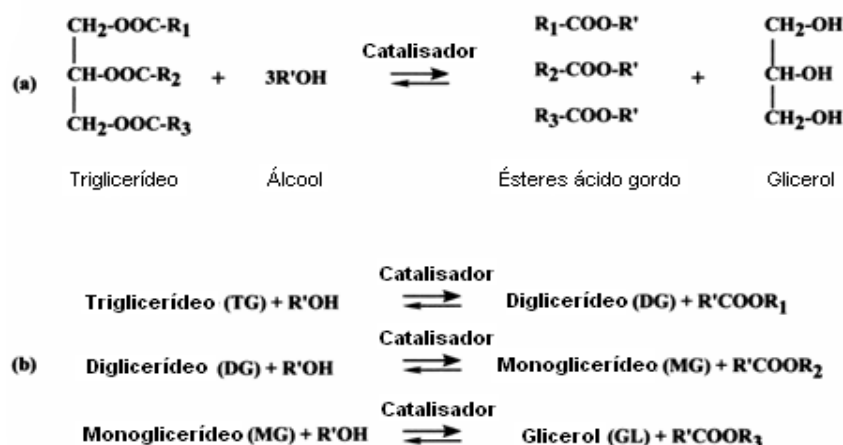


Figura 1.2 Reação de transesterificação; a) Equação Global; b) Reações consecutivas e reversíveis [20].

A reação de transesterificação de óleos ou gorduras é executada na presença de catalisadores ácidos, básicos ou enzimáticos. Os catalisadores mais utilizados são os catalisadores alcalinos, que são mais eficientes, obtendo-se maiores rendimentos. De entre os catalisadores básicos, os alcóxidos são os mais ativos, obtendo-se rendimentos superiores a 98% na reação de transesterificação. Contudo estes são muito sensíveis à presença de água. O hidróxido de sódio e de potássio, apesar de menos ativos, têm menor custo, possibilitando altos rendimentos, sendo por isso os mais utilizados.

No que diz respeito aos álcoois aplicados na transesterificação de óleos e gorduras, o metanol e o etanol são os mais utilizados. O metanol é mais usado na produção de biodiesel em escala comercial e, por ser mais reativo, implica uma menor temperatura e tempo de reação. O metanol tem maior polaridade que o etanol, intervindo na separação dos ésteres da glicerina e de outros contaminantes. Também retém menor teor de água comparativamente ao etanol.

O etanol é menos tóxico, é renovável e produz biodiesel com maior número de cetano e lubricidade. No entanto, este causa uma maior dispersão da glicerina no biodiesel, dificultando a sua separação. De fato, para conseguir grandes rendimentos na reação de transesterificação aplica-se um excesso de álcool e remove-se a glicerina, deixando o óleo menos espesso, diminuindo a sua viscosidade.

O biodiesel comparado com o *diesel* mineral, apresenta vantagens e inconvenientes na sua utilização. No que diz respeito ao primeiro, este apresenta vantagens no que

concerne à toxicidade, poluição, preço, conservação do motor, menor ponto de fulgor, sustentabilidade, biodegradabilidade e contribuição para a reciclagem de resíduos quando comparado com o petrodiesel. No entanto, também apresenta alguns inconvenientes, nomeadamente no funcionamento do motor em climas frios, limitações de utilização em alguns carros, disponibilidade nos postos de abastecimento.

1.3.3. Oxidação do Biodiesel

O biodiesel, como foi referido anteriormente é um combustível derivado de óleos e gorduras, podendo ser oxidado quando em contacto com o ar e mesmo exposto à luz. O fenómeno de oxidação ocorre a partir da reação do oxigénio com os ácidos gordos insaturados dos óleos ou gorduras, desencadeando a formação de peróxidos e hidroperóxidos que podem atuar em reações de degradação.

Os óleos e gorduras, por serem constituídos por triglicéridos, são suscetíveis de sofrer oxidação. Estes apresentam na estrutura duplas ligações com elevada concentração eletrónica [21]. A mudança da posição da ligação dupla juntamente com a estabilidade, por ressonância causa isómeros de hidroperóxidos. A quantidade de isómeros varia de acordo com o número de insaturações sendo igual a 2^{n-2} [22].

A oxidação nos óleos e gorduras, tanto de origem animal como vegetal, e os produtos deles originados, são afetados pelos seguintes fatores: presença de ácidos gordos insaturados, luz, temperatura, pH, radicais livres, iões metálicos e, por último das suas condições de armazenamento.

É de referir, que os principais fenómenos desencadeados, a partir dos fatores acima referidos, são a foto-oxidação e a auto-oxidação. O primeiro associa-se à presença da luz e, o segundo ocorre quando em contacto com o ar.

A degradação por foto-oxidação é devida à adição direta de oxigénio singlete (1O_2) aos ácidos gordos insaturados. Este último, reage diretamente com as duplas ligações existentes no óleo, dando origem a hidroperóxidos conjugados e não conjugados. A formação deste oxigénio singlete é causada pela existência de um foto - sensibilizador e pelo contato com a luz. Clorofilas e compostos do tipo heme contendo ferro são foto sensibilizadores que existem nos óleos vegetais [14].

A auto-oxidação é o tipo de mecanismo de oxidação, predominante dos óleos e gorduras [23] essa reação processa-se com energia de ativação muito baixa (4-5 kcal

mol^{-1}) [24]. No caso da degradação por auto-oxidação, dão-se reações radiculares que se auto propagam e que dependem do tipo de reação catalítica. A quantidade e tipo de substrato e as interações entre substâncias radiculares vão influenciar a extensão da reação.

A seguir, será ilustrada a (figura 1.3), que mostra o processo de auto-oxidação dos lípidos [25].

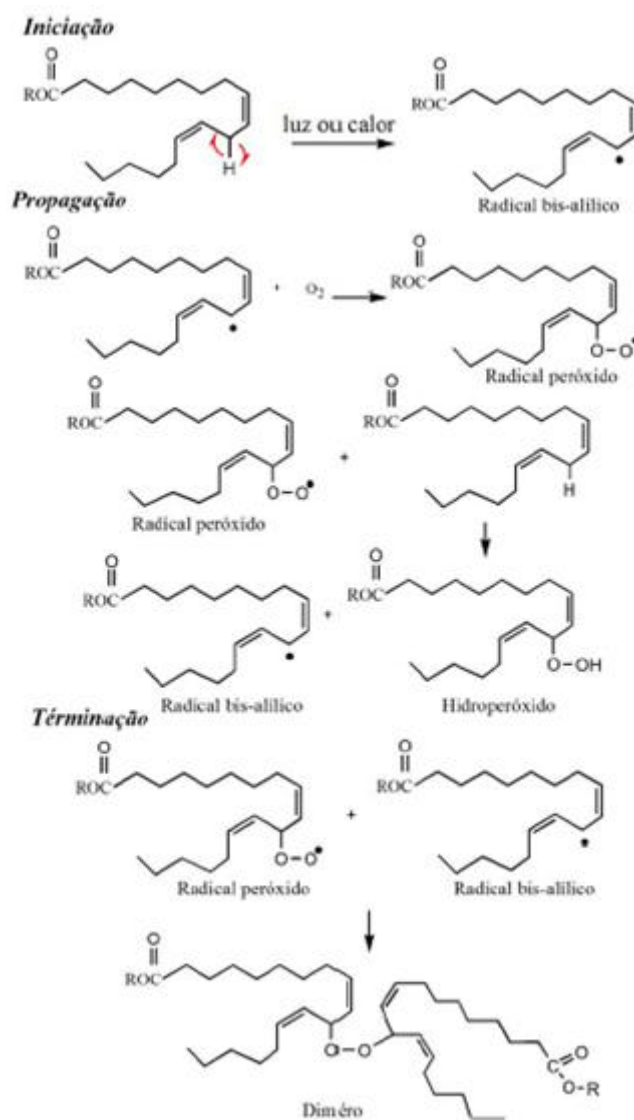


Figura 1.3 Mecanismo de oxidação do éster do ácido linoleico [adaptado de 25].

A auto-oxidação é devida à reação do oxigênio com os ácidos gordos insaturados, acontecendo em três etapas:

- Iniciação - acontece a formação de radicais livres a partir duma molécula de ácido gordo insaturado, devido ao sequestro de um hidrogênio do carbono

alílico na molécula do ácido gordo, “em condições favorecidas por luz e calor” [26]. Estas reações ocorrem devido á ação direta do oxigénio singleto (1O_2).

- Propagação - os radicais que são sujeitos ao ataque pelo oxigénio atmosférico são convertidos noutros radicais (peróxidos). Estes reagem com o ácido gordo originando hidroperóxidos.

Formam-se os produtos primários da oxidação (peróxidos e hidroperóxidos). A entalpia dessa etapa da reação é baixa comparada com a entalpia da iniciação. Por causa desse fator, as reações nesta etapa são muito rápidas, pois o sequestro do hidrogénio do ácido gordo, pelo radical peróxido (ROO^*), para a formação do radical hidroperóxido ($ROOH$) e do radical livre (R^*), ocorre preferencialmente nos carbonos onde a energia de dissociação das ligações é baixa, como o hidrogénio do grupo metileno entre dois grupos alcenos do ácido gordo polinsaturado (posição dialílica) [27]. Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando num processo autocatalítico [26].

Terminação – Pela combinação de dois radicais, originam-se produtos estáveis (produtos de oxidação secundária). Estes resultam da cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis) [28]

Esta etapa caracteriza-se por modificações na viscosidade, cor e na composição do óleo podendo originar odor e sabor fortes.

Os produtos que se obtêm através da decomposição dos hidroperóxidos, afetam a qualidade deste biocombustível. Esta decomposição dos hidroperóxidos obtidos da reação da molécula lipídica com o oxigénio usando catalisadores (temperatura elevadas, luz) é a rota predominante de formação de radicais livres. A oxidação de ácidos gordos polinsaturados, usando catalisadores enzimáticos, é outra possibilidade de formação dos hidroperóxidos.

A estabilidade oxidativa é descrita como a resistência da amostra à oxidação (ou rancidez oxidativa). Ela é definida pelo período de indução – tempo entre o início da medição e o instante em que acontece um aumento brusco na formação de produtos da oxidação que é expresso em horas.

O período de indução (atualmente designado de índice de estabilidade oxidativa), é um parâmetro comparativo aplicado para controle de qualidade de matérias-primas e de processo para se avaliar diferentes tipos de óleos para fritar, modificações na composição em ácidos gordos e eficiência da adição de antioxidantes. [29].

Para determinar a resistência à oxidação, são utilizados métodos instrumentais de análise, que monitorizam a amostra na tentativa de estimar o tempo de vida de armazenamento (condições de envelhecimento) destes produtos. Os métodos usados mais comuns implicam a utilização de metodologias como: Espectrofotometria de UV-Vis, condutimetria (teste de Rancimat), calorimetria diferencial de varrimento (DSC), espectrometria de infravermelho e a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). A utilização destes métodos permite determinar o período de indução, isto é, o tempo para se atingir nível de rancidez detetável ou alteração na razão de oxidação [30]. Alguns destes métodos serão desenvolvidos no capítulo 1.5.

É possível bloquear a formação de radicais livres através da utilização de substâncias antioxidantes, que, em pequenas doses, interferem nos processos de oxidação de lípidos [31]. Estas substâncias (compostos fenólicos) permitem a estabilização do radical livre por deslocalização eletrônica no anel aromático (efeito de ressonância), impossibilitando assim a propagação de reações radicalares oxidativas no meio [32].

1.4. Antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias que retardam ou diminuem a formação de aldeídos, peróxidos, cetonas, dímeros e polímeros, aquando da oxidação de óleos e gorduras. Os antioxidantes agem retardando a etapa inicial da autooxidação (formação de radicais livres), removendo-os do meio, e da propagação na foto – oxidação (formação de hidroperóxidos [32].

1.4.1.1. Antioxidantes Naturais

Os antioxidantes naturais podem ser encontrados em grãos, frutas e legumes. Como exemplos temos: o ácido ascórbico, o α – tocoferol e os compostos fenólicos existentes plantas, vinho tinto, cerveja e outros alimentos.

Dos antioxidantes utilizados, neste trabalho (ácido gálgico, galhato de metilo, galhato de etilo, galhato de propilo, galhato de butilo e butil-hidroxitolueno), o ácido gálgico é um composto natural e os outros são sintetizados a partir do ácido gálgico.

Encontram-se classificados em dois grupos: os flavonoides e os ácidos fenólicos (ácidos benzoicos, fenilacéticos, cinâmicos).

O grupo formado pelos ácidos benzoicos, têm na sua estrutura sete átomos de carbono (C_6-C_1). (Figura 1.4)

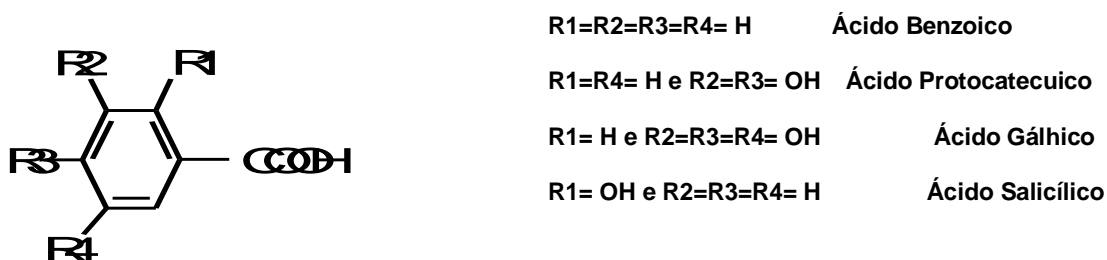


Figura 1.4 Estrutura química do ácido benzoico e de alguns dos seus derivados [33].

1.4.1.2. Antioxidantes Sintéticos

Alguns oxidantes sintéticos têm sido usados, para prevenir a oxidação de lípidos. Os mais utilizados são o butil - hidroxitolueno (BHT), o butil - hidroxianisol (BHA), o galhato de propilo (GP) e o terc – butil-hidroquinona (TBHQ).

A utilização de antioxidantes e os seus mecanismos funcionais têm sido estudados e podem ser classificados em primários, sinergistas, sequestradores de oxigénio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos [33].

Os antioxidantes primários têm a capacidade de inibir a oxidação de diversos substratos, desde as moléculas simples até aos polímeros e os biosistemas complexos, através de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que permitem a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais essenciais na etapa de propagação, como alcóxilo e peróxilo, pela doação de átomos de hidrogénio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia [34,35]. Os antioxidantes mais utilizados deste grupo são os compostos fenólicos sintéticos, tais como: butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e galhato de propilo (PG) [33].

Os galhatos de propilo (E-310), de octilo (E-311) e de dodecilo (E-312), são usados como antioxidantes, desde a década de quarenta do século passado. Estes antioxidantes são pouco resistentes a altas temperaturas, necessitando da adição de outros antioxidantes, como o butil-hidroxianisol (E-320) ou o butil-hidroxitolueno (E-321), para serem eficazes na proteção de óleos e gorduras alimentares. Relativamente

ao BHA, resiste bem a altas temperaturas sem se decompor nem evaporar ao invés dos galhatos e do BHT [36].

Canakci e colaboradores [37] testaram a influência do antioxidante TBHQ no índice de peróxido de ésteres metílicos de óleo de soja durante período de armazenagem e encontraram bons resultados quanto ao aumento da estabilidade. Segundo Dunn, a utilização dos antioxidantes TBHQ e α -tocoferol, retardam a degradação oxidativa destas amostras de óleo [38].

Noutro grupo de antioxidantes, encontram-se as substâncias sequestradoras diretas de oxigênio, que é um substrato importante para a ocorrência de oxidação lipídica. O ácido ascórbico é um exemplo deste importante tipo de antioxidantes [39].

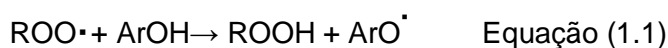
Os antioxidantes sinérgicos, também designados por quelantes de metais, possuem a função de se ligar a cátions metálicos (cobre e ferro os quais catalisam a oxidação lipídica) existentes nos alimentos, impedindo-os de desencadear reações de oxidação. Os mais usados são o ácido láctico (E-270), ácido cítrico, EDTA e os ortofosfatos de sódio, de potássio, cálcio e de magnésio [36]. A reação de complexação ocorre devido à presença de um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular.

A comparação e avaliação da estabilidade oxidativa e da eficácia antioxidante em sistemas lipídicos, deve considerar, por um lado quais as condições de oxidação utilizadas e por outro, o método analítico e o indicador de oxidação escolhido. A eficácia dos vários compostos na proteção dos sistemas lipídicos deve ser comparada na mesma concentração molar e em relação a padrões puros (e.g. BHT, BHA, tocoferol) [28].

1.4.2. Compostos fenólicos

Antioxidantes fenólicos, funcionam como sequestradores de radicais e por vezes como quelantes de metais, [40] atuando tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo [41].

O mecanismo da reação deste tipo de antioxidantes pode ser descrito como:





em que: ROO[•] e R[•] são os radicais livres e ArOH o antioxidante com um átomo de hidrogénio.

Na etapa inicial da oxidação dos compostos fenólicos, forma-se um radical fenóxilo. Este radical é estabilizado através da deslocalização do eletrão desemparelhado no anel aromático. Quanto maior for a capacidade dos grupos substituintes de estabilizar o radical mais estável ele fica.

Os produtos intermediários, formados pela ação dos antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias [42]. (Figura 1.5). Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são, portanto, eficazes na prevenção da oxidação lipídica; embora, poucos são os permitidos para o uso em alimentos, devido principalmente a sua toxicidade [40].

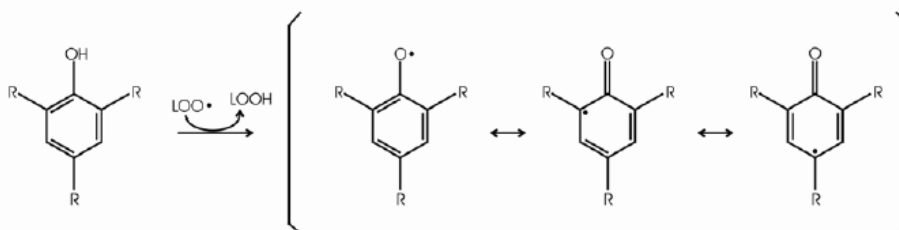


Figura 1.5 Estabilização por ressonância do radical fenóxilo [43].

Os antioxidantes podem doar um átomo de hidrogénio aos radicais livres e converter estes, em produtos mais estáveis quimicamente-regenerando assim, a molécula do acilglicerol e interrompendo o processo de oxidação. Como exemplo deste tipo de antioxidantes temos os compostos fenólicos – mono-hidroxilados e poli-hidroxilados, com várias substituições no anel.

A estrutura molecular dos polifenóis e, mais especificamente, a posição e o grau de hidroxilação do anel aromático, influencia diretamente a atividade antioxidante destes compostos, assim como sobre o seu mecanismo de ação [40]. O grupo hidroxilo presente na posição orto- com o grupo metóxilo, doador de eletrões, aumenta a estabilidade do radical fenóxilo e a eficiência antioxidante do composto [44]. Um segundo hidroxilo na posição orto ou para, também aumenta a atividade antioxidante.

O efeito da substituição sobre a atividade do anel fenólico tem sido alvo de vários estudos. A eficiência de um composto fenólico, como inibidor de oxidação é significativamente aumentada pela substituição de grupos alquila volumosos, (usualmente *tert*-butil terciário), na posição orto, e também pela substituição de um grupo alquil (atualmente o metil), na posição para [33]. Assim, quanto mais volumosos forem esses grupos, mais fácil se torna a remoção do átomo de hidrogênio, pela doação do seu eletrão, ajudando a estabilizar o radical então formado, bloqueando as reações subsequentes. Esses grupos também diminuem a oxidação direta do fenol pelo oxigênio, o qual pode diminuir a vida efetiva do inibidor [26].

Analisando a eficiência de ácidos fenólicos como antioxidantes em sistema lipídico, pela técnica do Rancimat, observa-se que os ácidos protocatequínico, cafeico, ferúlico, gálico e sinápico têm uma boa atividade [45], mas estes compostos, têm baixa solubilidade neste sistema, limitando, a sua aplicação e seu potencial antioxidante [46]. Apesar disso, estas substâncias podem ser alteradas para ficarem lipossolúveis pela alquilação ou esterificação com ácidos gordos de cadeia longa ou álcoois. Na avaliação do potencial dos ácidos cafeico, protocatequínico, *p*-hidroxibenzóico, ferúlico e *p*-coumárico no sistema lipídico, o cafeico e o protocatequínico, apresentam atividade antioxidante maior que o α -tocoferol e o BHT [47].

Existe uma relação hidrofílica/lifofílica, a qual caracteriza a solubilidade de cada antioxidante. A lipofilicidade define a afinidade de uma molécula para um meio lipofílico. Os ácidos fenólicos têm reduzida solubilidade em meio lipofílico. Pode-se incrementar esta propriedade, inserindo álcoois, ou ácidos gordos de cadeia longa [48].

Neste sentido, quanto maior a cadeia dos grupos substituintes, maior será a lipossolubilidade e maior a eficiência dos antioxidantes na estabilidade oxidativa.

Alguns estudos recentes permitiram concluir que o aumento da cadeia alquílica no grupo carboxílico, está relacionado com uma maior afinidade com a camada interna da dupla camada lipídica (hidrofóbica) [48,49].

1.5. Métodos analíticos para avaliar a estabilidade oxidativa do biodiesel

Como foi referido anteriormente, será feita uma breve descrição de alguns métodos que possibilitam determinar a resistência à oxidação de um óleo ou gordura, dando-se maior ênfase ao método utilizado neste estudo.

1.5.1. Análise por Teste de Rancimat

Durante o processo de decomposição dos ácidos gordos no mecanismo de oxidação lipídica formam-se pequenas moléculas voláteis responsáveis por maus aromas (*off-aromas*) associados ao conhecido ranço [28]. Estes produtos da oxidação são obtidos a partir de hidroperóxidos lipídicos (produtos de oxidação primários), cuja decomposição resulta da quebra das cadeias dos ácidos gordos, produzindo os compostos voláteis de baixo peso molecular (produtos de oxidação secundários) [50].

O método Rancimat, possibilita analisar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. Este método, baseia-se no registo das variações da condutividade da água destilada na qual se faz a recolha de ácidos de baixo peso molecular (ácidos fórmico e acético) resultantes da oxidação dos óleos e gorduras em condições de oxidação acelerada (alta temperatura 110°C e oxigenação intensiva) [51].

Estes ácidos são detetados através do incremento da condutividade no sistema. O tempo decorrido entre o início das medições e o incremento rápido da condutividade (causado pela formação dos produtos de oxidação), fornece-nos a quantificação do período de indução

Embora seja o método de referência proposto por vários investigadores, o método de Rancimat para avaliar a estabilidade oxidativa lipídica, é difícil de aplicar, pois implica longos tempo de análise, na determinação da capacidade antioxidante de substâncias em estudo, aumentando, os custos de análise. Além disso este método exige aquisição de equipamento dispendioso.

1.5.2. Análise por cromatografia gasosa e cromatografia líquida

A fração lipídica, existente num óleo ou gordura, pode ser analisada pela composição em ácidos gordos, mono, di e triacilgliceróis, fosfolípidos, esteróis, pigmentos e vitaminas lipossolúveis. A cromatografia gasosa é ideal para a análise de lípidos,

podendo ser usada para determinar a composição de ácidos gordos totais, distribuição e posição dos ácidos gordos, estabilidade e oxidação, detecção de adulterações e antioxidantes. Quando combinada com a espectrometria de massa, a cromatografia gasosa, possibilita a identificação dos compostos separados. A cromatografia líquida (HPLC-high pressure liquid chromatography) também se utiliza na análise de lípidos e a cromatografia em camada fina (TLC) aplica-se em ensaios de rotina, devido ao seu baixo custo e simplicidade.

A cromatografia líquida, para avaliar a estabilidade oxidativa lipídica, apesar de exigir a análise de pequenas quantidades de amostra, na determinação da capacidade antioxidante de substâncias em estudo, diminuindo, os custos de análise, exige aquisição de equipamento dispendioso

1.5.3. Análise por técnicas termoanalíticas

Os métodos termo-analíticos têm sido muito utilizados para a caracterização e para a investigação da auto-oxidação de óleos e gorduras.

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC), é uma técnica que mede a diferença entre a energia fornecida à amostra e a energia fornecida ao material de referência, (em função da temperatura), enquanto ambos os materiais, são submetidos a programação controlada de temperatura. Pode-se estudar os efeitos do calor relacionados com modificações físicas ou químicas da amostra, tais como, transições de fase (ebulição, fusão, congelamento e sublimação) ou reações de desidratação, de dissociação, de decomposição, de oxidação – redução.

Outra das técnicas possíveis de se referir é a Termogravimetria, na qual a variação de massa, (que acontece na amostra, aumento ou diminuição), está em função do tempo (a temperatura constante) ou em função da temperatura. Esta técnica, possibilita a pesagem contínua da amostra em função da temperatura, isto é, durante o seu processo de aquecimento ou arrefecimento.

Estuda-se as modificações que o aquecimento pode causar na massa das substâncias, tendo como objetivos, saber o intervalo de temperaturas, em que esta inicia, a sua decomposição, e também estudar os processos de reações de desidratação, decomposição, oxidação.

A aplicação da técnica calorimetria diferencial, na determinação da estabilidade oxidativa, permite fazer esta análise em apenas 4 horas, pois se aplicassem outras técnicas convencionais poderiam demorar 14 dias.

1.5.4. Análise por espectrofotometria Ultravioleta-visível

Os métodos quantitativos que têm como base a absorção de radiação eletromagnética estão relacionados com a medida da radiação transmitida pela amostra, a qual é proporcional à concentração da espécie que absorve a radiação, na amostra. Esta relação é descrita pela lei de Beer-Lambert [52]:

$$\log\left(\frac{I_0}{I}\right) = A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad \text{Equação (1.3)}$$

Onde I_0 e I são respectivamente, as intensidades das radiações incidente e transmitida, A a absorvância, C a concentração da espécie que absorve a radiação, l é a espessura do meio que absorve a radiação (caminho ótico da cuvete) e ε é o coeficiente de absorção molar.

A espectrofotometria no ultravioleta e visível é utilizada em análise quantitativa, por comparação das absorvâncias de padrões com as das amostras, a um comprimento de onda definido. Aplica-se esta técnica, para a determinação da estabilidade termodinâmica ou cinética de compostos.

1.5.4.1. Absorvância específica no UV a 232 e 270 nm

Os produtos da oxidação (dienos e trienos), podem ser quantificados, pelo método espectrofotométrico IUPAC número II.D.23, que possibilita a determinação da absorvância do óleo em comprimentos de onda definidos (onde a absorvância é máxima), do espectro ultravioleta e dá-nos informação do seu grau de oxidação.

A oxidação dos ácidos gordos polinsaturados acontece com a formação de hidroperóxidos e deslocamento das duplas ligações, formando-se assim dienos conjugados, que absorvem a 232 nm (fig. 1.6).

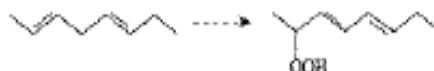


Figura 1.6 Oxidação de ácidos gordos poli - insaturados – formação de hidroperóxidos [13].

Os produtos secundários da sua oxidação, as cetonas ou as cetonas insaturadas, apresentam um máximo de absorção a 270 nm. Esta diferença é particularmente interessante, permitindo separar estados de evolução oxidativa com base na relação $A_{270\text{nm}}/A_{232\text{nm}}$: quanto maior o valor da absorvância a 232 nm, maior será o teor em peróxidos, correspondendo, assim, ao início do processo de oxidação; mas no caso, da absorvância a 270 nm, ser muito elevada, então maior será o conteúdo de produtos secundários existentes [13].

A determinação espectrofotométrica é inconveniente para a análise de meios complexos, para os quais os riscos de interferência são significativos, principalmente se existirem compostos que absorvam fortemente entre 200 e 220 nm. Nessa situação, a absorção a 232 nm, restringe-se a uma pequena banda no espectro, sendo preferível utilizar a espectrofotometria diferencial.

Segundo Ferrari e colaboradores [13] ao analisar-se a absorvância específica no ultravioleta visível a 232nm para o biodiesel de óleo de girassol, com diferentes proporções de antioxidantes, concluiu-se que a amostra controle (óleo sem antioxidante) exibiu maior teor de dienos e trienos conjugados, pois é aquela com maiores valores de absorção específica no UV a 232 nm no decorrer do tempo de exposição ao calor. A amostra de biocombustível com BHA teve comportamento intermediário. Por outro lado, as amostras com BHT e TBHQ foram as que tiveram menores valores de absorvância no UV a 232 nm, devido a menor presença de compostos secundários, o que lhes dá maior eficiência quanto à atividade antioxidante na oxidação do biodiesel [13].

A metodologia utilizada para avaliar a estabilidade oxidativa lipídica demonstrou ser simples, direta, eficaz e fácil de aplicar na determinação da capacidade antioxidante de substâncias em estudo, diminuindo, os custos de análise.

1.6. Bibliografia:

- [1] Antonia Luiz H. D, Borsato, D., Guedes Carmen L. B, 2010. Aplicação do delineamento simplex - centroide no estudo da cinética da oxidação de biodiesel B100 em mistura com antioxidantes sintéticos. *Química Nova*, 33 (8): 1726-1731
- [2] Conceição, M.M., Dantas, M.B., Santos, I.M.G.; Souza, A.G.; 2006. Avaliação da estabilidade térmica e reologia do biodiesel etílico e metílico obtido através da

transesterificação do óleo de milho. *I Congresso da rede brasileira de tecnologia de biodiesel. Livro de resumos*. Rede brasileira de tecnologia do biodiesel, volume 1, 163-168.

- [3] Biodieselbr Online Ltd, "Biodiesel". <http://www.biodieselbr.com/Biodiesel.html>. (acedido em março de 2011)
- [4] Rei, P.V., 2007. Procedimentos laboratoriais para controlo da qualidade do biodiesel, Tese de Mestrado em Engenharia Química, Instituto Superior Técnico. Universidade de Lisboa
- [5] Oliveira, A.C; Rosa, M.F., Sebadelhe, C.S, 2006. Produção de biodiesel a partir de matéria-prima do setor oleícola, Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Departamento de Energias Renováveis, Lisboa
- [6] Sousa, I; 2009. Produção de biodiesel etílico por catálise enzimática a partir de óleo de milho transgénico, Tese de Mestrado em Engenharia Química, Instituto Superior de Engenharia do Porto, 19-20
- [7] Melo, Susana M.C.L., 2011. Análise multivariada no diagnóstico da produção de Biodiesel, Tese de Mestrado em Química. Faculdade de Ciências e de Tecnologia. Universidade de Coimbra. 12pp
- [8] Bünger, J., Krahl, J., Munack, A., Schröder, O., Stein, H., 2003. Influence of biodiesel and different designed diesel fuels on the exhaust gas emissions and health effects. *Proceedings of the SAE Power train & Fluid Systems Conference Exhibition*, Pittsburgh
- [9] Ferrari, R.A., V.S. Oliveira, A. Scabio, 2005. Biodiesel from soybean: characterization and consumption in an energy generator. *Química Nova*, 28 (1): 19-23
- [10] Oliveira, A.C. e Rosa, M.F. 2008. Raw materials for biodiesel production in Portugal. *14th European Biomass Conference*, 1083-1085, Paris
- [11] Mirante, Fátima I.C., 2007. Caracterização por cromatografia gasosa de óleos vegetais e ceras parafínicas. Tese de Mestrado em Métodos Instrumentais e Controlo de Qualidade Analítica. Departamento de Química. Universidade de Aveiro. Aveiro

- [12] Moura, K. Regina Marques, 2008. Otimização do processo de produção de biodiesel metílico do sebo bovino aplicando um delineando composto central rotacional (DCCR) e a avaliação da estabilidade térmica. Tese de Doutorado em Química. Centro de Ciências Exatas e da Natureza. Universidade Federal da Paraíba.
- [13] Kincs, F.R., 1985. Meat fat formulation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 62 (4): 815-818
- [14] Ferrari, R. A.; Souza, W. L., 2009. Avaliação da estabilidade oxidativa de biodiesel de óleo de girassol com antioxidantes. *Química Nova*, 32 (1):106-111
- [15] Imahara, H., Saka, S., Xin, J., 2009. Kinetics on the oxidation of biodiesel stabilized with antioxidante. *Fuel*, 88 (2): 282-286
- [16] Monyem, A.; van Gerpen, J. H., 2001. The effect of biodiesel oxidation on engine performance and emissions. *Biomass and Bioenergy*, 20 (2001): 317-325
- [17] Aldayri, V. B., Dinkov, R., Hristov, G., Stratiev, D., 2009. Effect of commercially available antioxidants over biodiesel/diesel blends stability. *Fuel*, 88 (2008): 732-737
- [18] Ratcliff, M. M., Lawrence, R., McCormick, R. L., 2007. Several factors affecting the stability of biodiesel in standard accelerated tests. *Fuel Process Technology*, 88 (7): 651-657
- [19] Knothe, G., 2005. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Process Technology*, 86 (10):1059-1070
- [20] Fukuda H., Kondo A., and Noda H., 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 92 (5): 405-416
- [21] Almeida, António A.F, 2007. Avaliação da oxidação do biodiesel etílico de milho por meio de técnicas espectroscópicas, Dissertação de Mestrado em Química, Centro De Ciências Exatas E Da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba
- [22] Esterbauer, H., 1993. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid- oxidation products. *The American Journal Clinical Nutrition*, 57 (5): 7795-7855

- [23] Berger, K. G.; Hamilton, R. J., 1995. *Developments in Oils and Fats*. Chapman & Hall, London, cap.7
- [24] Hamilton, R. J., 1994. The chemistry of rancidity foods. Em: J. C. Allen; R.J. Hamilton (eds). *Rancidity in foods*. Black Academic & Professional, London, cap.1
- [25] Filho, M.G.R, 2010. Cardanol e eugenol modificados – uso como antioxidante no controle do processo oxidativo do biodiesel de algodão. Tese de Doutorado de Pós-Graduação em Química. Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química. Universidade Federal de Paraíba. Paraíba
- [26] Esteves, W., Hartmann, E. M., Toledo, M. C. F, 1985. Eficiência de antioxidantes em óleo de soja. *Ciência Tecnologia Alimentar*. 5 (1): 1-11
- [27] Gordon, M. H. 2001. The development of oxidative rancidity in foods. In: Pokorny, J., Yanishlieva, Gordon, M. H. (eds.). *Antioxidants in food*. Woodhead Publishing, Cambridge
- [28] Borges, M. F. M.; Ferreira, M. A., Silva, F. A. M., 1999. Método para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, 22 (1): 94-103.
- [29] Garcia-Mesa, J. A., Luque de Castro, M. D. E Varcargel, M., 1993. Factors affecting the gravimetric determination of the oxidative stability of oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70 (3): 245-247
- [30] Candeia, R. A., 2008. *Biodiesel de Soja: Síntese, Degradação e Misturas Binárias*, Tese de Doutorado em Química, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Departamento de Química, Universidade Federal de Paraíba. Paraíba
- [31] Cosgrove, J. P., Church, D. F., Pryor, W. A., 1987. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. *Lipids*, 22 (5): 299-304
- [32] Jamanek, D., Kasprzycka-Guttman, T., Litwinienko, G., 1999. DSC study of antioxidant properties of dihydroxyphenols. *Thermochimica Acta*, 331: 79-86

- [33] Jorge, N., Ramalho, V. C., 2006. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29 (4): 755-760
- [34] Namiki, M., 1990. Antioxidants / antimutagens in food. *Journal of Nutrition*, 29 (4): 273-300
- [35] Javanovic, S. V., Simic, M. G., 1994. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anti carcinogenesis. *In: HO, C.T.; OSAWA, T.; HUANG, T. M.; ROSEN, R.T. (Ed.). Food phytochemicals for cancer prevention. Washington: American Chemical Society (ACS Symposium Series, n. 546), 20-33*
- [36] Figueiredo, P., Freitas, A.C., 2000. Conservação De Alimentos, Universidade Lusófona, Lisboa, 49pp
- [37] Canakci, M., Monyem, A., Van Gerpen, J. H., 1999. Accelerated oxidation processes in biodiesel. *Transactions of the ASABE*, 42 (6): 1565-1572
- [38] Dunn, R. O., 2002. Low temperature flow properties of vegetable oil/co solvent blend diesel fuels. *Journal American Oil Chemists' Society*. 79 (7): 709-715
- [39] Chaiyasit, W., Elias, R.J., Decker, E.A., McClements, D.J., 2007. Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47 (3): 299-317
- [40] Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundra, P.D., 1992. *Phenolic antioxidants. Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32 (1): 67-103
- [41] Baggio, J., 2006. Avaliação dos resíduos (casca e pó orgânico) de café (*coffea arabica* L.) como provável fonte de substâncias bioativas, Tese de Mestrado, Programa de Pós – Graduação em Ciências dos Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.
- [42] Nawar, W.W., 1985. Lipids. Em: O.R. Fennema (ed.). *Food Chemistry*, 2.^a Ed., Marcel Dekker, New York, p139-244

- [43] Wong, D. W. S. 1995. *Química de los Alimentos: Mecanismos y Teoría*. 2ª Ed. Acribia, Zaragoza, p475
- [44] Berset, C., Cuvelier, M.E.; Richard, H., 1992. Comparison of antioxidative activity of some acid-phenols: structure-activity relationship. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56 (2): 324-325
- [45] Diedzic, S.Z., Hudson, B.J.F., 1984. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. *Food Chemistry*, 14: 45-51
- [46] Pratt, D.E., 1992. Natural antioxidants from plant material. Em: C.T. Ho, C.Y. Lee e M.T. Huang (eds.). *Phenolic compounds in food and their effects on health*, Washington: American Chemical Society Symposium series, 507: 54-71
- [47] Von Gadow, A., Hansmann, C.F., Joubert, E., 1997. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), alpha-tocopherol, BHT and BHA. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 45: 632-638.
- [48] Borges, F., Guimarães, C., Lima, J.L.F.C., Matos, C., Reis, S., Silva, F. M., 2000. Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and physicochemical parameters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2122-2126.
- [49] Martins, M., 2010. *Eficiência de antioxidantes no biodiesel*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química. Instituto Superior de Engenharia do Porto. 21pp
- [50] Frankel, E.N., 1998. *Lipid oxidation*. The Oily Press, Dundee
- [51] De Man J.M, de Main L., Tie F., 1987. Formation of short chain volatile organic acids in the automated AOM method. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 64 (7): 993-996
- [52] Figueiredo P., 2009. Introdução à Química Alimentar, Edição de Autor, p55-56

2. Procedimento experimental

2.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de qualidade pró análise ou superior das firmas Panreac, Merck e Sigma-Aldrich.

O metanol, foi adquirido na Merck e apresentava um grau de pureza de 99,8%.

O ácido linoleico (ácido *cis*, *cis*-9,12-octadecadienóico) foi fornecido pela Sigma – Aldrich com um grau de pureza de 99%.

A solução de Tween 20, foi fornecida pela Sigma – Aldrich com um grau de pureza de 98% e foi utilizada como agente emulsificante.

O dihidrogenofosfato de potássio foi fornecido pela Sigma – Aldrich com um grau de pureza de 99,5%.

O hidrogenofosfato de potássio foi fornecido pela Panreac com um grau de pureza de 99%.

O ácido gálgico foi fornecido pela Sigma – Aldrich com um grau de pureza de 97%.

O galhato de etilo e o galhato de propilo foram fornecidos pela Sigma – Aldrich com um grau de pureza de 98%.

O butil – hidroxitolueno foi fornecido pela Sigma – Aldrich com um grau de pureza de 99%.

O galhato de metilo e o galhato de butilo é sintetizado, por reação de esterificação de Fisher a partir do ácido gálgico, utilizando os diferentes álcoois: metanol e butanol de forma a obter os ésteres pretendidos (figura 2.1). O procedimento experimental para a síntese destes ésteres encontra-se descrito na literatura [1].

Posteriormente, é efetuada a purificação destes compostos utilizando cromatografia em coluna (CC) e recristalização. A caracterização dos compostos sintetizados é realizada através de dados de IV, RMN.

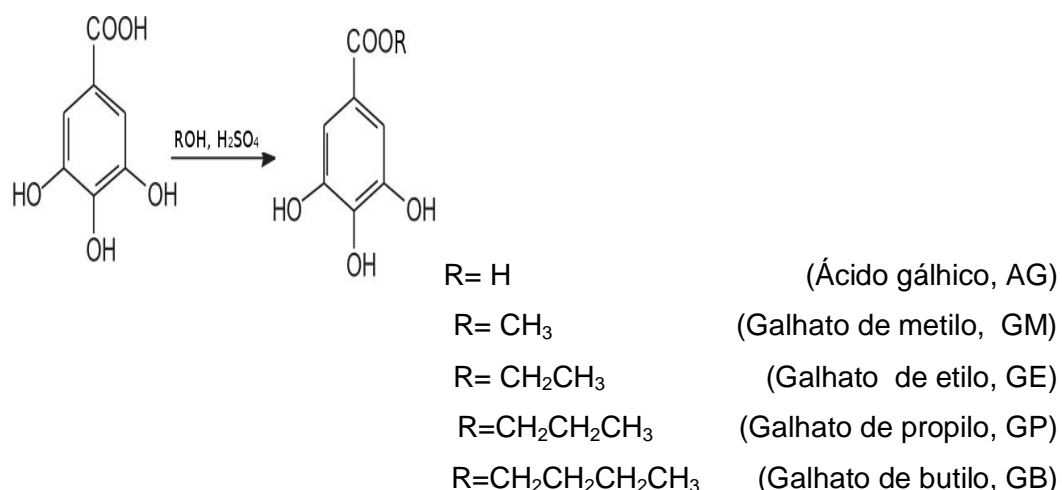


Figura 1.1– Reação de esterificação de Fisher

2.2. Equipamento

As quantidades necessárias para a realização dos ensaios, foram pesadas numa balança analítica, ($\pm 0,0001\text{g}$) marca Precisa Super Bal-Series, modelo 205 A.

As quantidades necessárias para a preparação da solução tampão, foram pesadas numa balança de marca Acculab, modelo Atilon ($\pm 0,1\text{g}$)

A medição do p H da solução tampão, foi feita, num aparelho medidor de pH de marca Crison, modelo Basic 20.

Foram usadas micro - pipetas de capacidade variável com volumes 100 e 1000 μL das marcas VWR e α Plus.

Para a realização dos ensaios espectrofotométricos foi utilizado um espectrofotômetro UV-VIS da marca Shimadzu modelo 1700 PharmaSpec. A aquisição e tratamento de dados, foi efetuada usando um computador de marca DELL com o programa UV Probe 2.10 (Shimadzu).



Figura 2.2: Espectrofotômetro de ultravioleta-visível (UV – VIS) usado nos ensaios experimentais.

As análises foram efetuadas usando células de quartzo (marca Starna) com 10 mm de percurso ótico.

A oxidação dos ácidos gordos polinsaturados acontece com a formação de hidroperóxidos e deslocamento das duplas ligações, formando-se assim dienos conjugados; Estes dienos conjugados apresentam um valor máximo de absorvância para um comprimento de onda igual a 234nm. Assim o comprimento de onda utilizado nas análises realizadas, foi fixado em 234 nm.

As amostras foram aquecidas, usando uma estufa de marca J.P. Selecta, modelo ARTAI, fixando-se a temperatura a 50°C.



Figura 2.3: Estufa usada nos ensaios de estabilidade oxidativa a 50 °C

2.3. Preparação da solução tampão de fosfato de pH 6,9.

Numa balança de marca Acculab, modelo Atilon ($\pm 0,1g$) pesou-se para um gobelé previamente tarado cerca de 17,4 g de hidrogenofosfato de potássio e 13,6 g de dihidrogenofosfato de potássio, dissolveu-se num litro de água desionizada. Num aparelho medidor de pH de marca Crison, modelo Basic 20 mediu-se, o pH da solução assim preparada, verificando-se que era aproximadamente 6,9.

2.4. Preparação da emulsão

Mediu-se 5 mL de solução Tween 20 e adicionou-se este volume à solução tampão preparada anteriormente. Homogeneizou-se convenientemente e transferiu-se de

seguida a solução para um frasco de vidro escuro. Guardou-se e rotulou-se este frasco.

2.5. Preparação das soluções-mãe de antioxidante.

Prepararam-se soluções - mãe de concentração 10 mM de cada um dos antioxidantes testados. As massas apropriadas foram pesadas numa balança analítica e dissolvidas em água desionizada (à exceção do BHT que foi dissolvido em metanol). Na tabela 2.1. apresentam-se as quantidades pesadas para a preparação das soluções-mãe dos diferentes antioxidantes.

Tabela 2.1 – Preparação das soluções - mãe dos diferentes antioxidantes em água desionizada.

Antioxidante	Massa molecular (g/mol)	Massa pesada (mg)	Concentração (mol/L)
Ácido gálgico	170,12	17,2	0,0101
Galhato de metilo	184,15	18,3	0,0099
Galhato de etilo	198,18	19,7	0,0099
Galhato de propilo	212,20	21,1	0,0099
Galhato de butilo	226,20	22,8	0,0101
Butil- hidroxitolueno	220,35	22,3	0,0101

2.6. Avaliação da influência do antioxidante na oxidação do ácido linoleico

2.6.1. Preparação das misturas para análise.

De forma a avaliar a influência de cada um dos antioxidantes na degradação oxidativa do ácido linoleico (AL), prepararam-se, para cada um deles, três soluções: uma contendo somente o AL (solução de controle, A), outra contendo somente o antioxidante em estudo (solução B) e por fim uma contendo uma mistura de AL e do antioxidante (solução C).

As soluções contendo o AL com concentração 2,5 mM (solução A e C), foram preparadas, medindo-se com uma micropipeta uma toma volúmica apropriada, para

um balão volumétrico e perfazendo-se o volume com a emulsão (solução tampão com Tween 20).

As soluções de ensaio contendo antioxidante com concentração 0,1 mM e 1 mM (soluções B e C), foram preparadas, a partir das soluções-mãe, medindo-se com micropipeta tomas volúmicas apropriadas para um balão volumétrico.

Estas três soluções foram guardadas em frascos rolhados e colocadas na estufa a 50°C durante 7 dias.

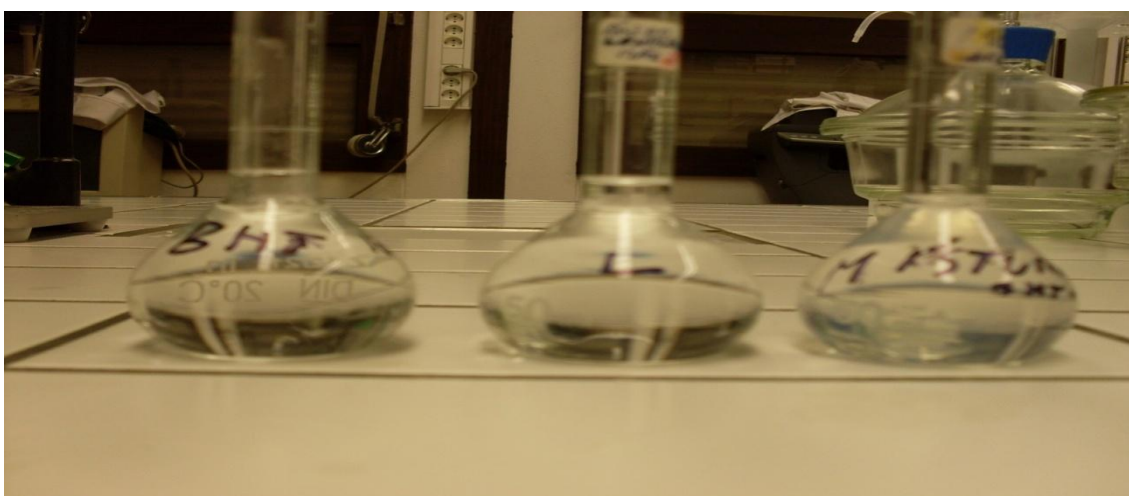


Figura 2.4: Soluções preparadas para cada antioxidante: solução contendo somente galhato de butilo (solução B), solução contendo somente AL (solução A) e solução contendo mistura AL e antioxidante (solução C).

2.6.2. Análise das soluções por espectrofotometria de ultravioleta - visível

Periodicamente, retiraram-se pequenas alíquotas de cada uma das soluções guardadas na estufa a 50°C e após diluição apropriada foram analisadas por espectrofotometria de UV-Vis usando um comprimento de onda de 234 nm, seguindo o procedimento do artigo Reedy e colaboradores [3].

2.7. Avaliação do efeito dos antioxidantes na inibição da oxidação do ácido linoleico.

Os ensaios de avaliação do efeito dos antioxidantes na inibição da oxidação do ácido linoleico, foram adaptados num procedimento descrito na literatura [3].

Seguiu-se o artigo **Reedy e colaboradores [3]** que utilizou o **método de Chimi et al.[4]**, com algumas modificações, para o estudo da taxa de inibição da auto-oxidação do ácido linoleico.

Preparou-se o tampão fosfato (pH 6,9) contendo 0,5% de Tween 20. Preparou-se uma solução de ácido linoleico ($2,5 \times 10^{-3}$ M), a qual foi dispersa neste tampão, juntamente com antioxidantes de referência, por exemplo BHT (0,1 m M; 1m M). As amostras foram deixadas na estufa durante 7 dias a 50 ° C.

As amostras que contêm ácido linoleico, mas sem antioxidantes e os controlos (contendo 0,1 mM ou 1 mM, de concentrações de antioxidantes correspondente) sem ácido linoleico também foram incubados sob as mesmas condições.

A auto-oxidação de ácido linoleico é acompanhada pela formação do seu dieno conjugado, o qual foi medido sua absorvância, durante 7 dias, por espectrofotometria de absorção UV a 234 nm.

As amostras foram diluídas 20 vezes usando tampão fosfato contendo 0,5% de Tween 20, antes da medição da absorvância. Uma diminuição da taxa de formação de dieno conjugado, indica o aumento da atividade antioxidante do composto adicionado à micela de ácido linoleico.

Para avaliar o efeito da concentração de antioxidante na inibição do ácido linoleico efetuaram-se estudos utilizando duas concentrações diferentes para cada antioxidante (0,1mM e 1mM). Pretendeu-se assim, testar se ambas as concentrações de antioxidante, seguem a mesma sequência de inibição por parte dos antioxidantes em estudo, e testar se a inibição aumenta para a concentração mais elevada. Deveriam ter sido testadas outras concentrações de antioxidantes superiores a 1m M, para se tentar determinar qual a concentração ótima de antioxidante a aplicar na inibição da oxidação do ácido linoleico.

A percentagem de inibição da oxidação (%I) do ácido linoleico, foi determinada pela seguinte expressão:

$$\% I.O = \left(\frac{((\text{Abs da amostra de controle}) - (\text{Abs da amostra teste}))}{(\text{Abs da amostra de controle})} \right) \cdot 100$$

Equação (2.1)

Em que:

Abs da amostra controle, a absorvância obtida a 234 nm para a solução contendo somente AL (solução B). A absorvância foi medida ao fim de dois dias e meio.

Abs da amostra teste, a absorvância obtida a 234 nm para a solução contendo a mistura AL e antioxidante (solução C) subtraída da absorvância obtida para a solução contendo somente o antioxidante (solução A). A absorvância foi medida ao fim de dois dias e meio.

2.7. Bibliografia:

- [1] Gaspar, A, Martins, M, Silva, P, Garrido, E. M, Garrido, J, Firuzi, O, Miri, R, Saso, L Borges, F, 2010. Dietary phenolic acids and derivatives. Evaluation of the antioxidant activity of sinapic acids and its alkyl esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 11273-11280.
- [2] Reis, B, Martins, M, Barreto, B, Milhazes, N, Garrido, E. M, Silva, P, Garrido, J and Borges, F, 2010, Structure –Property- Activity Relationship of Phenolic Acids: Protocatechuic Acid Alkyl Esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (11): 6986-6993
- [3] Reddy; Kunduru K.; Ravinder; Thumu; Prasad, Rachapudi B. N.; Kanjilal, Sanjit; 2010. Evaluation of the antioxidant activity of capsiate analogues in polar, nonpolar and micellar media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry Article*; 564 - 568.
- [4] Chimi, H.; Cillard, J.; Cillard, P.; Rahmi, M., 1991. Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68 (5): 307-312

3. Resultados e Discussão

3.1. Avaliação do efeito dos antioxidantes na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico

Para avaliar a capacidade que os diferentes antioxidantes em estudo têm para inibir a auto-oxidação lipídica, recorreu-se ao método de medição dos dienos conjugados por espectrofotometria de absorção no ultravioleta-visível. Para além da influência dos diferentes antioxidantes testados, foi igualmente avaliado o efeito da sua concentração na inibição da peroxidação lipídica. Assim, efetuou-se o estudo da estabilidade oxidativa do ácido linoleico usando duas concentrações de cada um dos antioxidantes, 0,1 mM e 1 mM.

De forma a avaliar a influência de cada um dos antioxidantes, prepararam-se, para cada um dos deles, três soluções: uma contendo somente o AL, outra contendo somente o antioxidante em estudo e por fim uma contendo uma mistura de AL e do antioxidante. Estas três soluções foram guardadas em frascos rolhados e colocadas na estufa a 50°C durante 7 dias. Periodicamente, retiraram-se pequenas alíquotas de cada uma destas soluções que após diluição apropriada foram analisadas por espectrofotometria de UV-Vis usando um comprimento de onda de 234 nm. Nas figuras 3.1 e 3.2 apresentam-se, os resultados obtidos relativos no estudo da estabilização termo - oxidativa do ácido linoleico estabilizado com 0,1 mM e 1 mM de ácido gálico, respetivamente.

Este procedimento foi repetido para os restantes antioxidantes em estudo, o galhato de metilo, galhato de etilo, galhato de propilo, galhato de butilo e B.H.T. Os gráficos obtidos para os diversos ensaios com estes antioxidantes encontram-se nas figuras 3.1.a 3.12.

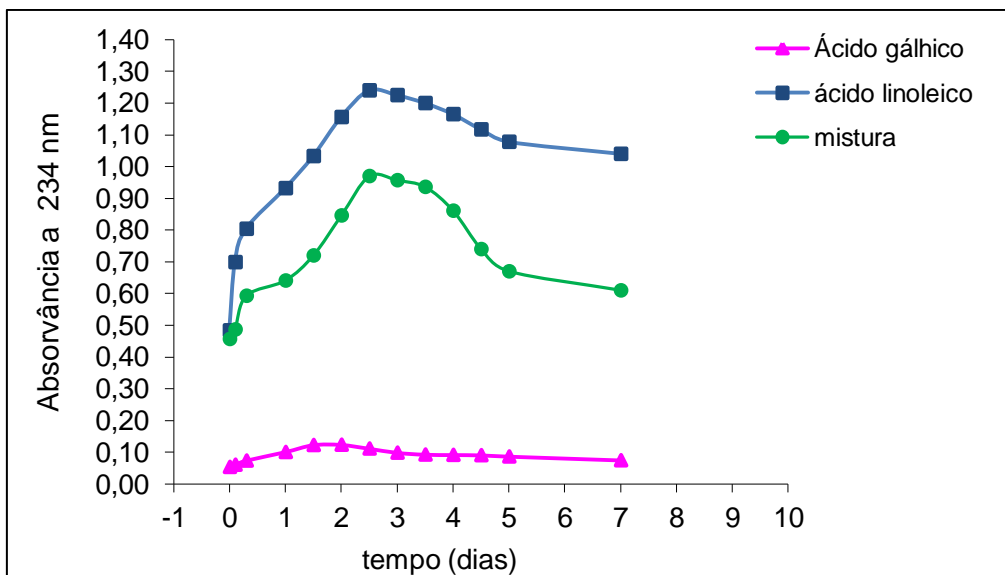


Figura 3.1 – Estudo da influência do ácido gálico (0,1 mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.

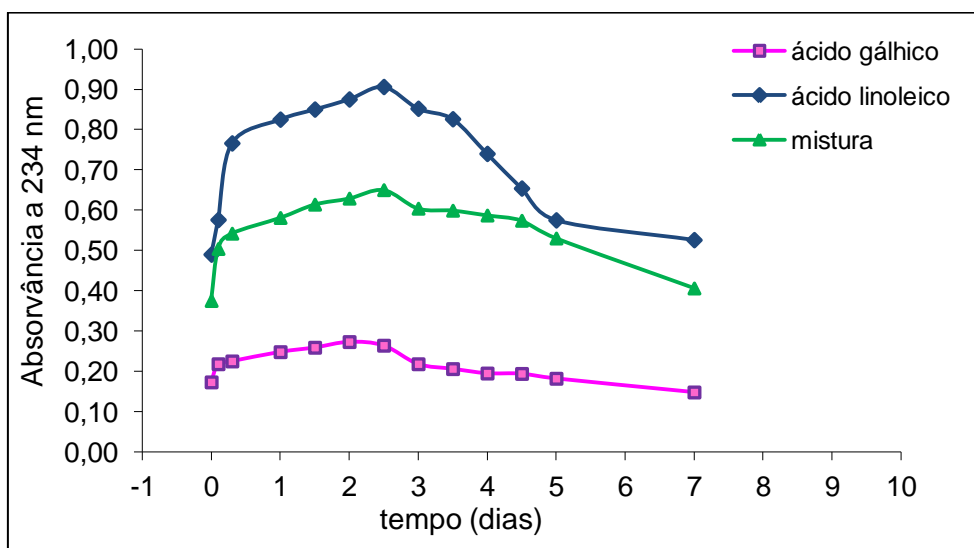


Figura 3.2 – Estudo da influência do ácido gálico (1 mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.

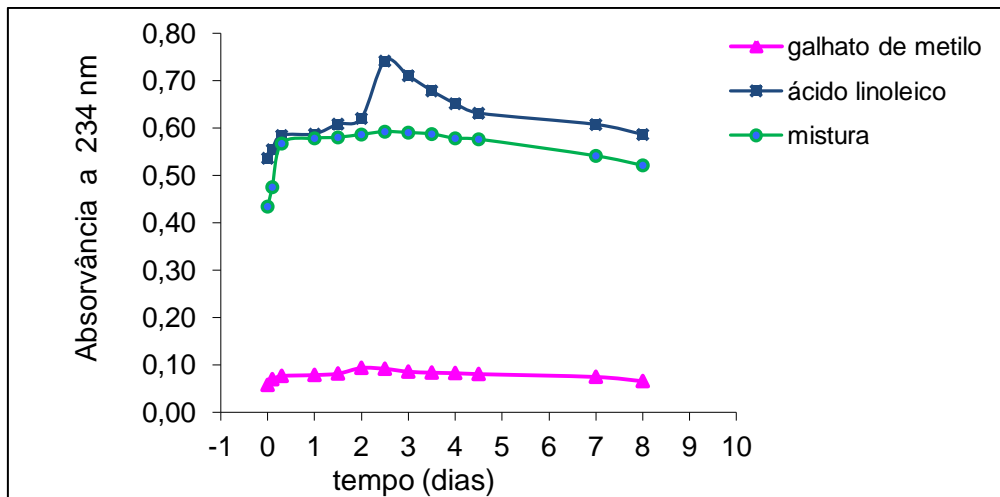


Figura 3.3 – Estudo da influência do galhato de metilo (0,1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.

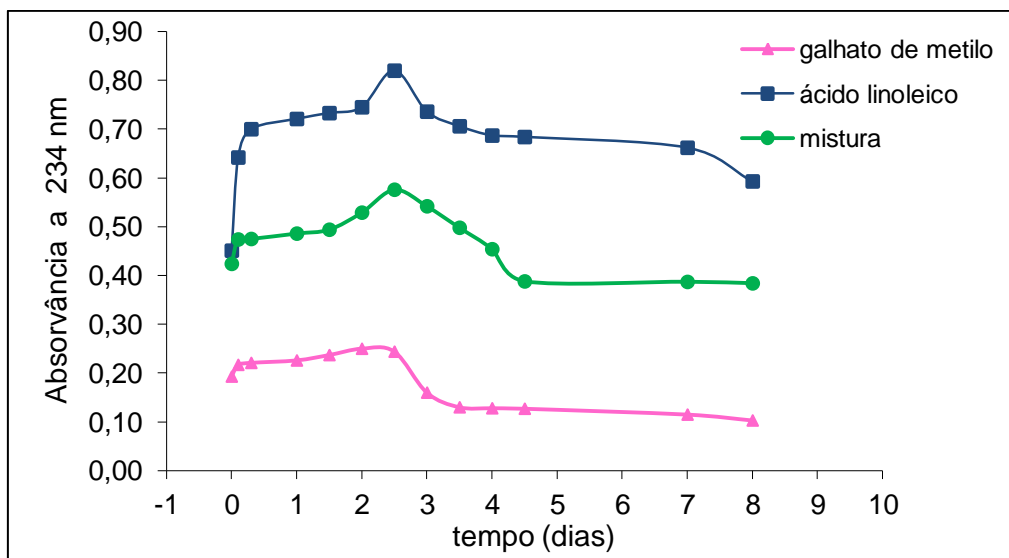


Figura 3.4 – Estudo da influência do galhato de metilo (1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.

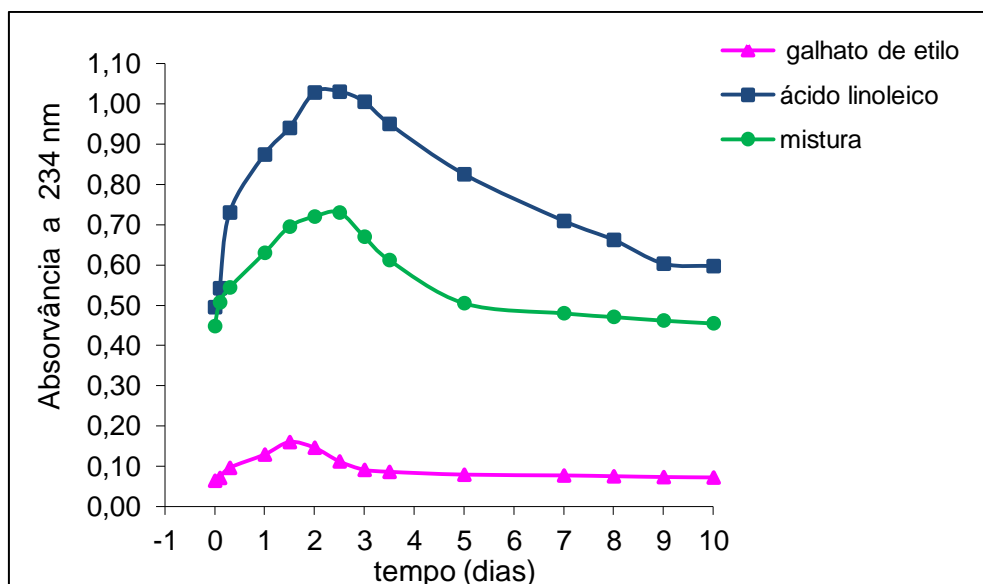


Figura 3.5 – Estudo da influência do galhato de etilo (0,1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.

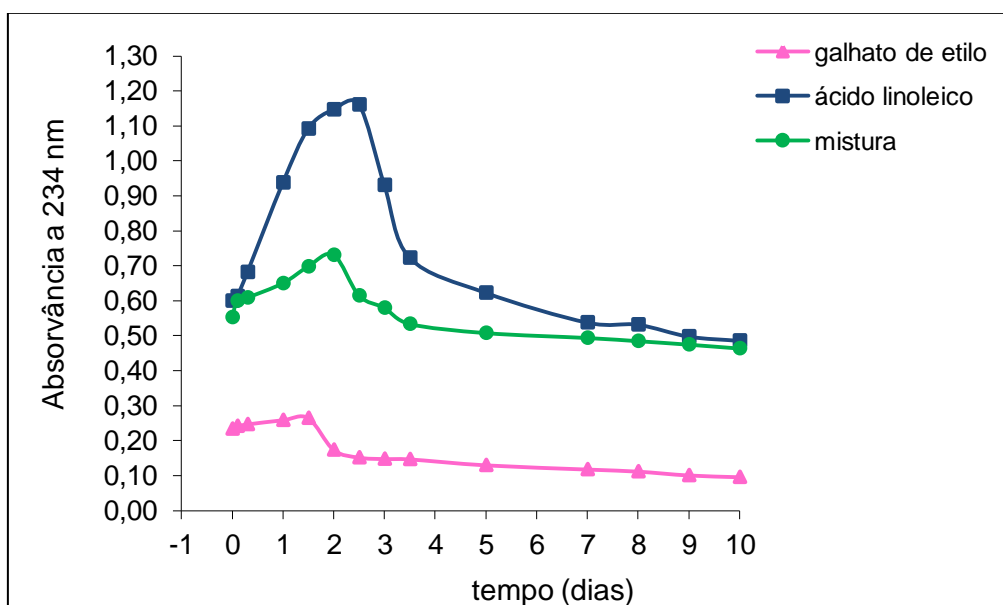


Figura 3.6 – Estudo da influência do galhato de etilo (1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.

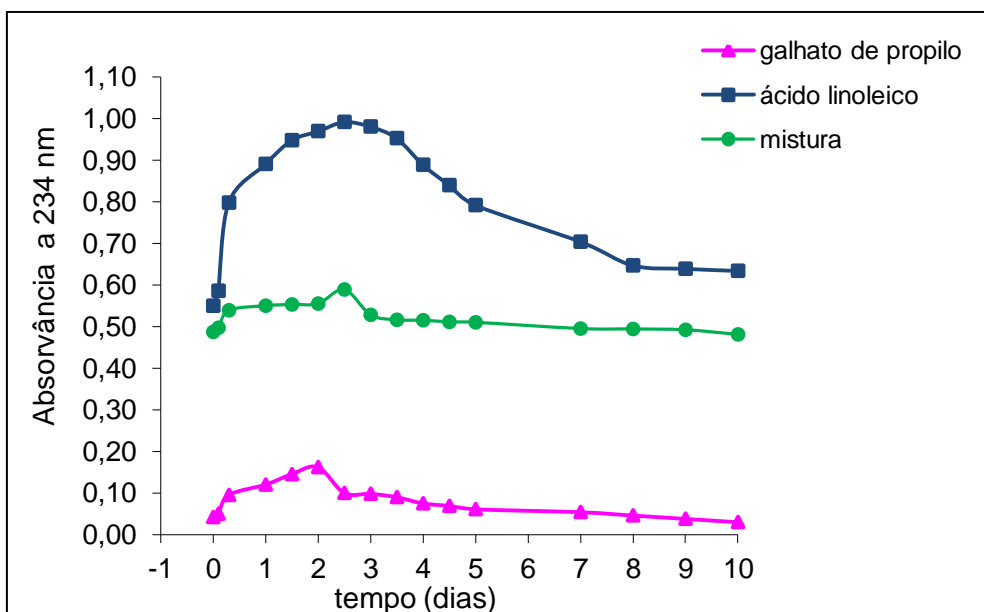


Figura 3.7 – Estudo da influência do galhato de propilo (0,1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.

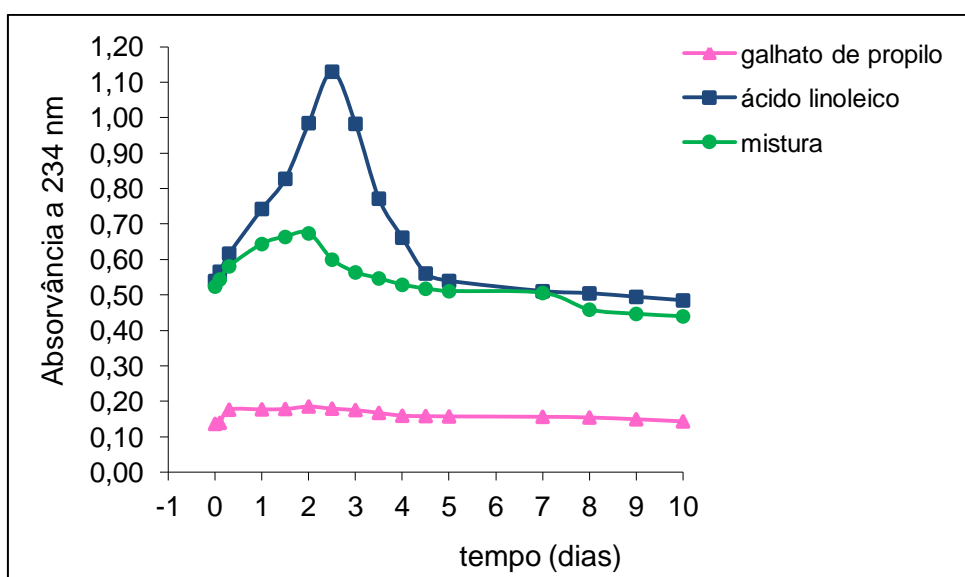


Figura 3.8 – Estudo da influência do galhato de propilo (1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.

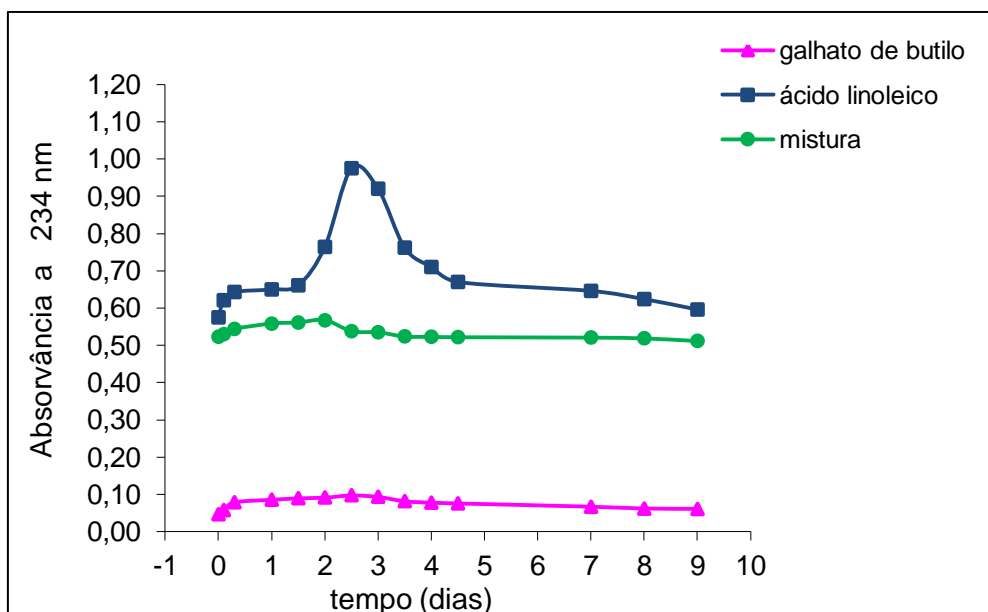


Figura 3.9 – Estudo da influência do galhato de butilo (0,1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.

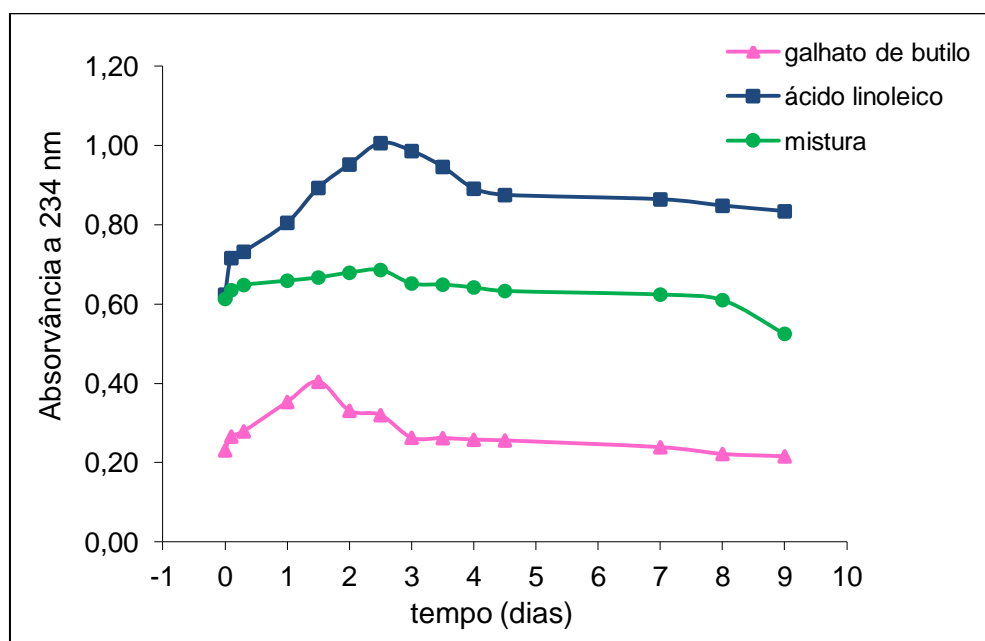


Figura 3.10 – Estudo da influência do galhato de butilo (1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.

De forma a comparar os resultados obtidos, efetuou-se igualmente o estudo da influência de um antioxidante de referência, butil - hidroxitolueno (BHT), na estabilização termo - oxidativa do ácido linoleico. A escolha do BHT como antioxidante de referência deveu-se ao facto deste ter a melhor ação anti- oxidante em relação a outros antioxidantes Isto é devido à presença de grupos ativadores no anel aromático,

orto e para substituídos, tornando melhor a deslocalização de elétrons e a estabilização de radicais livres, formados nos processos oxidativos.

Nas figuras 3.11 e 3.12 apresentam-se os resultados relativos ao estudo da estabilização termo - oxidativa do ácido linoleico estabilizado com 0,1 mM e 1 mM de BHT, respetivamente:

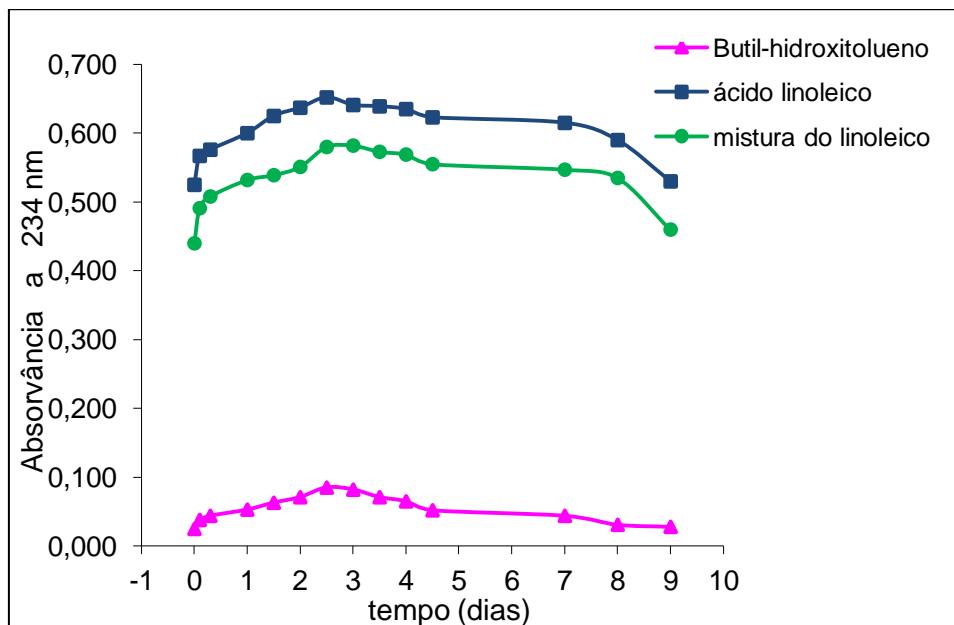


Figura 3.11 – Estudo da influência do butil-hidroxitolueno (0,1mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.

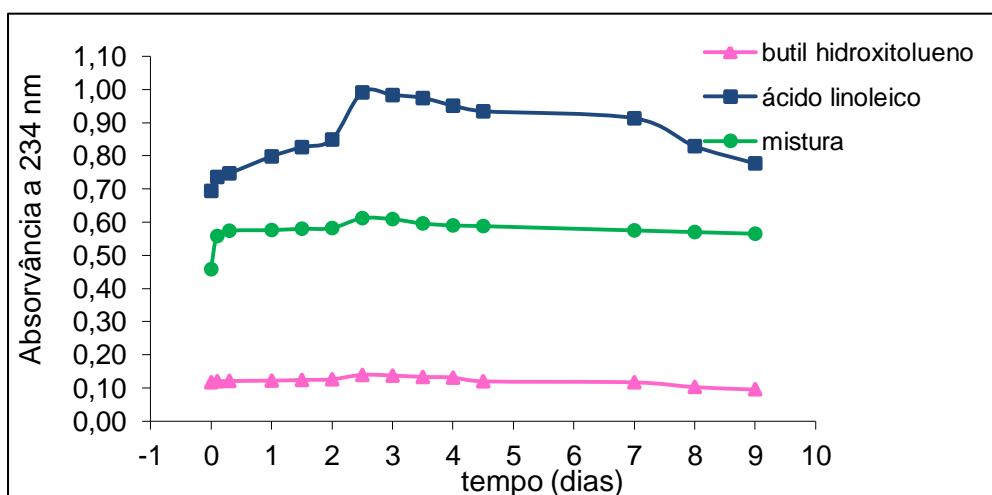


Figura 3.12 – Estudo da influência do butil - hidroxitolueno (BHT) (1 mM) na estabilidade termo - oxidativa do ácido linoleico.

A percentagem de inibição da oxidação (%) do ácido linoleico, foi determinada pela seguinte expressão referida no capítulo 2- (equação 2.1):

$$\% \text{ I. O} = \left(\frac{((\text{Abs da amostra de controle}) - (\text{Abs da amostra teste}))}{(\text{Abs da amostra de controle})} \right) \cdot 100$$

Equação (2.1)

Em que:

Abs da amostra controle, a absorvância obtida a 234 nm para a solução contendo somente AL (solução B). A absorvância foi medida ao fim de dois dias e meio.

Abs da amostra teste, a absorvância obtida a 234 nm para a solução contendo a mistura AL e antioxidante (solução C) subtraída da absorvância obtida para a solução contendo somente o antioxidante (solução A). A absorvância foi medida ao fim de dois dias e meio.

Para cada um dos antioxidantes testados foi calculada a percentagem de inibição (%) a partir da equação (2.1). A tabela 3.1 apresenta os resultados referentes à percentagem de inibição do ácido linoleico por parte dos diferentes antioxidantes em estudo para as duas concentrações testadas (0,1 mM e 1 mM).

Tabela 3.1 – Percentagem de inibição do ácido linoleico por parte dos diferentes antioxidantes em estudo para as duas concentrações testadas (0,1 mM e 1 mM).

Antioxidante	Inibição da oxidação (%)	
	Concentração 0,1 m M	Concentração 1 m M
Ácido Gálgico	30,81	57,40
Galhato de Metilo	32,52	59,51
Galhato de Etilo	40,00	60,12
Galhato de Propilo	50,71	62,83
Galhato de Butilo	54,05	63,62
Butil - hidroxitolueno	24,08	52,27

Através da análise dos valores obtidos, pode constatar-se que para ambas as concentrações, todos os antioxidantes testados têm um efeito estabilizador sobre a oxidação do ácido linoleico. No entanto, existem diferenças, em termos de capacidade antioxidante, entre os diferentes antioxidantes utilizados.

Analisando os valores obtidos para a percentagem de inibição da oxidação do ácido linoleico (tabela 3.1) verifica-se que existem algumas diferenças entre os antioxidantes estudados para ambas as concentrações de antioxidante testado. De fato, através dos valores obtidos pode concluir-se que a percentagem de inibição aumenta com o incremento da cadeia do éster, observando-se o mesmo comportamento para ambas as concentrações de antioxidantes testadas. O galhato de butilo é o que apresenta uma percentagem de inibição à oxidação do ácido linoleico mais elevada para qualquer das concentrações em estudo (0,1 mM e 1 mM). Este antioxidante é simultaneamente aquele que apresenta uma maior cadeia alquílica do éster de todos os antioxidantes testados.

A atividade antioxidante está intimamente relacionada com a quantidade e tipo de substituintes do anel aromático e também com o grupo carboxílico ou éster da posição1. A eficiência dos compostos fenólicos, como inibidores de oxidação é significativamente aumentada pela substituição de grupos alquil volumosos, (usualmente butil terciário), na posição orto, e também pela substituição de um grupo alquil (atualmente o metil), na posição para.

A eficiência antioxidante do ácido gálico na inibição da oxidação do ácido linoleico, é inferior á dos seus respetivos ésteres. Os resultados possibilitaram concluir que o grupo carboxílico tem uma função importante na sua atividade anti – radicalar. A deprotonação do grupo COOH pode ser a responsável pela maior desestabilização do radical fenóxilo, o que origina uma menor incidência de ataque nucleofílico, por parte do solvente. A esterificação do ácido gálico induz um acréscimo da estabilidade do radical formado [1].

A existência de três grupos hidroxilos fenólicos na estrutura do ácido gálico pode ser preponderante para o seu maior poder anti - radicalar comparativamente aos ácidos hidrocafeico, cafeico, ferúlico e isoferúlico. A existência de dois hidroxilos fenólicos em posições adjacentes no radical fenóxilo pode ter um efeito na sua maior estabilização. Pode-se observar na seguinte figura 3.13, esta estabilização por efeito de ressonância do radical fenóxilo formado a partir do ácido gálico.

Apesar do grupo carboxilo livre (grupo desativador) diretamente ligado ao anel aromático (e.g. ácido gálico) diminua a densidade no anel, diminuindo a susceptibilidade da substância à oxidação, é provável que a existência dos grupos hidroxilo em posições não adjacentes ao grupo COOH diminua significativamente esse efeito [2].

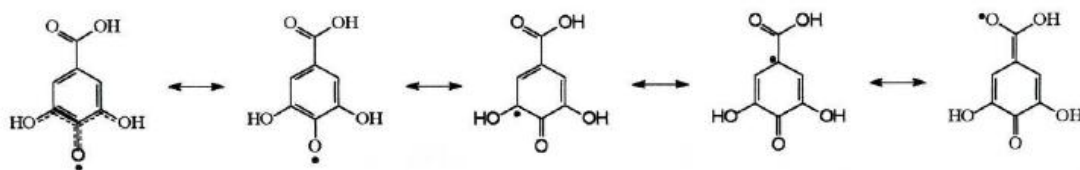


Figura 3.13 Estabilização por efeito de ressonância do radical fenóxilo formado a partir do ácido gálico [2].

Os ésteres derivados do ácido gálico, apresentam um efeito de inibição de oxidação do ácido linoleico superior ao efeito provocado pelo ácido gálico.

Foi executado igualmente o estudo para a concentração de 0,1mM e 1mM e, utilizando um antioxidante de referência, o butil-hidroxitolueno. Analisando os resultados obtidos, verifica-se que para a concentração de 0,1mM, o butil - hidroxitolueno tem pouca influência na estabilização termo - oxidativa do ácido linoleico, pois a percentagem de inibição de oxidação no ácido linoleico causada pela ação deste antioxidante é muito baixa (é inferior à dos antioxidantes derivados do ácido gálico e à deste ácido). Para a concentração de 1mM, o butil-hidroxitolueno, tem alguma influência (embora menor do que no caso de uso dos galhatos) na inibição de oxidação do ácido linoleico, pois existe uma diminuição da absorvância do dieno conjugado do ácido linoleico.

Constatou-se que a atividade anti - radicalar (ordem de reatividade) aumenta na seguinte ordem crescente:

GB>GP>GE>GM>AG>BHT

Isto, é os ésteres do ácido gálico (principalmente o galhato de butilo), têm maior poder antioxidante do que o seu respectivo ácido.

Para além do estudo da influência dos diversos antioxidantes na inibição da oxidação do ácido linoleico, avaliou-se igualmente o efeito que diferentes concentrações de antioxidante podem ter nesse processo. Embora se observe para ambas as concentrações estudadas (0,1 mM e 1 mM) a mesma sequência de inibição por parte dos antioxidantes em estudo, verifica-se que a percentagem de inibição é mais pronunciada para a concentração mais elevada. De fato, para o ácido gálico obtiveram-se 30,81% e 57,40%, para as respetivas concentrações 0,1m M e 1m M. Deveriam ter sido testadas outras concentrações de antioxidantes superiores a 1m M,

para se tentar determinar qual a concentração ótima de antioxidante a aplicar na inibição da oxidação do ácido linoleico.

3.2. Bibliografia:

- [1] Reis, Bruno M.M.da S., 2008 .Síntese de derivados de ácidos fenólicos e estudo da sua actividade antioxidante. Tese de Mestrado em Engenharia Química. Instituto superior de Engenharia do Porto. Porto

- [2] Silva, Francisco A.M. da, 1998. Síntese de derivados de ácido cinâmicos. Determinação da actividade anti-radicalar e antioxidante. Tese de Mestrado em Controlo da Qualidade. Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto. Porto

4. Conclusões e Sugestões para trabalho futuro.

Os lípidos desempenham uma função importante no que concerne à qualidade de certos produtos alimentares, principalmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis (sabor, cor textura). Também, constituem uma fonte de energia metabólica, de ácidos gordos essenciais (ácidos linoleico, linolénico e araquidónico) e de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K).

A oxidação lipídica é um processo espontâneo e inevitável, condicionando o valor comercial, dos ácidos gordos, e dos produtos que são sintetizados a partir deles (alimentos, cosméticos e medicamentos).

A peroxidação lipídica é o principal fator de deterioração dos lípidos. Estes, sofrem durante os seus processos de transformação e armazenamento, modificações do género oxidativo.

O biodiesel é uma boa alternativa à gasolina e ao gasóleo. Este combustível pode ser produzido a partir de fontes renováveis como óleos vegetais ou gordura animal sendo preciso otimizar as suas condições de armazenamento para prevenir a degradação oxidativa.

Nestes últimos anos, os investigadores têm adotado medidas que possibilitem limitar o processo de oxidação, aplicando processos que limitem as operações de arejamento e o tratamento térmico, utilizando matérias-primas com baixos teores de água, e fazendo o armazenamento a baixas temperaturas e em atmosfera inerte, utilizando embalagens estanques e opacas à radiação ultra violeta e adicionando compostos antioxidantes. Destas medidas, a adição de compostos antioxidantes é, uma boa solução, para retardar ou diminuir a velocidade de oxidação.

Neste trabalho, efetuou-se a avaliação da influência de antioxidantes fenólicos na estabilização do ácido linoleico e por inerência no biodiesel. Para além da influência de diferentes antioxidantes, estudou-se igualmente, a influência do aumento da cadeia do éster (dos antioxidantes). Foi analisado o efeito da concentração dos diferentes antioxidantes na estabilização do ácido linoleico, recorrendo à mesma técnica.

Os resultados obtidos mostraram que à medida que se aumenta a concentração de antioxidante há uma melhoria significativa, na inibição da oxidação do ácido linoleico.

Os resultados relativos à avaliação da capacidade dos antioxidantes estabilizarem o ácido linoleico, concluiu-se que o poder de estabilização do ácido gálico e dos ésteres é muito diferente. Os resultados dos ensaios espectrofotométricos, para avaliação da influência de antioxidantes na estabilização do ácido linoleico demonstraram que todos os compostos têm a capacidade de diminuir o processo de oxidação, embora esta capacidade seja mais visível no caso dos ésteres pois a sua lipofilicidade, faz diminuir a oxidação do ácido linoleico. O estudo comparativo da estabilização do ácido linoleico com o antioxidante de referência, o butil - hidroxitolueno, mostrou que este composto tem um poder de estabilização inferior a qualquer dos antioxidantes estudados.

A metodologia utilizada para avaliar a estabilidade oxidativa lipídica demonstrou ser simples, direta, eficaz e fácil de aplicar na determinação da capacidade antioxidante de substâncias em estudo, diminuindo, os custos de análise.

Durante a realização deste trabalho, observou-se que existem variáveis que podem influenciar significativamente os resultados obtidos. Pois, o tempo de preparação das amostras e a temperatura e o efeito da foto - oxidação (amostras em contacto com luz) à qual estas parecem ter um significativo efeito na inibição de oxidação. Assim, concluiu-se que é preciso controlar rigorosamente o armazenamento das amostras de maneira a estas preservarem as suas propriedades e a sua auto-oxidação não ser significativa.

Como sugestões para trabalhos futuros, propõe-se o estudo da influência de outras concentrações de antioxidantes, na estabilização do biodiesel e do ácido linoleico de forma, a se determinar qual a concentração ótima de antioxidante a aplicar na inibição da oxidação do ácido linoleico.

Sugere-se, também o estudo com outras técnicas analíticas para validar e correlacionar os resultados obtidos neste trabalho.

Sugere-se também o estudo da influência da temperatura na inibição da oxidação do ácido linoleico, armazenando na estufa as amostras, a diferentes temperaturas, e fazendo as leituras da absorvância dessas amostras, no espectrofotómetro de ultravioleta-visível para cada temperatura. Assim, poderá - se verificar qual é a

influência da temperatura na cinética e nos processos de oxidação do ácido linoleico e no biodiesel.

Anexos

Anexos A

Tabela A.1) – Valores das absorvâncias para o estudo da estabilidade oxidativa do ácido linoleico ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M) com o ácido gálico a 0,1 mM

Dias	Absorvâncias a 234 nm		
	Ácido gálico	Ácido linoleico	Mistura
0,0	0,054	0,484	0,457
0,1	0,061	0,699	0,487
0,3	0,074	0,804	0,593
1,0	0,101	0,932	0,641
1,5	0,123	1,033	0,720
2,0	0,124	1,156	0,846
2,5	0,112	1,240	0,970
3,0	0,099	1,225	0,957
3,5	0,093	1,200	0,936
4,0	0,092	1,165	0,861
4,5	0,091	1,117	0,740
5,0	0,087	1,078	0,670
7,0	0,075	1,040	0,610

Tabela A.2 – Valores das absorvâncias para o estudo da estabilidade oxidativa do ácido linoleico ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M) com o ácido gálico a 1mM.

Dias	Absorvância a 234 nm		
	Ácido gálico	Ácido linoleico	Mistura
0,0	0,173	0,490	0,375
0,1	0,218	0,576	0,504
0,3	0,225	0,766	0,542
1,0	0,248	0,825	0,581
1,5	0,259	0,850	0,614
2,0	0,273	0,875	0,629
2,5	0,264	0,906	0,650
3,0	0,218	0,852	0,604
3,5	0,206	0,826	0,599
4,0	0,195	0,740	0,587
4,5	0,194	0,654	0,574
5,0	0,182	0,575	0,530
7,0	0,148	0,526	0,406

Tabela A.3 – Valores das absorvâncias para o estudo da estabilidade oxidativa do ácido linoleico ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M) com o butil -hidroxitolueno a 0,1 mM.

Dia	Absorvâncias a 234 nm		
	Butil - hidroxitolueno	Ácido linoleico	Mistura
0,0	0,025	0,525	0,440
0,1	0,038	0,567	0,491
0,3	0,044	0,576	0,508
1,0	0,053	0,600	0,532
1,5	0,063	0,625	0,539
2,0	0,071	0,637	0,551
2,5	0,085	0,652	0,580
3,0	0,082	0,641	0,582
3,5	0,071	0,639	0,573
4,0	0,065	0,635	0,569
4,5	0,052	0,623	0,555
7,0	0,044	0,615	0,547
8,0	0,031	0,590	0,535
9,0	0,028	0,530	0,460

Tabela A.4 – Valores das absorvâncias para o estudo da estabilidade oxidativa do ácido linoleico ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M) com o butil -hidroxitolueno a 1 mM.

Dia	Absorvância a 234 nm		
	Butil - hidroxitolueno	Ácido linoleico	Mistura
0,0	0,117	0,694	0,458
0,1	0,120	0,736	0,558
0,3	0,121	0,747	0,574
1,0	0,122	0,798	0,576
1,5	0,124	0,826	0,580
2,0	0,126	0,849	0,582
2,5	0,139	0,991	0,612
3,0	0,137	0,983	0,609
3,5	0,133	0,974	0,596
4,0	0,131	0,951	0,590
4,5	0,120	0,934	0,588
7,0	0,117	0,913	0,575
8,0	0,103	0,829	0,570
9,0	0,096	0,777	0,565

Tabela A.5 – Valores das absorvâncias para o estudo da estabilidade oxidativa do ácido linoleico ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M) com o galhato de metilo a 0,1 mM

Dias	Absorvâncias a 234 nm		
	Galhato de metilo	Ácido linoleico	Mistura
0,0	0,058	0,536	0,434
0,1	0,070	0,554	0,475
0,3	0,077	0,584	0,567
1,0	0,079	0,587	0,578
1,5	0,082	0,608	0,580
2,0	0,094	0,620	0,586
2,5	0,092	0,741	0,592
3,0	0,086	0,710	0,590
3,5	0,084	0,678	0,587
4,0	0,083	0,651	0,578
4,5	0,081	0,631	0,576
7,0	0,075	0,607	0,541
8,0	0,066	0,586	0,521

Tabela A.6 – Valores das absorvâncias para o estudo da estabilidade oxidativa do ácido linoleico ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M) com o galhato de metilo a 1mM

Dias	Absorvância a 234 nm		
	Galhato de metilo	Ácido linoleico	Mistura
0,0	0,193	0,451	0,424
0,1	0,217	0,642	0,474
0,3	0,221	0,700	0,475
1,0	0,226	0,721	0,486
1,5	0,237	0,733	0,494
2,0	0,250	0,745	0,529
2,5	0,244	0,820	0,576
3,0	0,160	0,736	0,542
3,5	0,130	0,706	0,498
4,0	0,128	0,687	0,454
4,5	0,127	0,684	0,388
7,0	0,115	0,662	0,387
8,0	0,103	0,593	0,384

Tabela A.7 – Valores das absorvâncias para o estudo da estabilidade oxidativa do ácido linoleico ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M) com o galhato de etilo a 0,1mM

Dias	Absorvâncias a 234 nm		
	Galhato de etilo	Ácido linoleico	Mistura
0,0	0,064	0,495	0,448
0,1	0,071	0,542	0,507
0,3	0,096	0,730	0,544
1,0	0,129	0,874	0,630
1,5	0,160	0,940	0,695
2,0	0,146	1,028	0,720
2,5	0,112	1,030	0,730
3,0	0,091	1,005	0,670
3,5	0,086	0,950	0,612
5,0	0,079	0,825	0,505
7,0	0,077	0,709	0,480
8,0	0,075	0,662	0,471
9,0	0,073	0,603	0,462
10,0	0,072	0,597	0,455

Tabela A.8 – Valores das absorvâncias para o estudo da estabilidade oxidativa do ácido linoleico ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M) com o galhato de etilo a 1mM

Dias	Absorvância a 234 nm		
	Galhato de etilo	Ácido linoleico	Mistura
0,0	0,234	0,600	0,553
0,1	0,242	0,613	0,600
0,3	0,247	0,682	0,609
1,0	0,259	0,938	0,650
1,5	0,265	1,092	0,698
2,0	0,174	1,147	0,731
2,5	0,152	1,161	0,615
3,0	0,148	0,931	0,580
3,5	0,147	0,723	0,534
5,0	0,130	0,623	0,508
7,0	0,118	0,538	0,494
8,0	0,112	0,532	0,485
9,0	0,101	0,498	0,475
10,0	0,096	0,486	0,464

Tabela A.9 – Valores das absorvâncias para o estudo da estabilidade oxidativa do ácido linoleico ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M) com o galhato de propilo a 0,1mM.

Dias	Absorvâncias a 234 nm		
	Galhato de propilo	Ácido linoleico	Mistura
0,0	0,042	0,550	0,487
0,1	0,050	0,586	0,497
0,3	0,095	0,798	0,539
1,0	0,120	0,891	0,550
1,5	0,145	0,948	0,553
2,0	0,162	0,970	0,555
2,5	0,100	0,992	0,589
3,0	0,098	0,981	0,528
3,5	0,090	0,953	0,516
4,0	0,075	0,889	0,515
4,5	0,069	0,840	0,511
5,0	0,061	0,792	0,510
7,0	0,054	0,704	0,495
8,0	0,046	0,647	0,494
9,0	0,038	0,639	0,492
10,0	0,030	0,634	0,481

Tabela A.10 – Valores das absorvâncias para o estudo da estabilidade oxidativa do ácido linoleico ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M) com o galhato de propilo a 1mM.

Dias	Absorvância a 234 nm		
	Galhato de propilo	Ácido linoleico	Mistura
0,0	0,137	0,540	0,524
0,1	0,140	0,566	0,544
0,3	0,177	0,617	0,581
1,0	0,178	0,743	0,644
1,5	0,179	0,828	0,664
2,0	0,186	0,985	0,674
2,5	0,180	1,130	0,600
3,0	0,176	0,983	0,564
3,5	0,168	0,772	0,547
4,0	0,160	0,662	0,529
4,5	0,159	0,561	0,518
5,0	0,158	0,540	0,511
7,0	0,157	0,511	0,506
8,0	0,155	0,505	0,459
9,0	0,150	0,495	0,447
10,0	0,144	0,485	0,440

Tabela A.1.1 – Valores das absorvâncias para o estudo da estabilidade oxidativa do ácido linoleico ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M) com o galhato de butilo a 0,1mM.

Dias	Absorvâncias a 234 nm		
	Galhato de butilo	Ácido linoleico	Mistura
0,0	0,047	0,575	0,523
0,1	0,058	0,621	0,530
0,3	0,079	0,643	0,544
1,0	0,086	0,650	0,558
1,5	0,090	0,661	0,561
2,0	0,094	0,764	0,567
2,5	0,090	0,975	0,538
3,0	0,084	0,920	0,535
3,5	0,082	0,762	0,524
4,0	0,078	0,710	0,523
4,5	0,076	0,670	0,522
7,0	0,067	0,646	0,521
8,0	0,062	0,624	0,519
9,0	0,061	0,596	0,512

Tabela A.12 – Valores das absorvâncias para o estudo da estabilidade oxidativa do ácido linoleico ($2,5 \cdot 10^{-3}$ M) com o galhato de butilo a 1mM.

Dias	Absorvância a 234 nm		
	Galhato de butilo	Ácido linoleico	Mistura
0,0	0,231	0,624	0,613
0,1	0,266	0,716	0,635
0,3	0,279	0,732	0,648
1,0	0,353	0,805	0,659
1,5	0,404	0,893	0,667
2,0	0,331	0,952	0,679
2,5	0,320	1,006	0,686
3,0	0,263	0,986	0,652
3,5	0,262	0,946	0,649
4,0	0,258	0,891	0,642
4,5	0,256	0,875	0,633
7,0	0,239	0,864	0,624
8,0	0,222	0,848	0,610
9,0	0,216	0,834	0,525

Exemplo de cálculo:

Por exemplo, a percentagem de inibição da oxidação do ácido linoleico, usando o galhato de butil (1m M) misturado com o ácido linoleico, tem o seguinte valor:

$$\% \text{ I. O} = \left(\frac{((0,991) - (0,612 - 0,139))}{0,991} \right) \cdot 100 \Leftrightarrow \% \text{ I. O} = 63,62 \%$$

Equação A.1