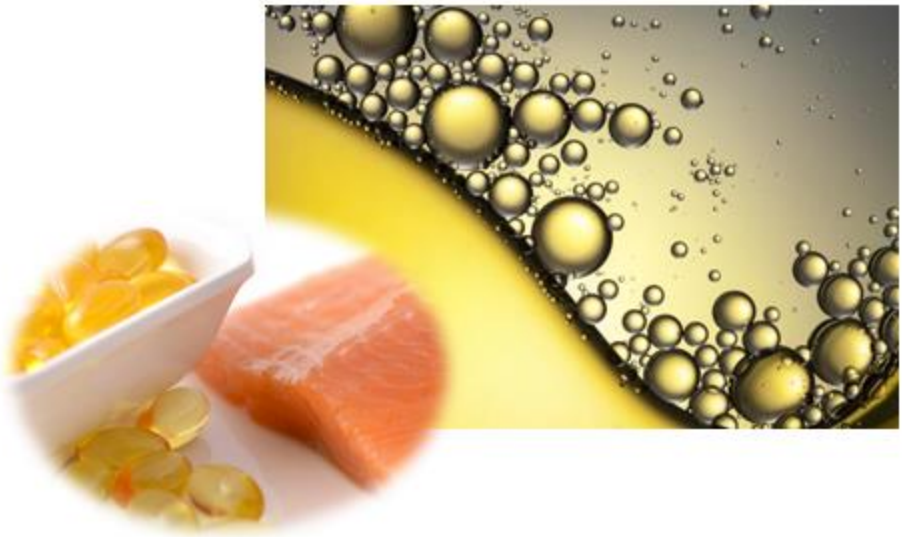


Estratégias antioxidantes para a prevenção da oxidação lipídica em sistemas emulsionados alimentares ricos em ácidos gordos ómega-3

Marlene Andreia Pereira Costa

Doutoramento em Química Sustentável

Departamento de Química e Bioquímica

2019

Orientador

Maria de Fátima Paiva Martins, Professora Auxiliar

Faculdade de Ciências, Universidade do Porto

Coorientador

Carlos Bravo Díaz, Professor Catedrático

Faculdade de Química, Universidade de Vigo

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostava de agradecer à Fundação Para a Ciência e Tecnologia (FCT) pelo financiamento deste trabalho na forma de uma bolsa de Doutoramento (SFRH/BD/100889/2014) sem a qual a realização deste trabalho não seria possível.

Gostava de agradecer à minha orientadora, Professora Doutora Fátima Paiva Martins, sem a qual este trabalho não seria possível. Agradeço todos os conhecimentos que me transmitiu, o seu constante apoio, a sua disponibilidade, todas as conversas de foro pessoal e científico, a sua paciência e amizade. Muito obrigada!

Ao professor Doutor Carlos Bravo Díaz, da Faculdade de Química da Universidade de Vigo, coorientador, agradeço por me ter proporcionado a oportunidade de desenvolver uma parte deste trabalho na Faculdade de Química da Universidade de Vigo.

Ao professor António Vicente, da Universidade do Minho pela simpatia e disponibilidade na cedência de equipamentos necessários para este trabalho.

Agradeço especialmente às minhas colegas e amigas Karen João e Inês Ferreira, a total disponibilidade para me ajudarem, todas as ideias partilhadas, não só a nível científico, mas também pessoal, o carinho manifestado, a amizade e todos os momentos de boa disposição. Foi um privilégio trabalhar com vocês.

Aos meus colegas do laboratório que me acompanharam ao longo de todos estes anos, sempre presentes para qualquer esclarecimento, ajuda e ensinamento, por todos os bons momentos passados, pelas gargalhadas e por toda a ciência que se foi fazendo.

Aos meus amigos que, direta ou indiretamente, me ajudaram ao longo destes anos. Pelos bons momentos passados, pelos jantares, pelas gargalhadas, pelo apoio e por fazerem tudo parecer tão simples.

À minha família, em especial aos meus pais, por tudo o que me proporcionaram e proporcionam, pelo amor, apoio e motivação ao longo destes anos. Sem eles nada teria sido possível.

Finalmente, ao meu marido, por todo o apoio, incentivo e paciência em todos os momentos, pela compreensão e carinho e por ter estado sempre presente quando mais precisei ao longo destes anos. E por tudo aquilo que significa para mim.

Resumo

É de grande interesse para a indústria alimentar a utilização de óleos contendo ácidos gordos insaturados como ingredientes funcionais para melhorar o perfil nutricional dos produtos alimentares. No entanto, a oxidação de lípidos polinsaturados é um grave problema, devido a produção de odores a ranço, aromas desagradáveis, e substâncias tóxicas, que diminuem o tempo de prateleira e pode alterar a qualidade, textura e aparência dos alimentos, resultando em importantes reduções na qualidade nutricional e na segurança dos alimentos.

O problema da oxidação lipídica em alimentos é agravado quando são empregues lípidos contendo ácidos gordos ómega-3 como parte da dieta ou na preparação produtos saborosos, fáceis de usar e com elevado tempo de prateleira. Apesar de terem efeitos benéficos na saúde humana, incluindo proteção contra doenças cardiovasculares, cancro, hipertensão, diabetes e artrite reumatoide, bem como a melhoria das funções neurológicas e retinais e reduzir a suscetibilidade a tumores, estes ácidos gordos estão sujeitos à rápida e/ou extensa oxidação e a outras alterações químicas durante o processamento e armazenamento.

Para prevenir ou minimizar a oxidação lipídica, a adição de antioxidantes ao sistema alimentar é provavelmente o método mais conveniente e económico, sendo assim o desenvolvimento de estratégias para selecionar o melhor antioxidante ou grupo de antioxidantes para um sistema alimentar um desafio. A eficiência dos antioxidantes (AOs) na inibição da oxidação dos lípidos (ácidos gordos polinsaturados, PUFAs) depende de vários fatores, incluindo a natureza do AO e sua concentração no local da reação.

Muitos antioxidantes têm elevada solubilidade em água, o que limita a sua atividade antioxidante em sistemas emulsionados, aparentemente devido ao fato de se encontrarem em elevada percentagem na fase aquosa. Assim, tem surgido a necessidade de encontrar novos antioxidantes com características de solubilidade diferente, mas que possuam a mesma atividade antirradicalar ou superior.

Neste estudo sintetizaram-se vários ésteres a partir do ácido gálico, hidroxitirosol, ácido clorogénico e ácido cafeico com ácidos ou álcoois lineares com diferentes tamanho de cadeia alquílica (C1 a C16) e determinou-se a sua distribuição em sistemas emulsionados O/A. Analisou-se igualmente o efeito do tamanho das gotas, concentração de emulsionante e a da relação óleo/água nesta distribuição.

Avaliou-se a capacidade antirradicalar frente ao radical DPPH das várias séries de compostos tendo-se verificado que a capacidade antirradicalar não variou significativamente dentro da mesma série de compostos, demonstrando que a cadeia alquílica introduzida não alterou a reatividade dos compostos. Do mesmo modo, também não se verificou alterações nos valores do primeiro potencial anódico (*Epa*) determinados dentro de cada série, mesmo na presença de Tween 80. No entanto verificaram-se valores de *Epa* um pouco diferentes entre algumas séries, tendo a série do ácido gálico apresentado o menor valor médio (0,36 V) seguido da série do ácido cafeico, ácido clorogénico e hidroxitirosol (0,39 V, 0,40 V e 0,41 V respetivamente). A eficiência antioxidante dos vários compostos foi posteriormente avaliada nos mesmos sistemas emulsionados intactos e efetuou-se um estudo de correlação entre a distribuição e a atividade antioxidante observada.

Para determinar a distribuição dos antioxidantes nos sistemas emulsionados utilizou-se um método cinético (método cinético da pseudofase) que não requer o isolamento das várias regiões da emulsão. Assim, foi possível obter uma boa estimativa das duas constantes de partição que descrevem a distribuição do antioxidante entre as regiões oleosa / interfacial (P_O^I) e aquosa / interfacial (P_A^I) de emulsões e nanoemulsões óleo de peixe / Tween 80 / água e de emulsões de azeite / Tween 20 / água. Este método é baseado no modelo cinético da pseudofase para emulsões termodinamicamente estáveis, o qual explora a reação entre o ião 4- hexadecilbenzenodiazonio, localizado exclusivamente na região interfacial, e o antioxidante. Monitorizou-se a constante de velocidade (k_{obs}) da reação através de um método de derivatização baseado na reação de iões arenodiazónio, que não reagem com o antioxidante, com um agente acopulante adequado N-1 (1-Naftil) etilenodiamina (NED) que, produz um corante azóico estável, cuja concentração pode ser medida espectroscopicamente a um comprimento de onda de 572 nm.

Todas as séries homólogas de antioxidantes mostraram um aumento na atividade antioxidante com o aumento do comprimento da cadeia alquílica até um máximo, seguido por uma diminuição significativa para AOs mais hidrofóbicos. Esta observação é tipicamente chamada de efeito cut off. A eficiência antioxidante das várias séries de polifenóis nos sistemas emulsionados usados correlacionou sempre positivamente com a concentração de antioxidante na região interfacial. Os resultados mostraram que os antioxidantes se acumularam na região interfacial em concentração 20 a 195 vezes superior à concentração estequiométrica, depende do tamanho da cadeia alquílica do antioxidante. No geral, antioxidantes possuindo cadeias alquílicas de

tamanho intermédio (8 a 12 carbonos) tendem apresentar as maiores concentrações na região interfacial e consequentemente a apresentar também a melhor atividade antioxidante nos sistemas emulsionados estudados.

Ao aumentar a fração emulsionante, resultou num aumento da percentagem de todos os compostos na região interfacial. No entanto, a estabilidade oxidativa das emulsões diminuiu quando a fração de emulsionante aumentou, pois ocorreu uma diluição do AO, uma vez que o aumento da percentagem de AO na região interfacial não foi suficiente para contrabalançar o aumento da fração de AO desta região. Portanto, uma das principais conclusões deste trabalho foi que, para obter uma maior estabilidade oxidativa numa emulsão alimentar com o uso de AO, a quantidade de emulsionante empregue para a estabilizar fisicamente a emulsão deve ser a menor possível.

Uma das hipóteses em que se baseia o modelo da pseudofase é que sua aplicação é independente do tamanho das gotas da emulsão. Os resultados mostraram que o menor tamanho de gota encontrado nas nanomulsões não afetou de facto as constantes de partição das várias séries de derivados de polifenóis, de acordo com nossa hipótese. Apesar do tamanho das gotas serem menores, a estabilidade oxidativa das nanoemulsões foi maior que a estabilidade oxidativa da emulsão usada na sua preparação, indicando que a velocidade das reações químicas durante a oxidação depende da concentração dos reagentes na região interfacial e não da superfície interfacial. O aumento da relação óleo/água aumentou a estabilidade oxidativa global das emulsões, mas diminuiu a eficiência dos antioxidante mais lipofílicos quando comparados com os mais hidrofílicos, pois o aumento do volume da fase oleosa diminuiu a concentração interfacial deste antioxidantes.

A natureza do óleo e, em particular, o grau de insaturação dos seus ácidos gordos (PUFAs) desempenha um papel fundamental na estabilidade oxidativa. Em geral, quanto maior o teor de PUFAs do óleo, menor sua estabilidade. A fim de destacar de forma mais evidente a diferença no poder antioxidante de alguns fenolípidos e de destacar melhor os efeitos da distribuição na atividade antioxidante, efetuou-se um estudo com alguns fenolípidos com cadeia alquílica de 8 e 16 carbonos num sistema com mais estabilidade oxidativa, azeite / Tween 20/ tampão citrato. Neste trabalho tentou-se efetuar a correlação entre atividade antioxidante, a distribuição e reatividade das moléculas. A concentração dos antioxidantes na região interfacial obteve um maior valor de correlação de Pearson (0,78) seguido do potencial anódico das moléculas (-0,54) e da concentração dos antioxidantes na região aquosa (-0,45). Através de uma

analise de regressão linear stepwise os fatores (AO_I), (AO_A) e o *Epa* conseguiram explicar 76 % dos resultados obtidos na atividade antioxidante das várias moléculas para um $p < 0,05$, confirmando a grande importância da localização (distribuição) dos antioxidantes para a sua atividade antioxidante.

A eficiência dos antioxidantes (AO) em emulsões alimentares depende tanto de sua reatividade quanto da sua concentração na região interfacial, onde se acredita que as reações de oxidação ocorram. Os resultados em emulsões de azeite/água com uma fração de emulsionante de $\Phi = 0,005$ mostram que os derivados do hidroxitirosol e ácido cafeico C8, com percentagem semelhante na região interfacial e potencial oxidativo semelhante, apresentaram atividade antioxidante semelhante. O éster do ácido diidrocafeico DH8 apresentou a melhor atividade antioxidante devido ao seu menor potencial oxidativo. O derivado HT16 do hidroxitirosol, apresentou menor concentração na região interfacial do que o derivado do ácido cafeico AC16 e, portanto, uma menor atividade antioxidante. Estes resultados suportam fortemente a ideia de que a eficiência de um AO se correlaciona com a sua concentração na região interfacial e com o seu potencial de oxidação.

Palavras chaves: Antioxidantes; emulsões; nanoemulsões; ácido gálico; hidroxitirosol; ácido cafeico, ácido clorogénico; óleo de peixe; ácidos gordos ómega-3; constantes de partição; eficiência antioxidante; distribuição.

Abstract

It is of great interest to food manufacturers to use unsaturated fatty acids as functional ingredients to improve the nutritional profile of food products. However, oxidation of polyunsaturated lipids is a serious problem because it produces rancid odors, off flavors, decreases shelf life and can alter the quality, texture, and appearance of foods, resulting in important decreases in the nutritional quality and safety of foods.

The problem is exacerbated when omega-3 fatty acids are employed as part of the diet or to prepare high demanding, easy-to-use, tasty products with long shelf-live because they are subject to rapid and/or extensive oxidation and other chemical changes during processing and storage by means of exposure to air, light, trace metals. In spite of their beneficial effects on human health, including protection against cardiovascular disease, cancer, hypertension, diabetes and rheumatoid arthritis, improved brain and retinal function in infants and reduced susceptibility to tumors, these fatty acids are subject to rapid and/or extensive oxidation and other chemical changes during processing and storage.

To prevent or minimize lipid oxidation, addition of antioxidants to the food system is probably the most convenient and economical method and the development of strategies to select the best antioxidant or group of antioxidants for a given food system is a challenge. The efficiency of AOs in inhibiting lipid (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) oxidation depends on several factors, including the nature of the AO and their concentration at the reaction site.

Many antioxidants have very high solubility in water which limits its antioxidant activity in emulsion systems, apparently due to the fact they are in high proportion in the aqueous phase. Therefore, it is of a great interest the preparation of new antioxidants with different solubility characteristics but having a similar antiradical activity.

In this study, esters of gallic acid, hydroxytyrosol, chlorogenic acid and caffeic acid with linear acids or alcohols with different alkyl chain sizes (C1 to C16) were synthesized and their distribution was determined in O / W emulsified systems. The effect of the droplet size, surfactant concentration and oil / water ratio on this distribution was also analyzed. The scavenging activity of DPPH radical of the various series of compounds was evaluated and the scavenging activity was found not to vary significantly within the same series of compounds, demonstrating that the alkyl chain grafted to the molecule did not affect the reactivity of the compounds. Similarly, there were no changes in the values of the first anodic potential (*Epa*) within each series, even in the presence

of Tween 80. However, slightly different *Epa* values were observed between some series, showing the gallic acid series the lowest mean value (0,36 V) followed by the series of caffeic acid, chlorogenic acid and hydroxytyrosol (0,39 V, 0,40 V and 0,41 V respectively). The antioxidant efficiency of the various compounds was further evaluated in the same intact emulsified systems and a correlation study was performed between the distribution and the antioxidant activity observed.

To determine the antioxidants distribution in the emulsified systems a kinetic method (Pseudophase kinetic model) that does not require isolation of emulsions regions was used. With this method it was possible estimate the partition constants of AO between the oil/interfacial, P_O^I, and the aqueous/interfacial, P_W^I, regions of the fish oil /Tween 80/acidic water and olive oil /Tween 20/ acidic water emulsified systems. This method is based in the pseudophase model for thermodynamically stable emulsions and exploits the reaction of 4-hexadecylbenzenediazonium ions, 16-ArN_2^+, trapped at the interfacial region of the emulsion, with antioxidants. The observed rate constant (k_{obs}) of the reaction was monitored by employing a derivatization method based on the rapid reaction of ArN_2^+ ions with a suitable coupling agent such as *N*-(1-naphthyl)ethylenediamine (NED), yielding a stable azo dye, whose concentration could be measured spectroscopically at the wavelength of 572 nm.

All series of homologous antioxidants, AOs, showed that an increase in the antioxidant activity with the increase alkyl chain length until a maximum, followed by a significant decrease for more hydrophobic AOs. This observation is typically called the cut-off effect. The antioxidant efficiency of the various polyphenols series in the emulsified systems used always correlated positively with the antioxidant concentration in the interfacial region. The results showed that the antioxidants accumulated in the interfacial region in a concentration 20 to 195 times higher than the stoichiometric concentration, depending on the size of the alkyl chain of the antioxidant. In general, antioxidants having intermediate alkyl chains (8 to 12 carbons) tend to be at the highest concentration in the interfacial region and consequently also to have the best antioxidant activity in the studied emulsion systems.

When increasing the emulsifier fraction the outcome was an increase in the percentage of all compounds in the interfacial region. However, the emulsion oxidative stabilization decreased when emulsifier fraction increased since there was a dilution of the AO and the percentage of the AO in the interfacial region was not sufficient to counteract the increase in the fraction of this region. Therefore, one of the main conclusions of this work was that in order to obtain the highest oxidative stability in a

food emulsion with the use of an AO, the amount of emulsifier used for the physical stabilization of the emulsion should as small as possible.

One of the hypotheses on which the pseudophase model is based is that its application is independent of the size of the emulsion droplets. Results showed that the smaller droplet size found in nanoemulsions did not affect partition constants of the various series of polyphenols derivatives, in agreement with our hypothesis. Besides the droplet size being smaller, the oxidative stability of nanoemulsions was higher than the oxidative stability of the coarse emulsion used in their preparation indicating that the rates of chemical reactions during oxidation depend on the concentrations of the reactants at the interfacial region and not on the reaction surface area as we initially assume. The increase in the oil/water ratio increased the overall oxidative stability of emulsions but decreased the antioxidant efficiency of the more lipophilic derivatives when compared with the more hydrophilic ones, because the increase in the oil phase volume decreased the interfacial concentration of these more lipophilic antioxidants.

The nature of the oil and, in particular, the degree of unsaturation of its fatty acids (PUFAs) plays a key role in their oxidative stability. In general, the higher the PUFAs content of the oil, the lower its stability. In order to highlight more clearly the difference in the antioxidant power of some phenolipids and to highlight more clearly the effects of distribution on the antioxidant activity, a study was carried out with some 8 and 16 carbon alkyl chain phenolipids derivatives in a system with a more oxidative stability, olive oil / Tween20/acidic water emulsions. In this work we tried to correlate the antioxidant activity with the distribution and reactivity of the molecules. The concentration of antioxidants in the interfacial region obtained a higher Pearson correlation (0,78) followed by the anodic potential of the molecules (-0,54) and the antioxidant concentration in the aqueous region (-0,45). Through a stepwise linear regression analysis the factors (AO_I), (AO_A) and *Epa* were able to explain 76 % of the results obtained in the antioxidant activity of the various molecules ($p < 0,05$), confirming the great importance of the location (distribution) of the antioxidants for their antioxidant activity.

The Antioxidant (AO) efficiency in emulsions depends both on their reactivity and on their concentration in the interfacial region, where oxidation is believed to be initiated. Results show that in olive oil in water emulsions at emulsifier volume fraction of Φ_I=0,005, hydroxytyrosol and caffeic acid derivatives C8, with similar percentage at the interfacial and a similar oxidative potential, showed similar antioxidant activity. The dihydrocaffeic acid ester DH8 showed the best antioxidant activity due to its lower oxidative potential. The HT16 derivative of hydroxytyrosol, showed lower concentration in the interface than

the caffeic acid AC16 derivative and, therefore, a lower antioxidant activity. These results strongly support the idea that the efficiency of an AO correlates with its fraction in the interfacial region and with their oxidative potential. Again, in these olive oil emulsions, an increase in the surfactant concentration (e.g., Φ_l) promoted the incorporation of AOs to the interfacial region. However, the addition of more surfactant in an effort to enhance their percentage in the interfacial region resulted in a decrease in the efficiency of all antioxidants used because of the dilution effect

KEYWORDS: Antioxidants; emulsion; nanoemulsion; gallic acid; hydroxytyrosol; Caffeic acid; chlorogenic acid; fish oil; omega-3 fatty acids; partition constants; antioxidant efficiency; distribution.

Índice

Agradecimentos III

Resumo V

Abstract IX

Índice XIII

Lista de Figuras XXI

Lista de Tabelas XXXV

Lista de Abreviaturas e Símbolos XXXIX

I. Introdução 1

1. Gorduras alimentares 3
2. Sistemas dispersos 5
   2.1. Macroemulsões, nanoemulsões e microemulsões 6
   2.2. Estabilidade física dos sistemas emulsionados 11
      2.2.1. Tamanho da gota e índice de polidispersão 12
      2.2.2. Potencial zeta 13
      2.2.3. Aspeto Morfológico 13
3. Oxidação lipídica 14
   3.1. Autoxidação 15
   3.2. Fotoxidação 17
   3.3. Decomposição dos hidropéroxidos 17
   3.4. Fatores que influenciam a velocidade de oxidação dos lípidos em alimentos 19
   3.5. Fatores que afetam a oxidação lipídica em sistemas emulsionados 20
   3.6. Avaliação da extensão da oxidação lipídica 21
      3.6.1. Índice de peróxidos (IP) 23
      3.6.2. Determinação do conteúdo em Dienos Conjugados 24
4. Adição de antioxidantes: uma estratégia para inibir oxidação lipídica 25
   4.1. Antioxidantes 25
      4.1.1. Antioxidantes primários 25
      4.1.2. Antioxidantes secundários 30
   4.2. Compostos fenólicos 31
      4.2.1. Ácido hidroxicinâmico e seus derivados 32

4.2.2. Ácido Gálico e seus ésteres 37
4.2.3. Hidroxitirosol e seus ésteres 39
4.3. Avaliação da capacidade antioxidante 40
4.3.1. Capacidade antirradicalar - Método de DPPH [126] 43
4.3.2. Determinação do primeiro potencial anódico 44
4.3.3. Teste da estufa de Schaal (“Schaal Oven Test”) 46
4.4. Eficácia antioxidante em sistemas emulsionados 46
4.5. Uso de sal arenodiazónio como sonda química para a determinação da distribuição dos AO em sistemas emulsionados 50
5. Modelo Cinético da Pseudofase (MCP) 53
5.1. Simplificação do modelo cinético da pseudofase (MPCS) 59

II. Objetivos 65

III. Métodos e procedimentos experimentais 71

1. Reagentes e Equipamentos 73
2. Síntese de ésteres do ácido cinâmico 75
2.1. Síntese de monomalonatos 75
2.1.1. Caracterização espectroscópica dos monomalonatos 75
2.2. Síntese de cinamatos 78
3. Síntese dos ésteres do hidroxitirosol e tirosol 83
3.1. Caraterização espetroscópica dos ésteres do hidroxitirosol e tirosol 84
4. Síntese de ésteres do ácido clorogénico 88
4.1. Síntese do clorogenato CGA1 88
4.2. Síntese dos clorogenatos CGA2-CGA4 88
4.3. Síntese dos clorogenatos CGA6-CGA16 89
4.4. Caraterização espetroscópica dos ésteres derivados do ácido clorogénico 89
5. Síntese de derivados do ácido diidrocafeico 92
5.1. Caraterização espetroscópica dos ésteres do ácido diidrocafeico 93
6. Preparação dos sistemas emulsionados 94
6.1. Obtenção do óleo de peixe e do azeite livre de antioxidantes naturais 94
6.1.1. Remoção de compostos fenólicos 95
6.1.2. Remoção de tocoferóis 95
6.1.3. Quantificação dos fenóis totais no azeite preparado [253] 95
6.1.4. Determinação dos ácidos gordos do óleo de peixe e do azeite 96
6.2. Preparação de emulsões 97

6.3. Preparação de nanoemulsões 97
6.3.1. Caracterização física das nanoemulsões 98
7. Determinação da constante de partição $\boldsymbol{PA0}$ em sistemas binários 101
8. Determinação das constantes de partição 102
8.1. Síntese do sal de arenodiazónio 102
8.2. Método de derivatização: Formação de um corante 103
8.3. Determinação das constantes de velocidade k_{obs} aplicando o método de derivatização 104
9. Avaliação da atividade antioxidante 105
9.1. Atividade antirradicalar frente ao radical DPPH [63] 106
9.2. Avaliação da reatividade por voltametria cíclica. 106
9.3. Teste da estufa de Schaal (“Schaal Oven Test”) 107
9.3.1. Determinação do Conteúdo em Dienos Conjugados 107
9.3.2. Determinação do índice de peróxidos 108
10. Análise estatística 109

IV. Resultados e Discussão 111

Capítulo 1 – Caracterização Físico-Química dos sistemas emulsionados 113

1. Emulsões O/A 115
1.1. Composição Química 115
1.2. Tamanho de gota, polidispersão e potencial zeta 118
2. Nanoemulsão 119
2.1. Tamanho da gota, polidispersão e potencial zeta das nanoemulsões 119
2.1.1. Efeito do número de ciclos no tamanho de gota 119
2.1.2. Efeito da concentração de emulsionante 120
2.1.2.2. Potencial Zeta 121
2.2. Morfologia das nanoemulsões 122
2.3. Estabilidade física: Efeito do tempo de armazenamento 123
2.3.1. Variação do tamanho de gota médio e polidispersão ao longo do tempo – DLS…… 123
2.3.2. Método de dispersão de luz múltipla (Turbiscan) 124
2.4. Estudos teóricos 125

Capítulo 2 – Ácido Gálico e derivados 127

1. Reatividade do ácido gálico e seus derivados 129
1.1. Reatividade do ácido gálico e derivados frente ao radical DPPH$^{\bullet}$ 129
1.2. Determinação do primeiro potencial anódico - Voltametria Cíclica 131

2. Distribuição do ácido gálico e seus derivados em sistemas binários 132
2.1. Constantes de partição $\boldsymbol{PAO}$, em sistemas binários óleo/água..... 132
3. Distribuição do ácido gálico e seus derivados em emulsões 134
3.1. Determinação das constantes de partição do ácido gálico e do galato de metilo em emulsões de óleo de peixe/tampão citrato (O/A) 134
3.1.1. Distribuição do ácido gálico e do galato de metilo 137
3.2. Determinação das constantes de partição do galato de etilo e do galato de butilo em emulsões de óleo de peixe em tampão citrato (O/A) 138
3.2.1. Distribuição do galato de etilo e do galato de butilo..... 141
3.3. Determinação das constantes de partição do galato de octilo e do galato de dodecilo em emulsões óleo de peixe/tampão citrato (O/A) 142
3.3.1. Distribuição do galato de octilo e do galato de dodecilo 144
3.4. Análise comparativa da distribuição do ácido gálico e dos seus derivados em emulsões 145
3.5. Concentrações efetivas do ácido gálico e seus derivados nas regiões oleosa, aquosa e interfacial das emulsões O/A..... 148
4. Distribuição do ácido gálico e seus derivados em nanoemulsões 152
4.1. Determinação das constantes de partição do ácido gálico e seus derivados em nanoemulsões 153
4.1. Concentrações efetivas do ácido gálico e derivados nas regiões oleosa, aquosa e interfacial das nanoemulsões..... 158
5. Análise comparativa da distribuição dos antioxidantes em emulsões e nanoemulsões..... 161
6. Avaliação da atividade antioxidante em sistemas emulsionados..... 163
6.1. Atividade antioxidante do ácido gálico e seus derivados em emulsões ... 163
6.2. Atividade antioxidante do ácido gálico e seus derivados em nanoemulsões..... 167
7. Análise comparativa da eficácia antioxidante em emulsões e nanoemulsões 170

Capítulo 3 – Hidroxitirosol e derivados..... 175

1. Síntese dos derivados do Hidroxitirosol..... 177
2. Reatividade do hidroxitirosol e seus derivados..... 179
2.1. Reatividade do hidroxitirosol e seus derivados frente ao radical DPPH$^{\bullet}$.. 179
2.2. Determinação do primeiro potencial anódico - Voltametria Cíclica 181
3. Distribuição do hidroxitirosol e seus derivados em sistemas binários 182
3.1. Constantes de partição $\boldsymbol{PAO}$, em sistemas binários óleo/água..... 182
4. Distribuição do hidroxitirosol e seus derivados em emulsões 183

4.1. Constantes de partição do hidroxitirosol e seus derivados em emulsões óleo de peixe/tampão citrato (O/A) 183
4.2. Concentrações efetivas dos antioxidantes nas regiões oleosa, aquosa e interfacial das emulsões 188
5. Distribuição do hidroxitirosol e seus derivados em nanoemulsões 191
5.1. Constantes de partição do hidroxitirosol (HT) e seus derivados em nanoemulsões 191
5.2. Concentrações efetivas do HT e seus derivados em cada região da nanoemulsão O/A 196
6. Análise comparativa da distribuição dos antioxidantes em emulsões e nanoemulsões 199
7. Avaliação da atividade antioxidante em sistemas emulsionados e correlação com a sua distribuição 201
7.1. Atividade antioxidante do hidroxitirosol e seus derivados em emulsões O/A…… 201
7.1.1. Correlação da distribuição com a eficácia antioxidante em emulsões O/A…… 203
7.2. Atividade antioxidante do hidroxitirosol e seus derivados em nanoemulsões O/A……. 204
7.2.1. Correlação da distribuição com a eficácia antioxidante em nanomulsões O/A…… 205

Capítulo 4 – Ácido Clorogénico e Derivados 207

1. Síntese dos derivados do ácido clorogénico 209
2. Reatividade do ácido clorogénico e seus derivados 210
2.1. Avaliação da atividade antirradicalar – Método do DPPH$^{\bullet}$ 210
2.2. Determinação do primeiro potencial anódico - Voltametria Cíclica 212
3. Distribuição do ácido clorogénico e seus derivados 213
3.1. Constantes de partição $\boldsymbol{PAO}$ em sistemas binários óleo/água 213
4. Distribuição do ácido clorogénico e seus derivados em emulsões O/A 214
4.1. Constantes de partição do ácido clorogénico e seus derivados em emulsões óleo de peixe/tampão citrato (O/A) 214
4.2. Concentrações efetivas do ácido clorogénico e seus derivados em cada região da emulsão 219
5. Distribuição do ácido clorogénico e seus derivados em nanoemulsões 223
5.1. Constantes de partição do ácido clorogénico e seus derivados em nanoemulsões 223

5.2. Concentrações efetivas do ácido clorogénico e seus derivados em cada região da nanoemulsão O/A 228
6. Análise comparativa da distribuição dos antioxidantes em emulsões e nanoemulsões O/A..... 230
7. Avaliação da atividade antioxidante em sistemas emulsionados e correlação com a sua distribuição 232
7.1. Atividade antioxidante do ácido clorogénico e seus derivados em emulsões O/A…….. 232
7.1.1. Correlação da distribuição com a eficácia antioxidante em emulsões O/A……..... 233
7.2. Atividade antioxidante do ácido clorogénico e seus derivados em nanoemulsões O/A 235
7.2.1. Correlação da distribuição com a eficácia antioxidante em nanoemulsões O/A..... 236

Capítulo 5 – Ácido Cafeico e derivados 239

1. Síntese do ácido cafeico e seus derivados..... 241
1.1. Síntese de monomalonatos..... 241
1.2. Síntese de cafeiatos..... 242
2. Reatividade do ácido cafeico e seus derivados 244
2.1. Reatividade do ácido cafeico e derivados frente ao radical DPPH•..... 244
2.2. Determinação do primeiro potencial anódico - Voltametria Cíclica..... 246
3. Distribuição do ácido cafeico e seus ésteres..... 247
3.1. Determinação das constantes de partição $\boldsymbol{PAO}$ em sistemas binários óleo/água..... 247
3.2. Determinação das constantes de partição do ácido cafeico e seus derivados em emulsões óleo de peixe/tampão citrato (O/A)..... 248
4. Avaliação da atividade antioxidante em emulsões 253
5. Correlação da distribuição com a eficácia antioxidante 256

Capítulo 6 – Comparação da eficácia AO de alguns polifenóis 261

1. Síntese dos diferentes polifenóis..... 264
2. Reatividade dos diferentes polifenóis 265
3. Distribuição das várias famílias de polifenóis 267
4. Atividade antioxidante 271
5. Correlação entre as propriedades dos antioxidantes e a capacidade antioxidante em emulsões azeite/água..... 274

V. Conclusões 279

VI. Referências 285

Lista de Figuras

Figura 1 *– Estrutura química de uma molécula triacilglicerol e dos ácidos gordos essenciais. .. 3*

Figura 2 *- Estrutura química das moléculas de EPA e DHA. 4*

Figura 3 – *Imagem microscópia de uma emulsão óleo em água. 7*

Figura 4 *– Processos de desestabilização de emulsões, adaptado de Hu, et al [46]..... 9*

Figura 5 *– Esquema representativo do processo de maturação de Ostwald. 10*

Figura 6 *- Nanoemulsões podem variar nas características das partículas, como tamanho, composição e carga, adaptado de Jafari et al [41]. 11*

Figura 7 *– Estrutura do DHA com os hidrogénios bis- alílicos representados a vermelho e com hidrogénios alílicos a azul. Não se representaram os outros hidrogénios na mólecula. 16*

Figura 8 *- Decomposição dos hidroperóxidos em compostos secundários voláteis. 18*

Figura 9 *- Estabilização do radical fenóxilo por deslocalização eletrónica (R= grupo alquilo) [114]. 26*

Figura 10 *– Mecanismo de atuação dos antioxidantes catecólicos. 27*

Figura 11 *– Mecanismos de reação de fenóis com radicais, por transferência de átomo de hidrogénio (HAT) e por transferência sequencial de perda de protão e transferência de eletrão (SPLET). 28*

Figura 12 *– Reações de redução de iões metálicos na presença de antioxidantes catecólicos. 29*

Figura 13 *– Esquema ilustrativo do mecanismo pelo qual os catecóis são destruídos na presença de iões férricos e/ou ferrosos e oxigénio atmosférico. 30*

Figura 14 *– Estrutura do ácido cítrico. 30*

Figura 15 *- Representação de exemplos de estrutura dos complexos citrato- ferro existentes em solução aquosa [133], as H_2O de coordenação não foram representadas para simplificação. . 31*

Figura 16 *- Estrutura química dos derivados do ácido cinâmico [150]. 32*

Figura 17 *- Síntese de monomalonatos. 33*

Figura 18 *- Síntese de derivados do ácido cinâmico, a partir de monomalonatos. 34*

Figura 19 *- Mecanismo de síntese da formação de cinamatos através da condensação de Knoevenagel modificada por Verley-Doebner. 35*

Figura 20 *- Estrutura química do ácido clorogénico. 36*

Figura 21 *- Síntese dos ésteres derivados do ácido clorogénico. 36*

Figura 22 *– Estrutura do diidrocafeico. 36*

Figura 23 *– Síntese dos ésteres do ácido diidrocafeico. 37*

Figura 24 *- Estrutura do Hidroxitirosol. 39*

Figura 25 *- Síntese dos ésteres derivados de hidroxitirosol de cadeia alquílica curta (C1-C8) a partir de hidroxitirosol e o ácido gordo. 40*

Figura 26 *- Síntese dos ésteres de hidroxitirosol de cadeia alquílica longa a partir de hidroxitirosol e de um éster metílico. 40*

Figura 27 *– Desenvolvimento de rancidez dos lipídios durante o armazenamento. O tempo de armazenamento é dado em valores arbitrários. IP = índice de peróxidos; PI = período de indução. 41*

Figura 28 *- Reação do DPPH$^{\bullet}$ com o antioxidante. 43*

Figura 29 *– Efeito e localização de antioxidantes polares e apolares em emulsões de óleo em água e em óleo. Adaptado de: Laguerre, et al [199]. 47*

Figura 30 *- Representação esquemática da partição de um antioxidante (AO) numa mistura binária (esquerda) e num sistema multifásico (direita). 49*

Figura 31 *- Obtenção dos iões arenodiazónio. 50*

Figura 32 *– Mecanismo de reação de adição nucleófila a iões $ArN_2^{+,}$ levando á formação de aductos Ar – N ═N – Nu na conformação (Z) que se encontra e equilíbrio com o isómero (E). 50*

Figura 33 *– Mecanismo DN + AN, para a decomposição de sais arenodiazónios em meio aquoso. 51*

Figura 34 *– Mecanismo de reação entre o 3MBD e o hidroxitirosol (HT), adaptado de Dudzik et al [227]. 52*

Figura 35 *- Esquema básico das duas pseudofases que compõem um sistema micelar D_n=[Emulsionante total]-CMC, representa a concentração de emulsionante micelizado, S é a substância. 53*

Figura 36 *- Representação básica das três regiões de uma emulsão que contém um substrato AO cuja distribuição vem definida pelas constantes de partição* **POI e PAI**. *..... 55*

Figura 37 *- Representação esquemática de uma emulsão: Φ indica a fração de volume para cada uma das regiões, AO é o antioxidante, P é a constante de partição, k_I é a constante de velocidade para a reação dos iões 16-ArN_2^+ na interface e os índices O, I e A referem-se às regiões orgânica, interfacial e aquosa, respetivamente. 56*

Figura 38 *- Representação esquemática da região interfacial de uma emulsão com base no modelo cinético da pseudofase que mostra a partição do antioxidante, AO, entre as regiões interfacial e oleosa. 60*

Figura 39 *- Representação esquemática da região interfacial de uma emulsão com base no modelo cinético da pseudofase que mostra a partição do antioxidante, AO, entre as regiões interfacial e aquosa. 62*

Figura 40 *- Síntese de monomalonatos. 75*

Figura 41 *- Estrutura numerada dos monomalonatos. 75*

Figura 42 *- Síntese dos cinamatos. 78*

Figura 43 *- Estrutura numerada dos cinamatos de cadeia alquilo longa. 78*

Figura 44 *- Síntese de ésteres do hidroxitirosol e do tirosol de cadeia curta / intermédia. 83*

Figura 45 *- Síntese dos ésteres do hidroxitirosol e do tirosol de cadeia longa. 84*

Figura 46 *- Estrutura numerada dos ésteres do hidroxitirosol e tirosol. 84*

Figura 47 *- Síntese dos ésteres derivados do ácido clorogénico. 88*

Figura 48 *- Estrutura numerada dos ésteres clorogenatos. 89*

Figura 49 *- Síntese de derivados diidrocafeiatos. 92*

Figura 50 *– Estrutura numerada dos ésteres diidrocafeiatos. 93*

Figura 51 *– Reação de transesterificação [254]. 96*

Figura 52 *– Princípio do funcionamento do Turbiscan. 100*

Figura 53 *- Procedimento experimental seguido para a obtenção de* $\boldsymbol{PAO}$*. 102*

Figura 54 *- Síntese do sal de arenodiazónio. 103*

Figura 55 *- Especto do corante azoico formado entre a reação 16ArN_2^+ e o NED em meio emulsionado. 104*

Figura 56 *- Procedimento experimental seguido para a determinação do k_{obs}. 105*

Figura 57 *– Estrutura do Tween 80 e do Tween 20. ..... 117*

Figura 58 *- Intensidade relativa em função do tamanho médio de gota, para emulsões 1:9 (verde) e emulsões 4:6 (vermelho), óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80. ..... 118*

Figura 59 *– Valores potencial Zeta* ***(mV)*** *em função da fração de emulsionante, para emulsões 1:9 óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80. ..... 119*

Figura 60 *– (A) Intensidade relativa em função do tamanho médio de gota para os 3 ciclos; (B) Variação do tamanho médio de gota em função do número de ciclos para três frações de emulsionante Tween 80. ..... 120*

Figura 61 *– (A) Tamanho médio da gota em função da fração de emulsionante, (B) valores da polidispersão (PDI) em função da fração de emulsionante, Φ_I, para nanoemulsões 1:9 óleo de peixe tampão citrato 0,04M, pH=3,65/ Tween 80. . ..... 121*

Figura 62 *– Valores potencial Zeta* ***(mV)*** *em função da fração de emulsionante, para nanoemulsões 1:9 óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80. ..... 122*

Figura 63 *– Imagens de Cryo-SEM de nanoemulsões 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato), Φ_I =0,005 , Φ_I =0,01, e Φ_I =0,02. ..... 122*

Figura 64 *– Variação do tamanho médio de gota (A) e do índice de polidispersão (B) das nanoemulsões 1:9 óleo de peixe/tampão citrato, estabilizadas com diferentes frações de emulsionante Tween 80. ..... 123*

Figura 65 *– Índice de estabilidade (TSI) em função do tempo, para várias frações de emulsionante, T=30ºC. 124*

Figura 66 *– Perfis da luz retrodifundida ou refletida (∆BS) em função da altura da amostra (mm), para duas frações de emulsionante, Φ_l=0,0047 (A) e Φ_l=0,0378 (B)..... 125*

Figura 67 *- Estrutura química do ácido gálico e derivados. 129*

Figura 68 *- (A) Variação da absorvância do radical DPPH• (λ=515 nm) na presença de diferentes concentrações de galato de butilo -●- 0,051 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,068 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,085 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,10 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,12 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,14 mol de AO/mol DPPH•, T=25ºC. (B) Representação da variação da percentagem de DPPH• com a concentração de galato de butilo, expressa em mol AO/mol DPPH•, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear, -●- 5 minutos, -●- 15 minutos, -●- 30 minutos, -●- 60 minutos. 130*

Figura 69 *-Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln $[A_t-A_\infty]$ vs tempo para o GA e para o MG. (Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), Φ_l = 0,005, $[16\text{-}ArN_2^+]$ = $2,86x10^{-4}$ M, [AO] = $2,98x10^{-3}$ M, [NED] = 0,019 M, T = 25,7 ºC. 135*

Figura 70 *- Representação de k_{obs} e $1/k_{obs}$ vs fração de emulsionante (Φ_l) com os respetivos ajustes às equações 48 e 49, para o AG e MG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), $[16\text{-}ArN_2^+]$ = $2,86x10^{-4}$ M, [AO] = $2,98x10^{-3}$ M, [NED] = 0,019 M, T = 25,7 ºC. 135*

Figura 71 *- Variação da percentagem de AG e MG na região aquosa (FA) e na região interfacial (IF) da emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M , pH=3,65), em função da fração de emulsionante Tween 80. ..... 137*

Figura 72 *– Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln $[A_t-A_{inf}]$ vs tempo para o EG E O PG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), Φ = 0,005, $[16\text{-}ArN_2^+]$ = $2,82x10^{-4}$ M, [AO] = $3,05x10^{-3}$ M, [NED] = 0,019 M, T = 25,8 ºC. 138*

Figura 73 *- Representação de k_{obs} e $1/k_{obs}$ vs fração de emulsionante (Φ_l) com os respetivos ajustes às equações 31 e 32, para o PG e para o BG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), $[16\text{-}ArN_2^+]$ = $2,82x10^{-4}$ M, [AO] = $3,05x10^{-3}$ M, [NED] = 0,019 M, T = 25,0 ºC. 139*

Figura 74 *– Variação da percentagem do galato de etilo e galato de butilo na região interfacial (A), na região oleosa (B) e na região aquosa (C) da emulsão 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M pH=3,65, em função da fração de emulsionante Tween 80. ..... 141*

Figura 75 *- Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln $[A_t-A_{inf}]$ vs tempo para o OG e o LG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), Φ = 0,015, $[16\text{-}ArN_2^+]$ = $2,84x10^{-4}$ M, [AO] = $3,07x10^{-3}$ M, [NED] = 0,019 M, T = 25,3 ºC. 142*

Figura 76 *- Representação de k_{obs} e $1/k_{obs}$ vs fração de emulsionante (Φ_l) com os respetivos ajustes às equações 41 e 42 para o OG e para o LG. Condições experimentais: emulsão 4:6*

(óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), [16-ArN$_2^+$] = 2,84x10^{-4} M, [AO] = 3,05x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25,0ºC..... 143

***Figura 77** - Variação da percentagem de OG e LG na região oleosa (FO) e na região interfacial (IF) da emulsão 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M pH=3,65, em função da fração de emulsionante Tween 80. ..... 144*

***Figura 78** - Variação da percentagem do ádigo gálico e seus derivados na região interfacial (A), na região oleosa (B) e na região aquosa (C) da emulsão 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M pH=3,65, em função da fração de emulsionante Tween 80. ..... 146*

***Figura 79** – Variação da percentagem de AO na região interfacial em função número de átomos de carbono da cadeia alquílica. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato), fração de emulsionante Tween 80, Φ_I = 0,005. ..... 148*

***Figura 80** – Variação da concentração efetiva nas 3 regiões da emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato), em função da fração de emulsionante, [AO$_T$] = 0,5 m M..... 150*

***Figura 81** - Concentração efetiva de AO na região interfacial para o AG e seus derivados, emulsão 4:6 O/A em função do número de átomos de carbono, para três frações de emulsionante (A), e o efeito da relação O/A na interfase para a fração de emulsionante Φ_I =0,005 (B), [AO$_T$] = 0,5 mM..... 151*

***Figura 82** - Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln [A_t-A_{inf}] vs tempo, para o EG e para o OG. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65/ Tween 80), Φ_I=0,0097, [16-ArN$_2^+$] = 2,83$\times 10-4M$, [AO] = 2,0$\times 10-3M$, [NED] =0,019 M e T= 25ºC. 154*

***Figura 83** - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 48 e 49 para o AG. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN$_2^+$] =2,82$\times 10-4M$, [AO] =2,0$\times 10-3M$, [NED] =0,019 M e T= 25ºC. 154*

***Figura 84** - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 31 e 32, para EG e BG Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN$_2^+$] =1,42$\times 10-4M$, [AO] =2,0$\times \mathbf{10}-\mathbf{3}M$, [NED] =0,019 M e T= 25ºC..... 155*

***Figura 85** - Representação de k_{obs} e 1/k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 42 para o OG e para o LG. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), [16-ArN$_2^+$] = 2,84x10^{-4} M, [AO] = 3,05x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25,0ºC..... 155*

***Figura 86** - Variação da percentagem do ácido gálico e dos seus derivados na região interfacial (A), na região oleosa (B) e na região aquosa (C), numa nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65), com a fração de emulsionante Tween 80. ..... 157*

***Figura 87** - Variação da concentração efetiva nas 3 regiões da nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato), com a fração de emulsionante Tween 80, [AO$_T$] = 0,125 m M..... 159*

Figura 88 *- Concentração efetiva de AO na região interfacial para o AG e derivados, nanoemulsão 1:9 O/A em função do número de átomos de carbono, para três frações de emulsionante (A), e o efeito da relação O/A na região interfacial para a fração de emulsionante* Φ_I *=0,005 (B),* $[AO_T]$ *= 0,125 M. 160*

Figura 89 *- Distribuição comparativa do ácido gálico e seus derivados em emulsões 1:9 e nanoemulsões 1:9 (v/v óleo de peixe/tampão citrato), para várias frações de emulsionante Tween 80: Nanoemulsões: -●-* Φ_I *=0,005; -▲-* Φ_I *=0,01; -■-* Φ_I *=0,02: Emulsões: -●-* Φ_I *=0,005; -▲-* Φ_I *=0,01; -■-* Φ_I *=0,02. ..... 162*

Figura 90 *– Avaliação do nível de oxidação de emulsões 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, ao longo do tempo monitorizadas, pelo aumento do conteúdo em dienos conjugados (A) e índice de peróxidos (B). 163*

Figura 91 *– Tempo (dias) para que as emulsões contendo 1% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5%. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 /Tween 80),* $[AO_T]$ *= 0,5 mM, T = 40 ºC..... 164*

Figura 92 *– Correlação da percentagem de AO na região interfacial e da eficiência AO, em função do aumento da cadeia alquílica, para uma emulsão 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, contendo 1% de Tween 80..... 165*

Figura 93 *- Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0,5%, 1% e 2% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5%. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes; letras coloridas – compostos diferentes, percentagem de Tween 80 igual; letras pretas – compostos iguais, percentagem de Tween 80 diferente). Condições experimentais: emulsões 4:6 (Óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 /Tween 80),* $[AO_T]$ *= 0,5 mM, T = 40 ºC. 166*

Figura 94 *- Variação do tempo em dias para alcançar 0.5% dienos conjugados e concentração efetiva de AO na região interfacial de emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato) em função do número de átomos de carbono, para as frações de emulsionante de Tween 80: -●-* Φ_I *=0,005; -■-* Φ_I *=0,005; -●-* Φ_I *=0,01, -■-* Φ_I *=0,01 e -●-* Φ_I *=0,02; -■-* Φ_I *=0,02,* $[AO_T]$ *= 0,5 mM..... 166*

Figura 95 *– Efeito do AG e dos galatos na oxidação das nanoemulsões 1:9 óleo de peixe/tampão citrato, a T = 40ºC, para a fração de emulsionante 0,005 monitorizada pelo aumento da percentagem em dienos conjugados. 168*

Figura 96 *- Tempo (dias) para que as nanoemulsões contendo 0,5%, 1% e 2% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes: ; letras coloridas – compostos diferentes, percentagem de Tween 80 igual; letras pretas – compostos iguais, percentagem de*

Tween 80 diferente). Condições experimentais: nanoemulsões 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,65/ Tween 80) e [AO_T] = 0,125 mM..... 168

***Figura 97** - Variação do tempo em dias para alcançar 0.5% dienos conjugados e concentração efetiva de AO na região interfacial de nanoemulsões 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato) em função do número de átomos de carbono, para as frações de emulsionante de Tween 80 : -●- Φ_I =0,005; -■- Φ_I =0,005; -●- Φ_I =0,01, -■- Φ_I =0,01 e -●- Φ_I =0,02; -■- Φ_I =0,02, [AO_T] = 0,125 mM. 169*

***Figura 98** – Tempo em dias para os brancos de vários sistemas emulsionados, atingirem um valor em dienos conjugados de 0.5%, [AO_T] = 0,125mM..... 171*

***Figura 99** – Aumento relativo da estabilidade para o ácido gálico e seus derivados nos diferentes sistemas emulsionados, emulsão 1:9 e 4:6 e nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65 / Tween 80), [AO_T] = 0,125 mM..... 173*

***Figura 100** – Variação da percentagem de inibição e da concentração efetiva na região interfacial dos diferentes sistemas emulsionados (emulsão 4:6 e 1:9 e nanoemulsão 1:9 de óleo de peixe/tampão citrato) em função do aumento da cadeia alquílica, para a fração de emulsionante de Φ_I =0,005: -●-; -■- nanoemulsão 1:9 ; -●-, -■- emulsão 1:9 e -●- -■- emulsão 4:6 de óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M / pH=3.65, [AO_T] = 0,125 mM. 174*

***Figura 101** - Síntese de derivados do Hidroxitirosol. 177*

***Figura 102** - Estrutura química do hidroxitirosol e derivados..... 179*

***Figura 103** - (A) Variação da absorvância do radical DPPH• (λ = 515 nm) na presença de diferentes concentrações do propilo de hidroxitirosol - - 0,0470 mol de AO / mol DPPH•, - - 0,0940 mol de AO / mol DPPH•, -■-0,1410 mol de AO / mol DPPH•, -■- 0,1880 mol de AO / mol DPPH•, -▲-0,2350 mol de AO / mol DPPH•, -▲- 0,2820 mol de AO / mol DPPH•, T=25ºC. (B) Representação da variação da percentagem de DPPH• com a concentração do propilo de hidroxitirosol, expressa em mol AO/mol DPPH•, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear. (-●- 5 min, -●- 15 min, -■- 30 min, -■- 60 min)..... 180*

***Figura 104** – Distribuição do HT e derivados num sistema emulsionado..... 183*

***Figura 105** - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 48 e 49 para o HT. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90$\times 10-4M$, [AO] =2,00$\times 10-3M$, [NED] =0,019 M e T= 25ºC. 184*

***Figura 106** - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 31 e 32 para o HT2. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90$\times 10-4M$, [AO] =2,0$\times 10-3M$, [NED] =0,019 M e T= 25ºC..... 184*

***Figura 107** - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 42, para os derivados HT6, HT8, HT12 e HT16. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] = 2,90x10^{-4} M, [AO] = 2,00x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25,0ºC. 185*

Figura 108 *- Variação da percentagem do HT e seus derivados em emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), região interfacial (A), região oleosa (B) e região aquosa (C).* *186*

Figura 109 *– Variação da percentagem de AO na região interfacial em função do número de átomos de carbono da cadeia alquílica, para três frações de emulsionante, Φ_I, numa emulsão 4:6 (óleo de peixe tampão citrato 0,04M, pH=3,65 / Tween 80).* *187*

Figura 110 *– Concentrações efetivas na região oleosa, aquosa e interfacial das emulsões 4:6 óleo de peixe/tampão citrato (0,04M, pH= 3,35)/ Tween 80, em função da fração de emulsionante, $[AO_T]$ = 0,5 mM.* *189*

Figura 111 *- (A)- Efeito da hidrofobicidade do AO na concentração do AO na região interfacial para o HT e seus derivados, numa emulsão 4:6 O/A (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65/ Tween 80) com três frações de emulsionante diferentes. (B) Efeito da relação O/A na concentração do HT e derivados na região interfacial, para a fração de emulsionante Φ_I =0,005, $[AO_T]$ = 0,5 mM.* *190*

Figura 112 *- Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 48 e 49 para o HT. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90$\times 10-4M$, [AO] = 2,0$\times 10-3M$, [NED] =0,019 M e T= 25ºC.* *192*

Figura 113 *– Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 31 e 32 para o HT2. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65)/Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90$\times 10-4M$, [AO] = 2,0$\times 10-3M$, [NED] =0,019 M e T= 25ºC.* *192*

Figura 114 *- Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes à equação 42, para o HT6,HT8,HT12 e HT16. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90$\times 10-4M$, [AO] = 2,0$\times 10-3M$, [NED] =0,019 M e T= 25ºC.* *193*

Figura 115 *- Variação da percentagem do HT e dos seus derivados: (A) na região interfacial, (B), na região oleosa, (C) e na região aquosa de uma nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65), com a fração de emulsionante Tween 80.* *195*

Figura 116 *- Variação da percentagem de AO na região interfacial em função do número de átomos de carbono, para a fração de emulsionante Φ_I =0,005, Φ_I =0,01 e Φ_I =0,04 numa emulsão 4:6 (óleo de peixe tampão citrato 0,04M, pH=3,65 / Tween 80).* *196*

Figura 117 *- Variação da concentração efetiva nas 3 regiões da nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04M, pH=3,65), com a fração de emulsionante Tween 80, $[AO_T]$ = 0,125 m M.* *197*

Figura 118 *– (A)- Efeito da hidrofobicidade do AO na concentração do AO na região interfacial para o HT e derivados, numa nanoemulsão 1:9 O/A (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65/ Tween 80) com três frações de emulsionante diferentes. (B) Efeito da relação O/A na*

concentração do HT e derivados na região interfacial, para a fração de emulsionante Φ_I =0,005, [AO_T] = 0,125 mM. 198

***Figura 119** - Distribuição comparativa do hidroxitirosol e derivados em emulsões e nanoemulsões. Variação das frações de emulsionante (Φ_I = 0,005, 0,01 e 0,02). Condições nanoemulsões e emulsões 1:9 óleo de peixe/tampão citrato , 0,04M, pH=3,65. ..... 200*

***Figura 120** - Tempo (dias) para que as emulsões contendo 1% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: emulsões 4:6 (óleo de peixe/Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,65/ Tween 80), [AO_T] = 0,5 mM..... 201*

***Figura 121** – Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0.5 %, 1% e 2% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes; letras coloridas – compostos diferentes, percentagem de Tween 80 igual; letras pretas – compostos iguais, percentagem de Tween 80 diferente). Condições experimentais: emulsões 4:6 (óleo de peixe/Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,65/ Tween 80), [AO_T] = 0,5 mM..... 202*

***Figura 122** – Variação da eficácia antioxidante e da percentagem de AO na região interfacial (A) e da eficácia antioxidante e da concentração efetiva na região interfacial (B) em função do aumento de átomos de carbono da cadeia alquílica, numa emulsão 4:6 de óleo de peixe/tampão citrato,0,04M / pH=3.65, para a frações de emulsionante de Φ_I=0,005 (azul), Φ_I=0,01 (vermelho) e Φ_I=0,02 (verde). 203*

***Figura 123** – Efeito do HT e dos seus ésteres na oxidação das nanoemulsões 1:9 óleo de peixe/tampão citrato,0,04M, pH=3,65, a T = 40ºC para a fração de emulsionante de 0,5% Tween 80, monitorizada pelo aumento da percentagem em dienos conjugados. 204*

***Figura 124** - Tempo (dias) para que as nanoemulsões contendo 0.5 %, 1% e 2% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados, (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes; letras coloridas – compostos diferentes, percentagem de Tween 80 igual; letras pretas – compostos iguais, percentagem de Tween 80 diferente). Condições experimentais: nanoemulsões 1:9 (óleo de peixe/Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,65/ Tween 80), [AO_T] = 0,125 mM..... 205*

***Figura 125** - Variação da percentagem de AO na região interfacial (A) e da eficácia antioxidante e da concentração efetiva na região interfacial (B) em função do aumento da cadeia alquílica, numa nanoemulsão 1:9 de óleo de peixe/tampão citrato,0,04M / pH=3,65, para a frações de emulsionante de Φ_I=0,005 (azul), Φ_I=0,01 (vermelho) e Φ_I=0,02 (verde), [AO_T] = 0,125 mM. 206*

***Figura 126 -** Síntese dos ésteres do ácido clorogénico. 209*

Figura 127 - *Representação da variação da percentagem de DPPH• com a concentração de antioxidante (ex: clorogenato de metilo), expressa em mol AO/ mol DPPH•, para os diferentes tempos de reação, com o correspondente ajuste linear. (-●- 5 min, -●- 15 min, -■- 30 min, -■- 60 min)..... 210*

Figura 128 *- Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln [A_t-A_{inf}] vs tempo. (Condições experimentais: emulsão 1:9 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), Φ_I = 0,03845 para o CGA e CGA8 e Φ_I = 0,010651, [16-ArN_2^+] = 3,54x10^{-4} M, [AO] = 4,0x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25 ºC. 214*

Figura 129 *- Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 48 e 49. Condições experimentais: emulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =3,54$\times 10-4M$, [CGA] =4,00$\times 10-3M$, [NED] =0,019 M e T= 25ºC. 215*

Figura 130 *- Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes à equações 31 e 32. Condições experimentais: emulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90$\times 10-4$M, [CGA2] = 4,0x10^{-3} M, [CGA4] = 2,0x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25 ºC. 216*

Figura 131 *- Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 41 e 42, para o CGA8, CGA12 e CGA16. Condições experimentais: emulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] = 2,90x10^{-4} M, [NED] = 0,019 M, [CGA6-CGA8] = 4,0x10^{-3}, [CGA_C16] = 3,0x10^{-3} M T = 25,0ºC. 216*

Figura 132 *- Variação da percentagem do ácido clorogénico e seus derivados na região interfacial (A), na região oleosa (B) e na região aquosa (C), da emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) , em função da fração de emulsionante Tween 80. ..... 218*

Figura 133 *- Variação da percentagem de AO na região interfacial de emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65 / Tween 80) em função do tamanho da cadeia alquílica dos compostos, para a fração de emulsionante de Φ_I = 0,005 (azul), Φ_I = 0,01 (vermelho) e Φ_I = 0,02 (verde). 219*

Figura 134 *- Variação da concentração efetiva nas 3 regiões da emulsão 4:6 ((v/v, óleo de peixe/tampão citrato), com a fração de emulsionante, [AO_T]= 0,5 m M..... 220*

Figura 135 *– (A) Variação da concentração efetiva na região interfacial de emulsões 4:6 O/A, em função da cadeia alquílica dos compostos, para 3 frações de emulsionante, (B) Variação da concentração efetiva para diferentes razões O/A em função do número de átomos de carbono da cadeia alquílica, para uma fração de emulsionante de Φ_I =0,005, [AO_T]= 0,5 m M. 222*

Figura 136 *- Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln [A_t-A_{inf}] vs tempo, para CGA2 e CGA8 Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65/ Tween 80), Φ_I=0,00799 CGA2 e Φ_I=0,0300 CGA8, [16-ArN_2^+] = 2,90$\times 10-4M$, [AO] = 2,0$\times 10-3M$, [NED] =0,019 M e T= 25ºC..... 223*

Figura 137 *- Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 48 e 49 para o CGA. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90× $10-4M$, [AO] = 4,0× $10-3M$, [NED] =0,019 M e T= 25ºC. 224*

Figura 138 *- Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 31 e 32 para os derivados do CGA2 e CGA4. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90× $10-4M$, [AO] = 2,0× $10-3M$, [NED] =0,019 M e T= 25ºC. 224*

Figura 139 *- Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 41 e 42, para o CGA8,CGA12 e CGA16. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90× $10-4M$, [AO] = 2,0× $10-3M$, [NED] =0,019 M e T= 25ºC. 225*

Figura 140 *- Variação da percentagem do ácido clorogénico e seus derivados numa nanoemulsão 1:9 óleo de peixe/tampão citrato, (A) na região interfacial, (B) na região oleosa e (C) na região aquosa..... 227*

Figura 141 *- Variação da percentagem de AO na região interfacial com o número de átomos de carbono. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato), fração de emulsionante, Φ_I = 0,005, Φ_I = 0,01 e Φ_I = 0,02. ..... 228*

Figura 142 *- Variação da concentração efetiva nas 3 regiões da nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato), com a fração de emulsionante, [AO_T] = 0,125 mM..... 229*

Figura 143 *- Variação da concentração efetiva de AO na região interfacial com o número de átomos de carbono. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato), para as frações de emulsionante de Φ_I = 0,005, Φ_I = 0,01 e Φ_I = 0,02, [AO_T] = 0,125 mM..... 230*

Figura 144 *– Comparação da distribuição em emulsões 1:9 O/A e nanoemulsões 1:9 O/A, para três frações de emulsionante Tween 80, em função do número de átomos de carbono da cadeia alquílica. 231*

Figura 145 *- Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0.5 %, 1% e 2% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: emulsões 4:6 (óleo de peixe/Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,65/ Tween 80), [AO_T] = 0,5mM. 232*

Figura 146 *– Variação do tempo necessário para alcançar 0.5% do conteúdo em dienos conjugados, a percentagem de AO na região interfacial e a concentração efetiva de AO na região interfacial com o número de átomos de carbono, para 3 percentagens de emulsionante (-●- Φ_I =0,005: -●- Φ_I =0,01; -●- Φ_I =0,02), em emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65 / Tween 80), [AO_T] = 0,5mM..... 234*

Figura 147 *- Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0.5 %, 1% e 2% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras*

de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: nanoemulsões 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,65/ Tween 80), [AO_T] = 0,125 mM. *235*

Figura 148 *- Variação do tempo necessário para alcançar 0.5% do conteúdo em dienos conjugados, a percentagem de AO na interface e a concentração efetiva de AO na interface com o número de átomos de carbono, para 3 percentagens de emulsionante (-●- Φ_I =0,005: -●- Φ_I =0,01; -●- Φ_I =0,02), [AO_T] = 0,125 mM.* *236*

Figura 149 *- Síntese dos monomalonatos.* *241*

Figura 150 *- Síntese de cafeiatos de cadeia longa.* *242*

Figura 151 *– Estrutura do ácido cafeico e seus derivados.* *244*

Figura 152 *- Representação da variação da percentagem de DPPH• com a concentração de antioxidante (ex. cafeiato de propilo), expressa em mol AO/ mol DPPH, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear. (-●- 5 min, -■- 15 min, -▲-30 min, - ■- 60 min), T=25ºC.* *244*

Figura 153 *- Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln [A_t-A_∞] vs tempo, para o AC. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65/ Tween 80), 2 Φ_I=0,03828, [16-ArN_2^+] = 3,54$\times 10-4M$, [AO] = 4,0$\times 10-3M$, [NED] =0,019 M e T= 25ºC.* *249*

Figura 154 *- Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 48 e 49 para o AC. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =3,54$\times 10-4M$, [AO] =4,00$\times 10-3M$, [NED] =0,019 M e T= 25ºC.* *250*

Figura 155 *- Representação de k_{obs} e 1/k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 31 e 32 para o AC2. Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), [16-ArN_2^+] = 3,54x10^{-4} M, [AO] = 4,0x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25 ºC.* *250*

Figura 156 *- Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (ΦI) com os respetivos ajustes às equações 41 e 42, para os derivados do ácido cafeico AC6, AC8, AC12 e AC16. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN2+] = 2,90x10-4 M, [NED] = 0,019 M, [AC6-AC8] = 4,0x10-3, [AC16] = 3,0x10-3 M T = 25,0ºC*..... *251*

Figura 157 *- Variação da percentagem do ácido cafeico e seus ésteres na região interfacial (A), na região oleosa (B) e na região aquosa (C) numa emulsão 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65, em função da fração de emulsionante Tween 80.* *252*

Figura 158 *- Tempo (dias) para que as emulsões 4:6 contendo 1% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e*

letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,65/ Tween 80), [AO_T] = 0,5 mM. 254

Figura 159 - *Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0,5%, 1% e 2% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5%. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes; letras coloridas – compostos diferentes, percentagem de Tween 80 igual; letras pretas – compostos iguais, percentagem de Tween 80 diferente). Condições experimentais: emulsões 4:6 (Óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 /Tween 80), [AO_T] = 1,25 mM, T = 40 ºC. 255*

Figura 160 *- Correlação da distribuição e da eficácia antioxidante com a hidrofobicidade dos AOs para Φ_I=0,005 -●-..... 256*

Figura 161 *– Variação da concentração efetiva de antioxidante na região interfacial (A), na região oleosa (B) e na região aquosa (C), com a fração de emulsionante. Condições experimentais: emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 /Tween 80), [AO_T] = 0,5 mM.. 258*

Figura 162 *– Efeito da hidrofobicidade dos AO sobre a concentração de AO na região interfacial para o ácido cafeico e seus derivados paras as frações de emulsionante de Φ_I=0,005, 0,01 e 0,02, [AO_T] = 0,5 mM..... 259*

Figura 163 *– Tempo necessário para alcançar o conteúdo em dienos conjugados de 0,5%, percentagem de AO na região interfacial, e concentração efetiva de AO na região interfacial, com o número de átomos de carbono, para as frações de emulsionante de Φ_I=0,005 -●- -■- ; Φ_I=0,01 -●- -■- e Φ_I=0,02 -●- -■-, [AO_T] = 0,5 mM..... 260*

Figura 164 *– Estrutura química dos polifenóis estudados. 264*

Figura 165 *- Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln [A_t-A_∞] vs tempo. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 20), DH_C8, Φ = 0,004963, [16-ArN_2^+] = 2,90x10^{-4} M, [AO] = 4,0x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25,0ºC..... 267*

Figura 166 *- Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações 41 e 42. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/ tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 20), [16-ArN_2^+] = 2,90x10^{-4} M, [AO_HT] = 3,00x10^{-3} M, [AC] = 3,50x10^{-3} M [DH] = 4,00x10^{-3} M, [4-OH] = 1,50x10^{-3} M [NED] = 0,019 M, T = 25,0ºC..... 268*

Figura 167 *– Concentração dos diferentes AO na região interfacial (A), na região oleosa (B) e região aquosa (C) em função da fração de emulsionante Tween 20, para uma emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato, 0,04M, pH=3,65 / Tween 20)..... 270*

Figura 168 *– Percentagem de AO na região interfacial de emulsões 4:6 (azeite /tampão citrato, 0,04M, pH=6,35 /Tween 20) em função do número de átomos de carbono da cadeia alquílica, para cada família, para a fração de emulsionante, Φ_I=0,005. ..... 271*

Figura 169 *- Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0,5% e 1% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,6%. Os valores representam médias de triplicados (barras*

de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes; letras coloridas – compostos diferentes, percentagem de Tween 20 igual; letras pretas – compostos iguais, percentagem de Tween 20 diferente). Condições experimentais: emulsões 4:6 (azeite/tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 /Tween 20), [AO_T] = 0.24 mM, T = 60 ºC. 272

***Figura 170** – Concentração efetiva de AO na região interfacial de emulsões (azeite / tampão citrato, 0,04M, pH=3,65 / Tween 20) para a fração de emulsionante de Φ_I=0,005 e Φ_I=0,01, [AO_T] = 0,24mM. 273*

***Figura 171** – Aumento relativo da estabilidade prevista e experimental..... 277*

Lista de Tabelas

Tabela 1 *- Diferentes tipos de sistemas dispersos classificados de acordo com o estado físico dos seus constituintes, adaptado de Mollet et al [21]. 6*

Tabela 2 *– Comparação entre microemulsão, nanoemulsão e macroemulsão. 8*

Tabela 3 *- Estrutura química do ácido gálico e dos seus derivados fazendo referência aos galatos autorizados como antioxidantes [167, 168]. 38*

Tabela 4 *– Testes de oxidação acelerada, retirado de [180]. 42*

Tabela 5 *- Antioxidantes a utilizar no presente trabalho. 69*

Tabela 6 *– Composição em ácidos gordos do óleo de peixe e do azeite, dados obtido por cromatografia gasosa. 115*

Tabela 7 *– Características das emulsões e nanoemulsões preparadas com óleo de peixe. d = diâmetro de gota; $V_g = \pi x d3 / 6$, volume de uma gota; $S_g = \pi x d2$, superfície da gota; $N_g = V_{total, óleo} / V_{total}$, número total de gotas, ($V_{total, óleo}$, é o volume total de óleo por 10 g de emulsão); $S_{total} = 6xVt_{total,óleo} / d$, superfície de todas as gotas; $m_{T80, gota} = S_{total} \times \Gamma_\infty$, massa de emulsionante necessária para saturação de 100 g de emulsão (estimada usando uma cobertura interfacial na saturação de $\Gamma_\infty = 2x10^{-6}$ mol m^{-2} [91, 276], $m_{T80, excesso} = m_{T80} - m_{T80, gota}$, excesso (g) de Tween 80 que podem permanecer na fase aquosa. 126*

Tabela 8 *- Valores de EC_{50} obtidos para diferentes tempos de reação para o ácido gálico e seus derivados. 130*

Tabela 9 *- Valores do primeiro potencial anódico, determinados por voltametria cíclica, para o ácido gálico e derivados. 131*

Tabela 10 *– Valores das constantes de partição de uma mistura binária óleo de peixe/água, T=25ºC, para o ácido gálico e seus derivados. 133*

Tabela 11 *- Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da Figura 70 à equação 49. ..... 136*

Tabela 12 *- Valores de P_A^l e k_l obtidos para o AG e MG a partir do ajuste dos dados da Figura 70 à equação 49. ..... 136*

Tabela 13 *- Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados das Figura 73 à equação 32. ..... 139*

Tabela 14 *- Valores de PAI, POI, PAO e k_l, obtidos a partir da determinação espetrofotométrica de PAO e de vários ensaios (k_{obs}, Φ_l), para o EG e BG. 140*

Tabela 15 *- Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados das Figura 76 à equação 42. ..... 143*

Tabela 16 *- Valores de POI e k_l obtidos para o OG e LG a partir do ajuste dos dados da Figura 76 à equação 42. ..... 143*

Tabela 17 *- Sumário dos valores das constantes de partição PAI , POI e k_I, obtidas para o ácido gálico e seus derivados 145*

Tabela 18 *- Sumário dos valores das constantes de partição e da velocidade na região interfacial, para o ácido gálico e seus derivados 156*

Tabela 19 *- Constantes de partição para o ácido gálico e seus derivados numa emulsão e numa nanoemulsão. 162*

Tabela 20 *: Resultados experimentais das massas e rendimentos obtidos nas sínteses dos derivados do hidroxitirosol. 178*

Tabela 21 *– Valores de EC_{50} obtidos para diferentes tempos de reação com um nível de significância de P < 0,05, para o HT e seus derivados. 180*

Tabela 22 *- Valores do primeiro potencial anódico, determinados por voltametria cíclica, para o hidroxitirosol e seus derivados. 181*

Tabela 23 *- Valores das constantes de partição de uma mistura binária óleo de peixe/água, T=25ºC, para o hidroxitirosol e seus derivados. 182*

Tabela 24 *- Valores de $\boldsymbol{POI}$ POI, PAI e $\boldsymbol{kI}$ obtidos para o HT e derivados. 185*

Tabela 25 *- Sumário dos valores das constantes de partição de PAI, POI e k_I obtidas para o hidroxitirosol e seus ésteres. 193*

Tabela 26 *- Constantes de partição para o hidroxitirosol e seus ésteres numa emulsão e numa nanoemulsão. 200*

Tabela 27 - *Resultados experimentais das massas e rendimentos obtidos nas sínteses dos derivados do ácido clorogénico. 209*

Tabela 28 *- Valores de EC_{50} obtidos para diferentes tempos de reação, para o ácido clorogénico e seus derivados. 211*

Tabela 29 *- Valores do primeiro potencial anódico, determinados por voltametria cíclica, para o ácido clorogénico e seus derivados. 212*

Tabela 30 *- Percentagem dos diferentes antioxidantes presentes na fase aquosa e oleosa de uma mistura binária óleo/água e o valor da constante de partição PAO, para o ácido clorogénico e seus derivados. 213*

Tabela 31 *- Sumário dos valores das constantes obtidas para o ácido clorogénico e seus derivados numa mistura binária4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato) e numa emulsão 1:9 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato), para o ácido clorogénico e seus derivados. 217*

Tabela 32 *- Sumário dos valores das constantes de partição POI, PAI e k_I, obtidas para o ácido clorogénico e seus deriavdos. 225*

Tabela 33 *– Valores das constantes de partição POI, PAI e a constante de velocidade na região interfacial kI, em emulsões e nanoemulsões O/A, para o ácido clorogénico e seus derivados. 231*

Tabela 34 *- Resultados experimentais das sínteses dos monomalonatos. 241*

Tabela 35 *- Resultados experimentais das sínteses dos cinamatos..... 243*

Tabela 36 *- Valores de EC_{50} obtidos para diferentes tempos de reação, para o ácido cafeico e seus derivados. 245*

Tabela 37 *– Valores do primeiro potencial anódico, determinados por voltametria cíclica, para o ácido cafeico e seus derivados. 246*

Tabela 38*- Percentagem dos diferentes antioxidantes presentes na fase aquosa e oleosa de uma mistura binária óleo/água e o valor da constante de partição $PA0$, para o ácido cafeico e seus derivados. 248*

Tabela 39 *- Sumário dos valores das constantes de partição obtidas para o ácido cafeico e seus derivados..... 251*

Tabela 40 *– Rendimentos obtidos para os vários fenólipidos. 265*

Tabela 41 *– Resultados do primeiro potencial anódico e o valor de EC_{50} para 5 minutos, para os vários compostos polifenólicos..... 266*

Tabela 42 *– Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da Figura 166 à equação 42..... 268*

Tabela 43 *- Valores de $\boldsymbol{POI}$ e $\boldsymbol{kI}$ obtidos para a emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 20), a partir do ajuste dos dados da Figura 166 à equação 42 e dados retirados de [248, 290]..... 269*

Tabela 44*- Correlação de Pearson, entre as propriedades químicas e a estabilidade das emulsões. 274*

Tabela 45 *- R e valores cumulativos (cum.), parciais (part.) R^2 da análise de regressão linear Stepwise. 275*

Tabela 46 *– Coeficientes dos modelos..... 276*

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Abs- Absorvância

AC- Ácido Cafeico

AG – Ácido gálico

Ar•-radical arilo

AO- Antioxidante

A/O- Emulsão água em óleo

AO_I – Fração de antioxidante na região interfacial

$BF_3.Et_2O$ – Eterato de trifluoreto de boro

BG – Galato de butilo

BHA- Butilhidroxianisol

BHT- 2,6-di-t-butil-4-metoxifenol

BuONO – n-butil nitrito

CD- Dienos Conjugados

CGA - Ácido Clorogénico

CrioSEM - Microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura

DH- Ácido diidrocafeico

DHA – Ácido docosahexaenóico

DLS - Dispersão de luz dinâmica

DPPH•- Radical 2,2'-difenil-1-picrilhidrazilo

ESI-MS- Espectroscopia Ionização de Massa Electrospray

EPA – Ácido eicosapentaenóico

Epa – Primeiro potencial anódico

FAMEs – Ésteres metílicos dos ácidos gordos

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência

HT – Hidroxitirosol

IP- Índice de peróxidos

k_I **–** Constante de velocidade na região interfacial

k_{obs} **–** Constante de velocidade observada

LG – Galato de dodecilo ou galato de laurilo

MCP- Modelo cinético da pseudofase

MCPS- modelo cinético da pseudofase simplificado

MG – Galato de metilo

NED- N-1 (1-Naftil) etilenodiamina

NED.2HCl – Dicloroidatro de N-(Naft-1-til) etilenodiamina

O/A- Emulsão óleo em água

OG – Galato de octilo

$\mathbf{P_A^I}$ -Constante de partição de um antioxidante entre as regiões aquosa e interfacial

$\mathbf{P_O^I}$-Constante de partição de um antioxidante entre as regiões oleosa e interfacial

$\mathbf{P_A^O}$- Constante de partição de um antioxidante entre as regiões aquosa e oleosa

PG – Galato de propilo

PUFA- Ácido gordo monoinsaturado (Monounsaturated Fatty Acid)

T - Luz transmitida

THF – Tetrahidrofurano

TLC- Cromatografia em camada fina

TSI - Índice de estabilidade de Turbiscan

Ty – Tirosol

UV-Vis- Espectrofotometria do Ultravioleta Visível

ZP - Potencial Zeta

^{1}H-RMN- Ressonância Magnética Nuclear de Protão

^{13}C-RMN- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

16ArN_2^+ – catiões hexadecilbenzenodiazonio

4-HO-CIN – Ácido hidroxicinâmico

I. Introdução

1. Gorduras alimentares

Os óleos e gorduras alimentares são constituídos maioritariamente (>95%) por uma mistura de triacilgliceróis, comumente referidos como triglicerídeos, formados pela esterificação do glicerol (1,2,3-tri-hidroxipropano) com três ácidos gordos [1] (iguais ou diferentes) que contém normalmente um número par de átomos de carbono igual ou superior a 14 com um número variável de duplas ligações, como mostra a *Figura 1*. Na mesma *Figura 1* , podemos observar igualmente a estrutura química dos dois ácidos gordos essenciais, ácido linoléico e linolénico. Fazem igualmente parte dos óleos alimentares pequenas quantidades de outros lípidos (<5%) nomeadamente, monoacilgliceróis, ácidos gordos, glicolípidos, fosfolípidos, esteróis, entre outras substâncias.

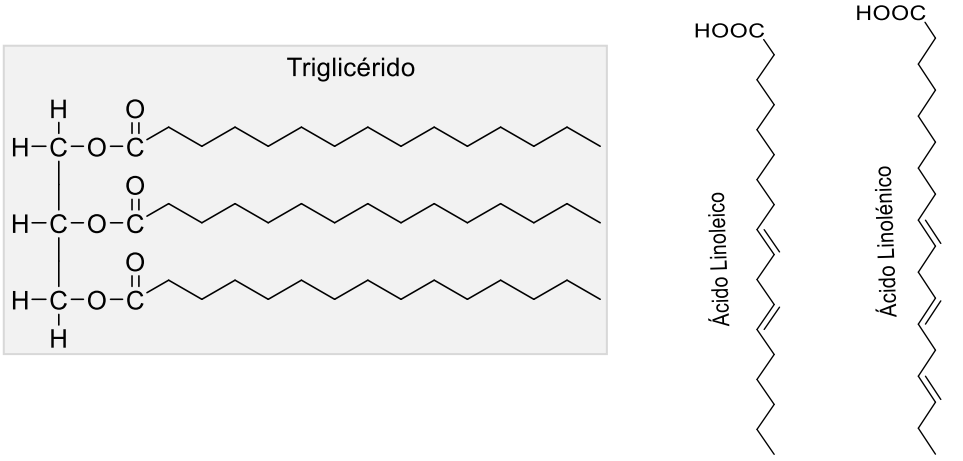


Figura 1 – Estrutura química de uma molécula triacilglicerol e dos ácidos gordos essenciais.

Os lípidos apresentam um papel importante no que diz respeito à qualidade alimentar de certos alimentos e às propriedades organoléticas que os tornam apetecíveis. Além disso, contribuem para o valor nutritivo dos produtos alimentares.[2]

Os ácidos gordos esterificados nos triacilgliceróis encontrados nos óleos e gorduras, podem ser classificados como saturados ou insaturados. Os ácidos gordos insaturados por sua vez podem conter uma (monoinsaturado-MUFA) ou mais insaturações (polinsaturados-PUFA). Os ácidos gordos polinsaturados são normalmente classificados de acordo com o número e a posição das suas duplas ligações. Deste modo podemos classificar os ácidos gordos insaturados em três famílias, os ómega-3, os ómega-6 e os ómega-9, sendo o número da família o número do carbono da cadeia alquílica do ácido gordo onde se localiza a primeira dupla ligação

contando a partir do grupo metilo (numeração contraria à efetuada de acordo com a nomenclatura da IUPAC). Os ómega-3 (ω-3), apresentam a primeira insaturação no terceiro carbono contando a partir do grupo metilo (CH_3)[3]. Assim pertencem a esta família o ácido α-linolénico (ALA, C18:3, ω-3), o ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5, ω-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6, ω-3).

De acordo com a composição em ácidos gordos, as gorduras alimentares poderão ser sólidas ou liquidas (óleos). Normalmente ácidos gordos insaturados fazem baixar o ponto fusão dos triacilgliceróis pelo que os óleos alimentares são normalmente ricos em ácidos gordos polinsaturados.

O interesse em utilizar óleos de peixe em produtos alimentares é principalmente devido ao seu alto conteúdo em ácidos gordos polinsaturados ómega-3 de cadeia longa (PUFAs) [4], em especial o ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6, ω-3) e ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5, ω-3) [5, 6]. Duas características do óleo de peixe tornam-no único em comparação com outros óleos comercialmente disponíveis: o alto teor de PUFAs de cadeia longa do tipo ómega-3, e o grande número e variedade de ácidos gordos presentes nos seus triacilgliceróis.[7]

Dependendo da idade, estação, espécies de peixes e habitat, os óleos de peixe podem conter 100–300 g kg^{-1} de TAGs contendo ácidos gordos polinsaturados ómega-3. Normalmente a aclimatação à baixa temperatura por parte dos peixes e a transferência para a água do mar resultam num aumento nos PUFAs ω-3 [7].

Os ácidos gordos polinsaturados ómega-3 (PUFAs), especialmente o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) (*Figura 2*), são conhecidos como tendo alguns benefícios para a saúde [8].

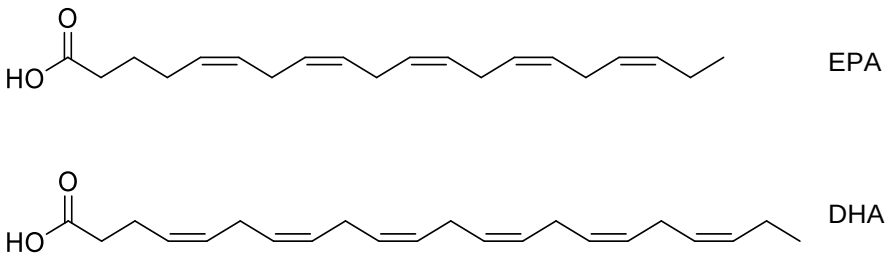


Figura 2 - Estrutura química das moléculas de EPA e DHA.

Os primeiros sinais destes benefícios foram observados, em 1972, quando Bang e Dyerberg descobriram que uma elevada ingestão de lípidos marinhos resultava numa baixa taxa de incidência de doenças cardíacas nos esquimós da Gronelândia. Desde

essa altura, o interesse nos benefícios dos PUFAs ómega-3 tem vindo a ser alvo de investigação [9]. Alguns estudos têm mostrado que o consumo de grandes quantidades de ómega-3 aumenta o tempo de coagulação do sangue, pelo que a uma elevada ingestão em alimentos ricos em ómega-3, diminui consideravelmente o risco de doenças cardiovasculares [10]. Outros estudos têm demonstrado que o consumo de ómega-3 reduz a incidência de arteriosclerose e doença coronariana, tem efeitos benéficos sobre o cérebro [11, 12] e benefícios na saúde fetal [13-16].

Apesar do EPA e do DHA poderem ser sintetizados no organismo humano a partir do ácido linolénico (uma ácido gordo essencial) estes ácidos gordos polinsaturados nalguns casos não são sintetizados em níveis suficientes devido, em parte, ao baixo consumo de alimentos ricos em ácido linolénico, sendo a sua principal fonte externa o peixe e produtos marinhos [17].

Deste modo, em países onde há défice de peixe e de alimentos enriquecidos em ómega-3, a incorporação de óleo de peixe nos alimentos tem vindo a crescer. Contudo, esta incorporação diminui a estabilidade dos alimentos que os contém devido à fácil oxidação do EPA e do DHA, devido ao elevado número de insaturações que possuem [7, 18, 19]. De facto, estes ácidos gordos possuem um elevado número de hidrogénios bis-alílicos que lhes confere particular suscetibilidade à quebra homolítica de ligações C-H com a consequente formação de radicais livres.

2. Sistemas dispersos

Os sistemas dispersos são sistemas formados pelo menos por duas fases, uma fase que se domina por fase dispersa ou fase descontinua, finamente dividida em partículas de dimensões coloidais, rodeada completamente por outra fase que se domina fase dispersante ou fase contínua [20].

Os sistemas dispersos podem classificar-se de um ponto de vista estrutural ou de acordo com o estado físico da matéria que os compõe, sendo este último o critério mais comum [21, 22]. Na *Tabela 1* estão representados alguns exemplos característicos de sistemas dispersos classificados de acordo com o estado físico que os seus componentes apresentam.

As dispersões coloidais estão empregues em várias áreas científicas e industriais com diferentes propósitos, como por exemplo:

- **Indústria Química** (Ex.: Nanomateriais, tintas, adesivos, agentes emulsionantes, lubrificantes, absorventes, produtos derivados do petróleo, etc).

- **Indústria Farmacêutica** (Ex.: Formulações para o transporte de fármacos, cremes e loções, etc).

- **Indústria Alimentar** (Ex.: Leites, manteigas e outros produtos lácteos, margarinas, molhos, bebidas, etc).

Tabela 1 - Diferentes tipos de sistemas dispersos classificados de acordo com o estado físico dos seus constituintes, adaptado de *Mollet et al* [21].

		Fase dispersante		
		Sólida	**Líquida**	**Gasosa**
Fase Dispersa	**Sólida**	Liga	Suspensão	Fumo
	Líquida	Lama	**Emulsões**	Aerossol
	Gasosa	Espuma Sólida	Espuma	Gás

De todos os sistemas dispersos, o presente trabalho centra-se nos sistemas dispersos líquido-líquido, genericamente denominados de emulsões. Estes sistemas são de especial importância para a indústria alimentar, farmacêutica e química, devido às suas potenciais aplicações como sistemas de liberação de compostos bioativos, melhorando a sua biodisponibilidade [23].

2.1. Macroemulsões, nanoemulsões e microemulsões

Uma emulsão ou macroemulsão pode-se definir como um sistema opaco heterogéneo e termodinamicamente instável, composto por dois líquidos imiscíveis (ex.

óleo e água) em que um deles se dispersa no outro formando pequenas gotículas microscópicas de tamanho coloidal entre 100 nm a 100 µm [20, 24], *Figura 3*.

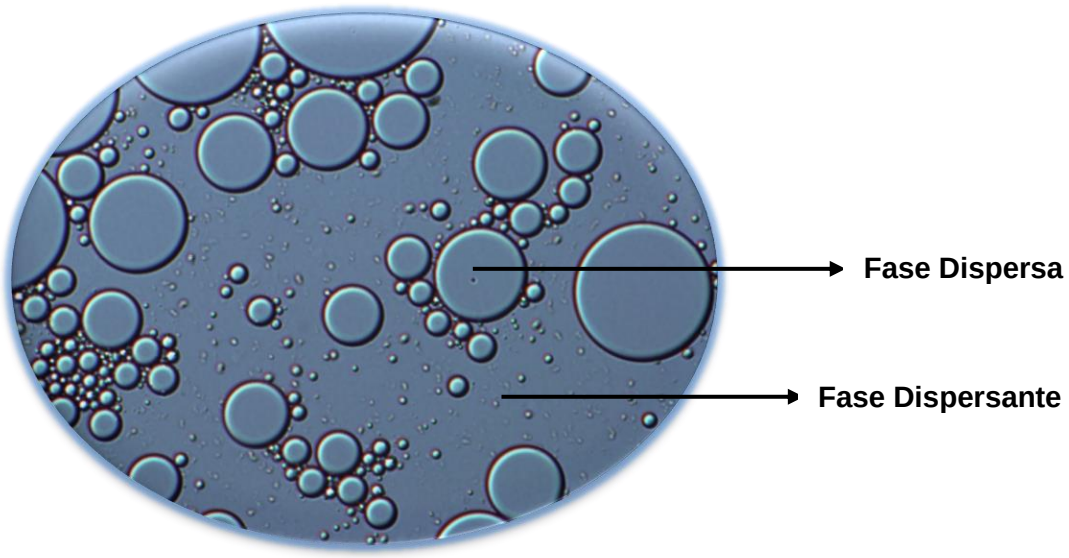


Figura 3 – Imagem microscópia de uma emulsão óleo em água.

Os sistemas emulsionados são normalmente termodinamicamente instáveis devido à imiscibilidade das duas fases (por exemplo água com o óleo), o que leva à separação das fases num curto período de tempo. A instabilidade termodinâmica do sistema emulsionado é consequência da grande quantidade de energia necessária para a sua formação, o que se manifesta numa alta energia livre de Gibss interfacial, o que provoca a coalescência das gotas dando lugar a separação das fases[25].

Já uma microemulsão pode-se definir como um sistema termodinamicamente estável, formado espontaneamente [26-29] por dois líquidos imiscíveis dispersos um no outro, sem a necessidade de fornecer energia contínua para a sua formação e manutenção. As microemulsões possuem gotas mais pequenas que o comprimento de onda da radiação visível e, por conseguinte, estes sistemas são opticamente transparentes. No caso das nanoemulsões, temos normalmente sistemas que, embora não se formem espontaneamente, são cineticamente estáveis após a sua formação e apresentam-se translúcidas [30-32], as principais diferenças entre uma microemulsão, nanoemulsão e macroemulsão encontram-se na *Tabela 2 [*26*,* 33*,* 34*]*.

Tabela 2 – Comparação entre microemulsão, nanoemulsão e macroemulsão.

Propriedades	**Microemulsões**	**Emulsões**	
		Nanoemulsões	**Macroemulsões**
Aspeto	 Transparente	 Translúcido [35]	 Leitosa
Diâmetro da gota	1 – 100 nm	100 – 500 nm [36]	0,25 – 10 μm
Estabilidade	Termodinamicamente estável	Cineticamente estável	Cineticamente estável
Energia de formação	Formada espontaneamente	Formada com auxilio de alta energia	Formada com auxilio de energia
Concentração de emulsionante	Alta	Baixa	Baixa

As emulsões podem ser estabilizadas cineticamente com a adição de tensioativos que são adsorvidos na interface óleo/água, em torno da gotícula de óleo (emulsão óleo em água) ou da água (emulsão água em óleo), reduzindo a tensão interfacial e, portanto, a energia livre de Gibss, permitindo a formação de uma emulsão com menor energia interna, aumentando, portanto, a sua estabilidade [37]

Os principais mecanismos de destabilização [28, 38-44] das emulsões são uma consequência do movimento das gotículas pela ação da gravidade (formação de creme ou sedimentação), que provocam a agregação das gotículas, com ou sem rutura da interface (coalescência e de floculação, respetivamente) ou o crescimento de grandes gotas à custa de gotículas mais pequenas (maturação de Ostwald), *Figura 4*.

Estes mecanismos podem ocorrer em simultâneo e não são independentes uns dos outros [45], sendo o mecanismo predominante dependente da composição da emulsão, o que por sua vez afeta o tamanho das gotículas.

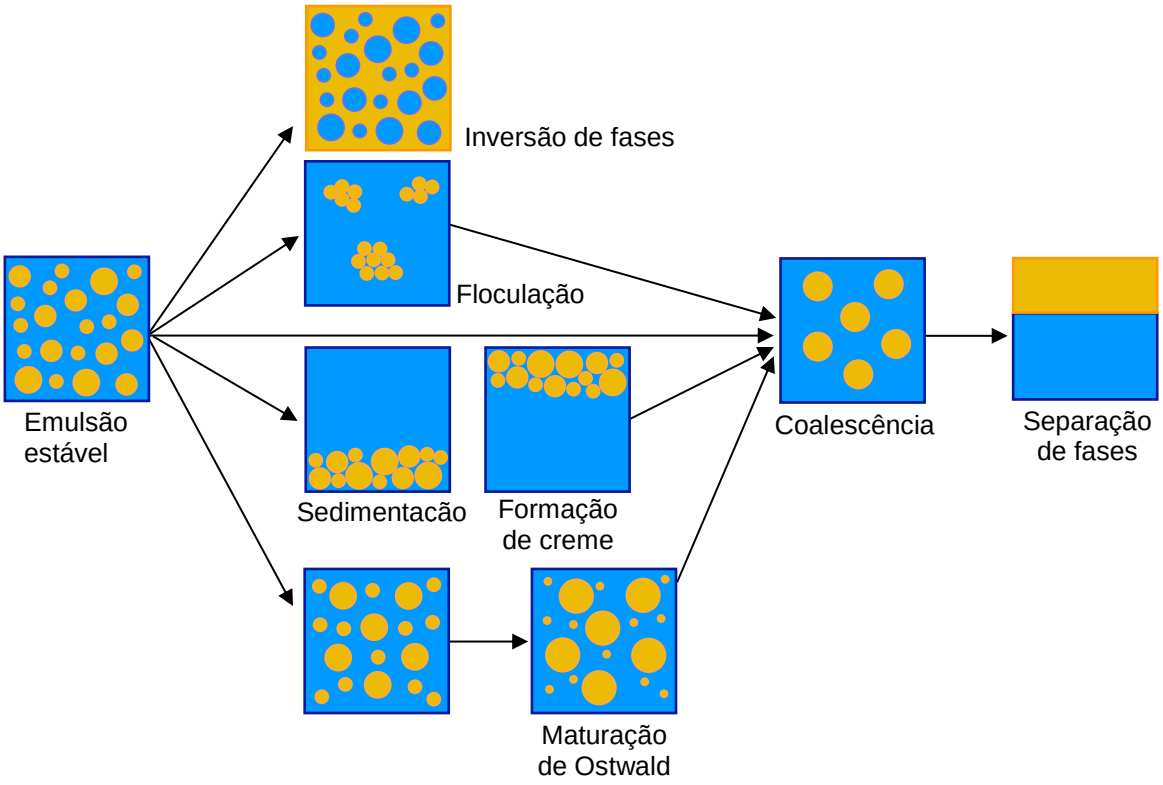


Figura 4 – Processos de desestabilização de emulsões, adaptado de Hu, *et al* [46].

- **Formação de creme ou Sedimentação**

Numa emulsão óleo em água a formação de creme é causada pelo movimento das gotas da fase dispersa (óleo) sob ação da gravidade, para formar uma camada concentrada de gotas na parte superior da emulsão. Este fenómeno não implica alterações na distribuição dos tamanhos das gotas. O mesmo, numa emulsão água em óleo, é denominado sedimentação. Portanto a formação de creme surge, nos casos mais simples, por ação da gravidade sobre as gotas com menor densidade que a fase contínua e é reversível no sentido que se pode restabelecer a distribuição original das gotas na emulsão por agitação.

- **Floculação**

A floculação é um processo de desestabilização de uma emulsão, relacionado com a formação de agregados de gotículas. Este fenómeno é influenciado pelas alterações da superfície das gotículas. É um processo teoricamente reversível por agitação.

- **Coalescência** [47]

Pode-se definir a coalescência como um processo, na qual duas ou mais gotas da emulsão se fundem formando uma única gota de maior tamanho. Este processo envolve a rotura do filme interfacial. Ocorre quando a tensão interfacial diminui na superfície de separação de fases, provocando agregação das partículas. Uma nova agitação é incapaz de voltar a dispersar as fases uma na outra, o que só é possível se se adicionar à mistura mais agente emulsionante. O ritmo de coalescência depende principalmente das caraterísticas físicas da película formada pelo emulsionante. Para evitar este processo é necessário construir uma capa interfacial mais rígida através da utilização de emulsionantes.

- **Maturação de Ostwald (Ostwald ripening)** [48]

A maturação de Ostwald é o fenómeno em que gotículas mais pequenas dissolvem-se na região aquosa depositando-se depois nas gotículas maiores, fundindo-se com estas, de modo a atingir um estado termodinamicamente mais estável. A maturação de Ostwald ocorre porque as moléculas à superfície das gotículas são energeticamente mais instáveis do que as que estão no seu interior (*Figura 5*) [41].

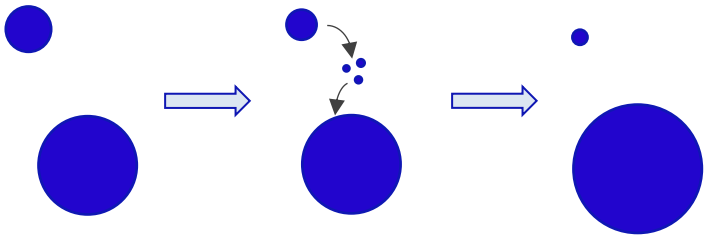


Figura 5 – Esquema representativo do processo de maturação de Ostwald.

Quando a solução é supersaturada as moléculas livres depositam-se nas gotículas de maior tamanho . Assim, pequenas gotículas diminuem de tamanho até que desaparecem e as grandes crescem ainda mais. Este efeito resulta num aumento do

diâmetro médio das gotículas da emulsão com o tempo. A maturação de Ostwald é frequentemente encontrada em emulsões de óleo em água, nas quais as moléculas de óleo se difundem através da fase aquosa e se juntam a gotículas de óleo maiores, causando a instabilidade da emulsão e, eventualmente, separação de fases. Este fenómeno é pouco comum em emulsões de óleos alimentares em água, devido à elevada insolubilidade dos triacilgliceróis na água.

2.2. Estabilidade física dos sistemas emulsionados

Os sistemas emulsionados necessitam de energia para sua formação. Neste sentido podem ser aplicados métodos de baixa energia ou de alta energia de emulsificação, que utiliza energia mecânica, para a formação de uma emulsão / nanoemulsão. Neste trabalho utilizou-se a homogeneização sob alta pressão para a obtenção dos sistemas emulsionados.

As propriedades físico-químicas de uma emulsão ou de uma nanoemulsão são amplamente determinadas pelas propriedades das partículas, como composição, tamanho, carga elétrica, estado de agregação, estado físico e composição interfacial (*Figura 6*) [41, 49].

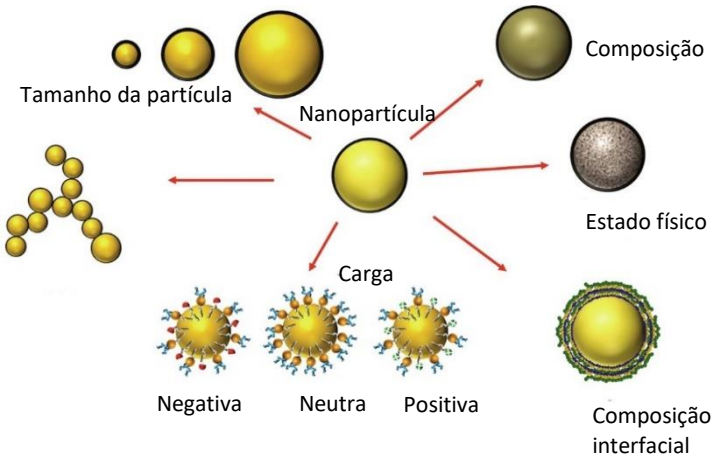


Figura 6 - Nanoemulsões podem variar nas características das partículas, como tamanho, composição e carga, adaptado de *Jafari et al* [41].

A estabilidade destes sistemas é de extrema importância, pelo que determinar o tamanho das gotas da fase dispersa, além da carga de superfície (potencial zeta), e a sua morfologia permite avaliar a estabilidade do sistema ao longo do tempo.

2.2.1. Tamanho da gota e índice de polidispersão

É muito importante controlar e medir o tamanho das partículas, uma vez que essa propriedade desempenha um papel importante nas características da nanoemulsão, como aparência, estabilidade, propriedades óticas, reologia e biodisponibilidade [50].

A dispersão de luz dinâmica (DLS), também conhecido como espectroscopia de correlação de fotões ou espalhamento de luz, é um dos métodos mais populares usados para determinar o tamanho das partículas dos sistemas emulsionados [36, 51, 52].

Durante as medições de DLS, a amostra é irradiada por um feixe de luz e as flutuações de intensidade-tempo do feixe de luz refletida ou transmitida são medidas. É possível determinar os tamanhos das partículas a partir do deslocamento de frequência do feixe de luz incidente quando espalhados por partículas em movimento dentro de uma suspensão coloidal.

Os dados de tamanho de partícula são geralmente apresentados como a média ponderada pela intensidade do diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão (PDI). O PDI caracteriza a largura da distribuição do tamanho de partícula e, portanto, a homogeneidade da formulação, com um PDI <0,2 sendo indicativo de uma distribuição de tamanho de gotícula estreita, enquanto valores próximos a 1 são encontrados para amostras que exibem uma heterogeneidade de tamanho de partícula muito alta [50, 53].

O DLS é capaz de analisar partículas com diâmetros entre 0,7 nm e 10 μm [54] e apresenta várias vantagens em relação a outras metodologias de medição do tamanho de partículas, tais como:

- Tempos de medição curtos;
- Processo simples e principalmente automatizado;
- Não é necessário calibração;
- Não invasivo;
- Altamente sensível.

Uma das principais limitações do DLS é que a viscosidade da fase aquosa é assumida como Newtoniana, o que nem sempre é o caso para emulsões, o que torna necessário usar baixas concentrações (ou seja, amostras diluídas) para evitar dispersão múltipla [20].

2.2.2. Potencial zeta

Assim como o tamanho da gota, o potencial zeta é indicativo da estabilidade dos sistemas emulsionados, tendo em vista que gotas com carga se agregam menos, devido à repulsão eletrostática. Portanto, alterações desse valor podem corresponder a mudanças na constituição e características da amostra.

O potencial zeta é o parâmetro mais usado para determinar as propriedades elétricas das gotículas em sistemas emulsionados devido à sua fácil representação em termos de propriedades elétricas e facilidade de determinação [39]. As gotículas eletricamente carregadas, quando submetidas a um campo elétrico, movimentam-se na direção de um elétrodo de carga contrária. Visto que a velocidade de mobilidade é proporcional ao potencial da superfície da partícula, o potencial zeta pode ser estimado a partir da medição da velocidade das partículas [55].

Para sistemas electrostaticamente estabilizados, o potencial zeta pode ser correlacionado com a estabilidade dos sistemas. Valores de potencial zeta acima | 60 | mV fornecem normalmente excelente estabilidade e boa estabilidade acima dos | 30 | mV, mas quando o potencial zeta dá entre |5| mV e |15| mV, ocorre facilmente floculação que é máxima entre |3| mV e |5| mV [50].

2.2.3. Aspeto Morfológico

A microscopia pode ser usada como uma técnica de imagem direta para obtenção de imagens dos sistemas emulsionados. Além de fornecer informações importantes sobre a morfologia e estrutura dos sistemas, as técnicas de microscopia também podem fornecer informações valiosas sobre o seu tamanho, sendo frequentemente usadas como complemento a outras técnicas de medida [50].

Diversas técnicas de microscopia estão disponíveis, sendo as mais utilizadas para análise dos sistemas emulsionados estudados a microscopia eletrónica de transmissão (TEM) [36] e a crio-microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução, com microanálise por raios X com observação das amostras a baixa temperatura (Crio-SEM) [36, 56, 57].

3. Oxidação lipídica

Os lípidos insaturados são instáveis quimicamente, uma vez que são suscetíveis á oxidação por parte do oxigénio. Juntamente com a contaminação de microrganismos constituem uma das principais causas de deterioração do alimentos [8, 58-62].

A degradação dos lípidos, frequentemente denominada por ranço, pode ser devida a:

- Reações hidrolíticas (ranço hidrolítico ou lipólise);
- Reações com o oxigénio atmosférico (autoxidação e fotoxidação);
- Oxidação pelas lipoxigenases.

A oxidação dos lípidos insaturados tem sido uma das áreas mais estudadas, na indústria alimentar, uma vez que está relacionada com a alteração dos alimentos com produção, tanto de substâncias que conferem aromas e cores indesejáveis, como de produtos de degradação indesejáveis e tóxicos que reagem com outros constituintes dos alimentos [3, 63]. Este problema é agravado pelo facto de estas reações poderem ser catalisadas e aceleradas por diversos fatores incluindo a presença de metais e de enzimas, o pH dos alimentos e a exposição a fatores externos como a temperatura e a luz [64, 65].

Quando afastados do seu contexto de proteção natural, os lípidos sofrem alterações do tipo oxidativo no decorrer de processos de transformação e armazenamento, as quais têm uma implicação direta na qualidade sensorial e nutricional, na segurança, no tempo de vida e no valor comercial dos produtos [66, 67]. O ranço representa, para o consumidor ou para o transformador industrial, uma importante causa de depreciação ou rejeição dos produtos, razão pela qual o controlo da estabilidade oxidativa dos produtos lipídicos se revela um aspeto essencial [68-76].

Os fenómenos de oxidação dos lípidos dependem de diversos mecanismos reacionais extremamente complexos, os quais estão relacionados com o tipo de estrutura lipídica e o meio onde esta se encontra. O número e a natureza das insaturações presentes, o tipo de interface entre os lípidos e o oxigénio (fase lipídica contínua, dispersa ou em sistema emulsionado), a exposição à luz, o calor, a presença de agentes pró-oxidantes (ex. iões metálicos de transição) ou antioxidantes, são fatores determinantes da estabilidade oxidativa dos lípidos [77-80].

Os processos que decorrem durante a oxidação lipídica tem sido amplamente descritos por vários autores [24, 80, 81]. De uma forma geral, pode-se definir a oxidação

lipídica como uma reação química entre os ácido gordos insaturados (PUFAs) e espécies reativas de oxigénio (ROS), levando a formação de radicais livres e hidroperóxidos que acabam por se decompor com o tempo [82].

3.1. Autoxidação

A autoxidação é um processo dinâmico que evolui ao longo do tempo. Trata-se de um fenómeno puramente químico e bastante complexo em que o $^3O_2$ reage com os radicais lipídicos, desencadeando reações radicalares, capazes de auto-propagação. No decurso desta sequência reacional estão compreendidas 3 etapas: iniciação, propagação e terminação [78, 80, 83-88].

A etapa de iniciação pode surgir através da perda de um hidrogénio ($H^{\bullet}$) no carbono α de ácidos gordos insaturados (RH), numa reação que pode ser catalisada por metais e acelerada pelo aquecimento ou luz. Devido à perda do hidrogénio é formado um radical livre (Equação 1) de um resíduo de ácido gordo $R^{\bullet}$.

$$RH \longrightarrow R^{\bullet} + H^{\bullet} \quad \textbf{(1)}$$

Na etapa de propagação, os radicais livres dos ácidos gordos ($R^{\bullet}$) reagem com oxigénio molecular para formar radicais livres peroxilo ($ROO^{\bullet}$). Por sua vez, estes podem retirar novos hidrogénios de outros ácidos gordos produzindo hidroperóxidos e mais radicais livres, desencadeando o mecanismo de propagação, representado nas equações seguintes [80, 89]:

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet} \quad \textbf{(2)}$$

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet} \quad \textbf{(3)}$$

$$RO + RH \longrightarrow ROH + R^{\bullet} \quad \textbf{(4)}$$

Deste modo, a facilidade com que é retirado um hidrogénio dos ácidos gordos é de extrema importância no que se refere à estabilidade oxidativa de um óleo. A ligação C-H numa cadeia alquílica saturada tem normalmente uma energia de dissociação a 298 k, de cerca de 414 kJ/mol. Já a ligação C-H num carbono alílico, tem uma energia de dissociação significativamente menor, de cerca de 372 kJ/mol. Por outro lado, sendo

a ligação C-H num carbono bis-alílico, esta energia de dissociação é ainda mais baixa, de cerca de DH_{298}=330 kJ/mol. Assim, devido à sua menor DH_{298} e à maior estabilização dos radicais formados por ressonância, os H bis-alílicos representam os H mais lábeis na molécula.

Deste modo explica-se a extrema instabilidade dos óleos de peixe à oxidação quando comparados com outros óleos alimentares, uma vez que são muito ricos em ácidos gordos ómega-3 (ácido linolénico, DHA e EPA). Olhando para a estrutura, por exemplo do DHA, verifica-se que este ácido gordo contém na sua estrutura um grande número de H bis-alílicos o que confere a esta molécula uma baixa estabilidade, *Figura 7*.

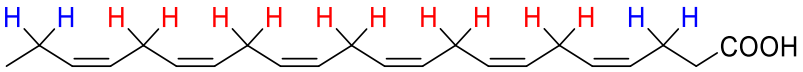


Figura 7 – Estrutura do DHA com os hidrogénios bis- alílicos representados a vermelho e com hidrogénios alílicos a azul. Não se representaram os outros hidrogénios na mólecula.

Esta cadeia de reações prossegue até se esgotarem os ácidos gordos insaturados ou até os radicais livres se inativarem uns aos outros. A última situação consiste na etapa de finalização, esquematizada pelas seguintes reações [30, 62, 90] [91]

$$R^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow R - R \quad \textbf{(5)}$$

$$ROO^{\cdot} + R^{\cdot} \longrightarrow ROOR \quad \textbf{(6)}$$

$$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \longrightarrow ROOR + O_2 \quad \textbf{(7)}$$

Por norma, estas reações não continuam até ao consumo total do substrato gordo. Há normalmente um esgotamento prévio do oxigénio, uma vez que a sua transferência é inibida pela presença de uma película que se forma à superfície do óleo ou gordura, no decorrer da reação.

Os processos de oxidação alternativos, a fotoxidação e a oxidação enzimática também podem alimentar estas reações de autoxidação.

3.2. Fotoxidação

A fotoxidação lipídica ocorre na presença da luz, de foto-sensibilizadores e do oxigénio atmosférico, produzindo-se oxigénio singleto ($^1O_2$) que reage diretamente com os lípidos insaturados com a formação de hidroperóxidos. Este tipo de oxidação não é inibido por antioxidantes primários. Pigmentos como a clorofila e a riboflavina, contidos em alimentos, servem de foto-sensibilizadores [82, 92, 93].

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

- *Sensibilizadores do tipo I*: são aqueles que, quando ativados pela luz (^{3}Sens*), reagem diretamente com ao substrato lipídico (RH) através do átomo de hidrogénio, ou por transferência eletrónica formando radicais, os quais reagem com o oxigénio (*Equação 8, 9 e 10*).

$$^1\text{Sens} \xrightarrow{h\nu} {}^1\text{Sens}^* \longrightarrow {}^3\text{Sens}^* \quad (8)$$

$$^3\text{Sens}^* + \text{RH} \rightarrow [\text{intermediário}]^{\cdot} \quad (9)$$

$$[\text{intermediário}]^{\cdot} + {}^3\text{O}_2 \rightarrow \text{ROOH} + {}^1\text{Sens} \quad (10)$$

- *Sensibilizadores do tipo II*: são aqueles que, estando no estado tripleto, conseguem transferir energia ao oxigénio, originando o oxigénio singleto que, por sua vez, reage com lípidos insaturados (*Equação 11 e 12*).

$$^3\text{Sens}^* + {}^3\text{O}_2 \longrightarrow {}^1\text{Sens} + {}^1\text{O}_2^* \quad (11)$$

$$^1\text{O}_2^* + \text{RH} \longrightarrow \text{ROOH} \quad (12)$$

3.3. Decomposição dos hidropéroxidos

Os hidroperóxidos produzidos denominam-se produtos primários da oxidação. Estes compostos não têm repercussão direta no aroma dos alimentos, pois são inodoros e insípidos [76]. No entanto, dado que são muito instáveis, facilmente se decompõem

originando compostos voláteis (aldeídos, álcoois e acetonas) principais responsáveis pelo odor a ranço e não voláteis (compostos poliméricos) produtos secundários da oxidação. Com a formação destes compostos, a qualidade dos alimentos decresce consideravelmente [82, 94]. A *Figura 8* mostra um esquema reacional proposto para a decomposição dos hidroperóxidos em compostos voláteis [95, 96].

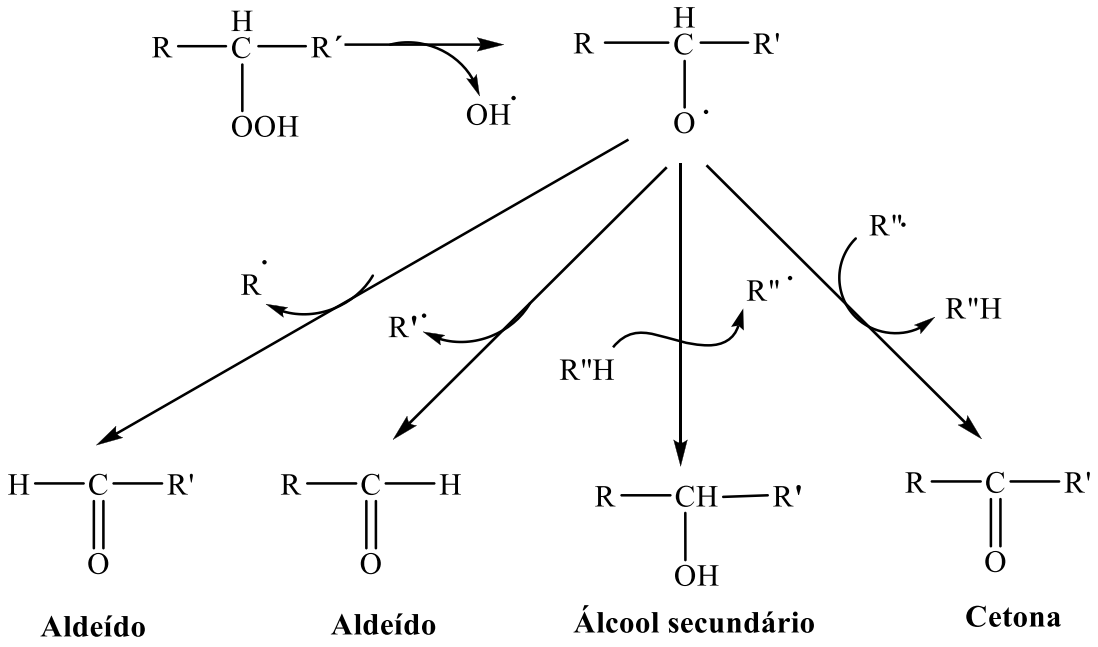


Figura 8 - Decomposição dos hidroperóxidos em compostos secundários voláteis.

Com a rutura homolítica da ligação O-O do hidroperóxido, originam-se radicais alcoxilo (RO•) e hidroxilo (HO•) muito instáveis e que sofrem cisão **β** homolítica. Consoante a ligação onde ocorre a cisão pode formar-se um aldeído volátil de cadeia curta, ou um aldeído unido à parte glicérica da molécula originando, neste caso, aldeídos glicéricos não voláteis e não aromáticos. Por outro lado, os aldeídos voláteis (ex. hexanal) são considerados produtos de oxidação secundários muito importantes, pois são compostos aos quais se associa o cheiro a ranço. A formação de álcoois ocorre quando o radical alcoxilo ataca um átomo de hidrogénio de outro ácido gordo insaturado (R''H), com a formação de um novo radical (R''•).

Outra possibilidade é a reação entre os radicais livres, terminando a reação em cadeia e dando lugar ao aparecimento de cetonas.

Os metais de transição como o ferro e o cobre, presentes nos óleos e gorduras, também catalisam a decomposição dos hidroperóxidos, originando novos radicais livres (*Equações 13,14 e 15*) [97]. Normalmente a velocidade da reação 13 é mais rápida

que a velocidade da reação 14 ou seja, k_1 >>>>> k_2, pelo que os metais mais reduzidos tem normalmente um efeito mais pró-oxidante.

$$\mathrm{ROOH} + \mathrm{M}^{+} \xrightarrow{k_1} \mathrm{RO}^{\cdot} + \mathrm{HO}^{-} + \mathrm{M}^{2+} \quad \textbf{(13)}$$

$$\mathrm{ROOH} + \mathrm{M}^{2+} \xrightarrow{k_2} \mathrm{ROO}^{\cdot} + \mathrm{H}^{+} + \mathrm{M}^{+} \quad \textbf{(14)}$$

$$2\mathrm{ROOH} \longrightarrow \mathrm{RO}^{\cdot} + \mathrm{ROO}^{\cdot} + \mathrm{H_2O} \quad \textbf{(15)}$$

3.4. Fatores que influenciam a velocidade de oxidação dos lípidos em alimentos

A oxidação dos lípidos depende de mecanismos reacionais diversos e extremamente complexos, os quais se relacionam com o tipo de estrutura destes e o meio onde estes se encontram. O número e a natureza das insaturações presentes, o tipo de interface entre os lípidos e o oxigénio atmosférico, a exposição à luz e ao calor, a presença de pró-oxidantes (ex. iões metálicos de transição) ou de antioxidantes, são fatores determinantes para a estabilidade oxidativa dos lípidos [24].

Sendo a velocidade de autoxidação dependente do número de ligações duplas presentes no lípido, seria de esperar que os óleos vegetais que possuem níveis mais elevados de ésteres de ácidos gordos insaturados exibissem maior suscetibilidade à deterioração oxidativa relativamente às gorduras de origem animal que, por sua vez, apresentam níveis de ésteres de ácidos gordos saturados mais elevados. No entanto, verifica-se que os óleos vegetais tendem a oxidar mais lentamente porque contêm quantidades significativas de tocoferóis, os quais atuam como antioxidantes naturais.

O mecanismo de oxidação varia com a temperatura. Assim, a temperaturas elevadas as reações de polimerização e ciclização são importantes, mas a temperaturas ambiente são insignificantes. Do mesmo modo, o aumento da pressão de oxigénio só se torna importante a altas temperaturas porque a sua solubilidade diminui com a temperatura, tornando-se num fator limitante durante o progresso da oxidação. O aumento da temperatura provoca também muitas vezes um aumento da contaminação por metais e destrói possíveis compostos antioxidantes na gordura.

A luz é outro dos fatores determinantes na estabilidade oxidativa dos lípidos. Sabe-se que compostos minoritários, como a clorofila (sensibilizador) no azeite virgem,

podem ser excitados eletronicamente devido à absorção da luz. Consequentemente, a molécula excitada é capaz de transferir o seu excesso de energia a uma molécula de $^3O_2$ (oxigénio no seu estado fundamental), originando oxigénio singleto ($^1O_2$) que reage com as ligações duplas. A prevenção da fotoxidação durante o armazenamento dos alimentos é importante para assegurar a sua elevada estabilidade oxidativa.

3.5. Fatores que afetam a oxidação lipídica em sistemas emulsionados

A oxidação de lípidos (óleos / gorduras) tem sido extensivamente estudada em meios homogêneos. No entanto, os lípidos em alimentos estão presentes, principalmente na forma de emulsões óleo-em-água [24, 30, 78, 98-102] ou sob a forma de biomembranas e, como consequência, os processos de oxidação são mais complexos do que em sistemas homogêneos. Esta complexidade aumentada advém de vários fatores, nomeadamente da:

- **Presença da região interfacial**

A oxidação lipídica em emulsões é fortemente influenciada pela natureza da região interfacial, que por sua vez é afetada pela composição das regiões oleosa e aquosa. A região interfacial é a zona de separação entre as regiões aquosa e oleosa de uma emulsão, e sendo altamente anisotrópica, condiciona tanto a velocidade de oxidação quanto a importância relativa das diferentes reações envolvidas ao atuar como barreira à penetração ou difusão de espécies moleculares. Da mesma forma, e dependendo de sua carga elétrica, pode causar a atração ou repulsão de reagentes iónicos ou zwiteriónicos, afetando significativamente a ação de metais, pró-oxidantes, antioxidantes, etc [60]. A velocidade de oxidação é muito maior em emulsões preparadas com emulsionantes iónicos do que com emulsionantes não iônicos, como Tween 80 [103]. Nas emulsões estabilizadas por emulsionantes aniónicos, a oxidação é acelerada porque ocorre atração eletrostática entre a região interfacial carregada negativamente e iões metálicos carregados positivamente. A membrana que envolve uma gotícula também pode conter moléculas que são capazes de eliminar os radicais livres e, portanto, de retardar a oxidação lipídica. Muitas moléculas emulsionantes, contêm resíduos de açúcares ou de aminoácidos que também podem atuar como sequestradores de radicais livres [104].

- **Partição das moléculas nas diferentes regiões**

As moléculas reativas presentes na emulsão estão distribuídas entre as regiões oleosa, aquosa e interfacial de acordo com sua polaridade. As moléculas de baixa polaridade encontram-se localizadas predominantemente entre as regiões oleosa e a interfacial, enquanto as polares encontram-se preferencialmente distribuídas entre as regiões aquosa e interfacial. As moléculas anfifílicas e insolúveis nas regiões oleosa e aquosa poderão estar localizadas exclusivamente na região interfacial. As referidas distribuições afetam não apenas a reatividade (porque as três regiões possuem propriedades diferentes), mas também a concentração efetiva das moléculas nas várias regiões do sistema emulsionado [105].

- **pH do sistema**

Em geral, a velocidade da oxidação lipídica em emulsões é menor a pH mais alto e acelera à medida que o pH diminui, possivelmente devido à solubilização de catalisadores metálicos. Por outro lado, a ação de muitos antioxidantes é igualmente afetada pela variação do pH, uma vez que, na maior parte dos casos possuem estruturas polifenólicas, muitas vezes contendo também grupos carboxílicos. Consequentemente, o grau de ionização da molécula de AO vai depender do pH da região aquosa, e por conseguinte, a distribuição e o mecanismo de ação desta poderá ser alterado [106, 107].

A forma ionizada de um antioxidante é muito mais polar que a forma não ionizada e, portanto, tem uma afinidade muito maior para a região aquosa, embora o efeito global também dependa da hidrofobicidade do resto da molécula. Se o resto da molécula é polar, então as formas ionizada e não ionizada estarão localizadas na região aquosa. Pelo contrário, se o resto da molécula antioxidante for apolar (isto é, com um carácter puramente hidrofóbico) então a molécula pode localizar-se preferencialmente na região interfacial.

3.6. Avaliação da extensão da oxidação lipídica

A avaliação do estado de oxidação de óleos e gorduras é bastante importante a nível industrial, permitindo controlar e garantir a qualidade das matérias-primas adquiridas e dos produtos comercializados. Acresce ainda o interesse da sua aplicação ao estudo sistemático do desenvolvimento do ranço.

Existem vários métodos para medir a extensão da oxidação de uma gordura/óleo através da determinação dos produtos primários da oxidação, os hidroperóxidos, ou da determinação dos seus produtos secundários, normalmente compostos carbonilo. Estes métodos podem ser químicos, físicos, ou cromatográficos[108]. A grande variedade de técnicas analíticas existentes foram desenvolvidas para averiguar a oxidação lipídica em gorduras e óleos a granel, mas muitas destas técnicas podem também ser usadas para monitorizar a oxidação lipídica em emulsões. Devido à complexidade química da oxidação lipídica, deve-se ter muito cuidado ao selecionar uma técnica apropriada para caracterizar o seu progresso.

Em emulsões é frequentemente mais difícil avaliar a extensão da oxidação do sistema emulsionado, porque a maioria dos métodos requer que o componente lipídico seja separado da região aquosa antes da análise. As emulsões podem ser quebradas por várias técnicas, como aquecimento e centrifugação, congelamento e descongelamento. A coalescência das gotículas pode então ocorrer pela ação da força centrifuga ou pela distorção da superfície das gotículas durante o congelamento e descongelamento.

Muitos produtos de oxidação são de baixo peso molecular e contêm mais átomos de oxigênio do que as moléculas de partida, pelo que podem possuir propriedades tensoativas e solubilidade em água sendo por isso lixiviados na região aquosa e, portanto, não poderão ser determinados na região oleosa [104]. Assim, pode ser necessário usar uma combinação de procedimentos de extração ou técnicas analíticas, para obter informações sobre os produtos da reação nas regiões aquosa e oleosa.

Uma das dificuldades na avaliação do grau de oxidação reside na escolha do momento mais adequado para se efetuar essa determinação. É importante notar que um valor baixo de hidroperóxidos não indica necessariamente um baixo nível de rancificação, uma vez que, com o avançar da oxidação lipídica, os hidroperóxidos decompõem-se em produtos de oxidação secundários. Assim, quando a velocidade de decomposição dos hidroperóxidos é superior à da sua formação, a quantidade de peróxidos começa a diminuir. Por este motivo, poderá ser necessário confirmar o estado da oxidação por métodos em que são determinados os produtos secundários da oxidação, nomeadamente os compostos carbonílicos. Assim, a determinação dos produtos secundários é especialmente importante quando não é possível efetuar uma avaliação do estado oxidativo da amostra ao longo do tempo, havendo por isso o perigo de não fazer a avaliação correta deste estado apenas pelo doseamento dos produtos primários da oxidação.

Existem muitos métodos para medir a oxidação lipídica, determinando produtos de oxidação primária (hidroperóxidos) ou produtos de oxidação secundária. Estes métodos podem ser químicos, tais como o índice de peróxidos que é um método em que parte do pressuposto que todos os compostos a determinar são peróxidos, o índice de *p*-anisidina que determina a quantidade de aldeídos α e β insaturados, o índice totox que indica a oxidação total de uma amostra através do somatório do índice de peróxidos e do valor do índice *p*-anisidina e o ensaio do ácido tiobarbitúrico (TBA) que mede a quantidade de malonaldeído (produto secundário). Como métodos físicos, podemos ter o índice de dienos conjugados, em que os hidroperóxidos com ligações duplas conjugadas apresentam absorção característica a 233 nm. Podem ser ainda utilizados métodos cromatográficos, normalmente para a determinação de compostos caboníllicos voláteis, tais como GC, com deteção quer de ionização de chama (FID) quer de massa (MS).

Ao longo deste trabalho determinaram-se os produtos primários da oxidação, através do índice de peróxidos e dos dienos conjugados. Uma vez que a determinação do índice de peróxidos requer a extração dos lípidos da emulsão antes de se efetuar a análise e é necessário um elevado volume de emulsão, optou-se pela utilização da determinação dos hidroperóxidos pelo índice de dienos conjugados, dado ser um método mais simples, rápido e tendo em conta a quantidade de amostras no estudo da estabilidade oxidativa. No entanto, efetuou-se um estudo prévio com emulsões óleo de peixe / tampão citrato em que se verificou existir uma correlação direta entre o índice de peróxidos e os dienos conjugados.

3.6.1. Índice de peróxidos (IP)

A determinação do índice de peróxidos é uma das medições mais antigas e mais utilizadas para avaliar a extensão da oxidação dos óleos. Os hidroperóxidos são os primeiros compostos formados no processo de oxidação lipídica, sendo este o principal indicador de rancificação detetado nos alimentos nas fases iniciais da oxidação. O índice de peróxidos (IP), representa o número de miliequivalentes de oxigénio ativo por quilograma de amostra (meq/kg O_2) [109]. Por norma, considera-se como um óleo de boa qualidade aquele que tem um índice de peróxidos inferior a 1 meq/kg, e o valor máximo aceitável para uso na indústria alimentar é normalmente de 10 meq/kg [109]. Para a determinação do IP recorre-se a uma titulação iodométrica. Este método baseia-se na reação dos hidroperóxidos e outros peróxidos com o ião iodeto em meio ácido,

dando origem a iodo que, pode ser titulado com tiossulfato de sódio na presença de amido [110, 111], *Equações 16 e 17*:

$$ROOH + 2H^+ + 2KI \longrightarrow I_2 + ROH + 2K^+ + H_2O \quad \textbf{(16)}$$

$$I_2 + 2Na_2S_2O_3 \longrightarrow Na_2S_4O_6 + 2NaI \quad \textbf{(17)}$$

A American Oil Chemist's Society (AOCS) padronizou um procedimento para a determinação de IP em seu método Cd 8-53, que é aplicável a todos os óleos e gorduras. Este método é confiável e reprodutível, mas requer quantidades relativamente grandes de lípidos, não pode ser efetuada diretamente em sistemas emulsionados, pelo que os lípidos neste caso têm de ser separados da emulsão antes de se proceder à determinação e carece de sensibilidade para valores de peróxidos muito baixos.

3.6.2. Determinação do conteúdo em Dienos Conjugados

A autoxidação dos PUFAs ocorre com a formação de hidroperóxidos muitas vezes contendo ligações duplas conjugadas (dienos conjugados) e que podem ser determinadas quantitativamente através da sua forte absorção a 233 nm. Assim, uma determinada quantidade de gordura/óleo é rigorosamente pesada, diluída em etanol, lendo-se de seguida a absorvância desta solução ao referido comprimento de onda (λ). O método é muito simples e rápido, requerendo apenas pequenas quantidades de amostra e pode ser utilizado diretamente em sistemas emulsionados sem prévia separação dos lípidos, desde que seja possível obter uma solução de amostra emulsionada num solvente opticamente transparente, a 233 nm.

4. Adição de antioxidantes: uma estratégia para inibir oxidação lipídica

4.1. Antioxidantes

Os lípidos nos alimentos deterioram-se por oxidação tanto durante o seu processamento como durante o seu armazenamento prolongado, ocorrendo o aparecimento de aromas e gostos desagradáveis, originando uma importante diminuição do valor nutricional do alimento e da qualidade sensorial do mesmo. Esta situação provoca a rejeição dos produtos por parte do consumidor e perdas económicas consideráveis causadas pela retirada do mercado de alimentos e matérias primas degradadas. Por outro lado, a dificuldade de conservação destes alimentos provoca uma baixa viabilidade económica no aproveitamento de determinados produtos e recursos, nomeadamente a pesca de determinadas espécies muito ricas em lípidos ou de matérias primas como óleo de peixe. Conseguir retardar este tipo de reação tornou-se numa tarefa de grande importância na indústria alimentar e, claro, para o consumidor.

Atualmente existem vários métodos capazes de retardar a oxidação lipídica: impedir o acesso ao oxigénio, diminuir a temperatura, inativar as enzimas que catalisam a oxidação, reduzir a pressão de oxigénio, embalagem correta, etc. O método de proteção mais eficaz e mais barato contra a oxidação lipídica é, sem dúvida alguma, o uso de substâncias específicas capazes de inibir as reações de oxidação [112-118]. A denominação correta destas substâncias é inibidores de oxidação lipídica, conhecidos vulgarmente por antioxidantes. Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes em pequenas quantidades em sistemas lipídicos, impedem ou retardam a sua oxidação, por inibição dos radicais livres ou por interação com estes [100, 119].

De acordo com a sua natureza, os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos [120] [121], os antioxidantes primários e secundários.

4.1.1. Antioxidantes primários

Os antioxidantes primários [114] ou chain–breaking reagem com os radicais lipídicos altamente energéticos, convertendo-os em produtos termodinamicamente mais estáveis através da doação do seu hidrogénio aos radicais alquilperoxilo (ROO$^{\bullet}$) ou alcóxilo (RO$^{\bullet}$) formados durante a iniciação da oxidação lipídica (*Equações 18 e 19*).

$$ROO^{\cdot} + AH \longrightarrow ROOH + A^{\cdot} \quad \textbf{(18)}$$

$$RO^{\cdot} + AH \longrightarrow ROH + A^{\cdot} \quad \textbf{(19)}$$

Os antioxidantes primários competem com o substrato lipídico, dando origem a um radical (A•) com relativa estabilidade, que pode originar posteriormente produtos não radicalares, sendo que a velocidade de reação entre o AO e o radical é muito superior à velocidade de reação do radical com outros ácidos gordos.

Os fenóis são um exemplo deste tipo de antioxidantes. O fenol por si só é inativo, mas a sua substituição com grupos alquilo nas posições 2,4 ou 6 aumenta a densidade eletrónica no grupo hidroxilo por um efeito indutivo, aumentando deste modo a sua reatividade com o radical lipídico. Por outro lado, quando estes grupos alquilo são volumosos diminuem a reatividade do radical formado por impedimento estérico.

O radical fenóxilo formado é igualmente estabilizado pela deslocalização do eletrão desemparelhado no anel aromático como mostra a *Figura 9*.

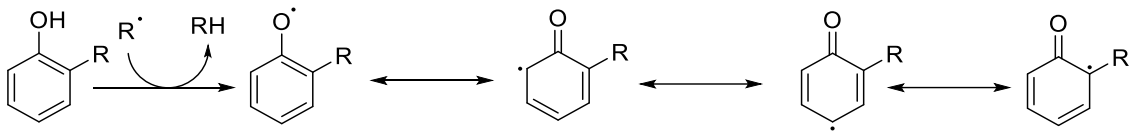


Figura 9 - Estabilização do radical fenóxilo por deslocalização eletrónica (R= grupo alquilo) [114].

Assim, atividade antioxidante está diretamente relacionada com a estabilidade por ressonância dos radicais fenóxilo formados. Normalmente a presença de um segundo grupo hidroxilo no anel fenólico, em especial na posição orto, aumenta a atividade antirradicalar das moléculas. Este aumento deve-se por um lado à possibilidade do radical formado ser estabilizado por uma ponte de hidrogénio (*Figura* 10) e por outro lado á capacidade de fornecerem mais um hidrogénio que pode neutralizar mais um radical, com a produção de moléculas não radicalares e, por conseguinte, não reativas (*Figura 10*).

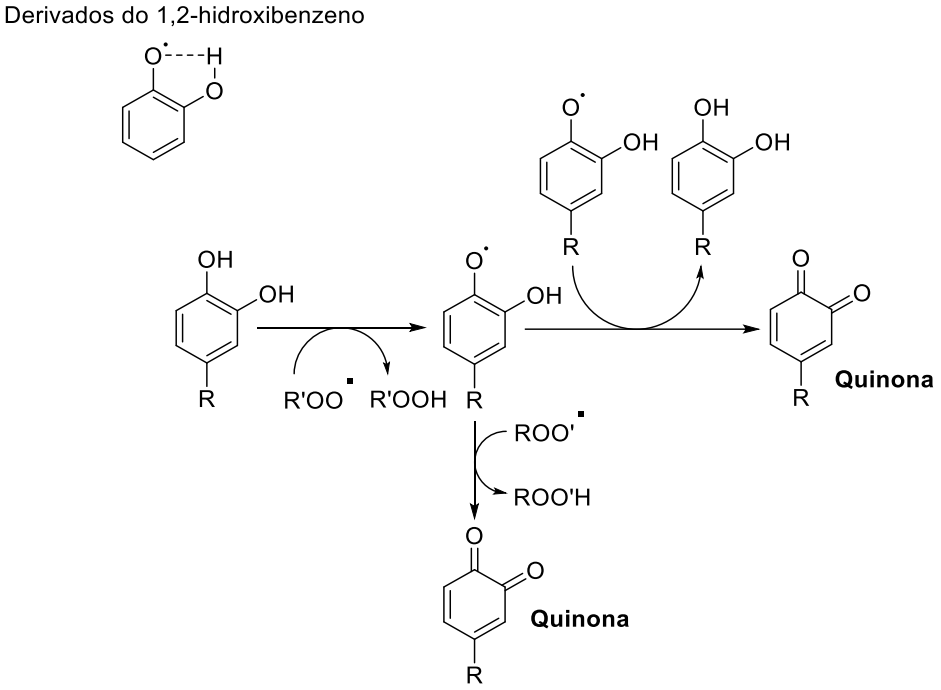


Figura 10 – Mecanismo de atuação dos antioxidantes catecólicos.

O poder antioxidante dos compostos depende de vários fatores, nomeadamente, da sua estrutura, como já referido, da sua concentração, da temperatura, do meio onde se encontram e da presença de metais [121, 122] . Assim, existem antioxidantes eficazes a baixas concentrações, mas que podem exercer uma ação pró-oxidante a elevadas concentrações [123]. A sua atividade antioxidante também diminui com o aumento da temperatura devido à sua degradação térmica [124].

Dependendo do solvente onde se encontram, o mecanismo pelo qual ocorre a reação entre os radicais e o antioxidante pode variar e, por conseguinte, a eficácia dos potenciais antioxidantes em vários sistemas lipídicos poderá também variar. Assim, os antioxidantes exercem normalmente a sua ação por dois mecanismos: por transferência do átomo de hidrogénio (TAH) ou por transferência de um eletrão (TE). A cinética e o potencial da reação são diferentes, mas o produto final da reação é o mesmo (*Figura 11*) [125].

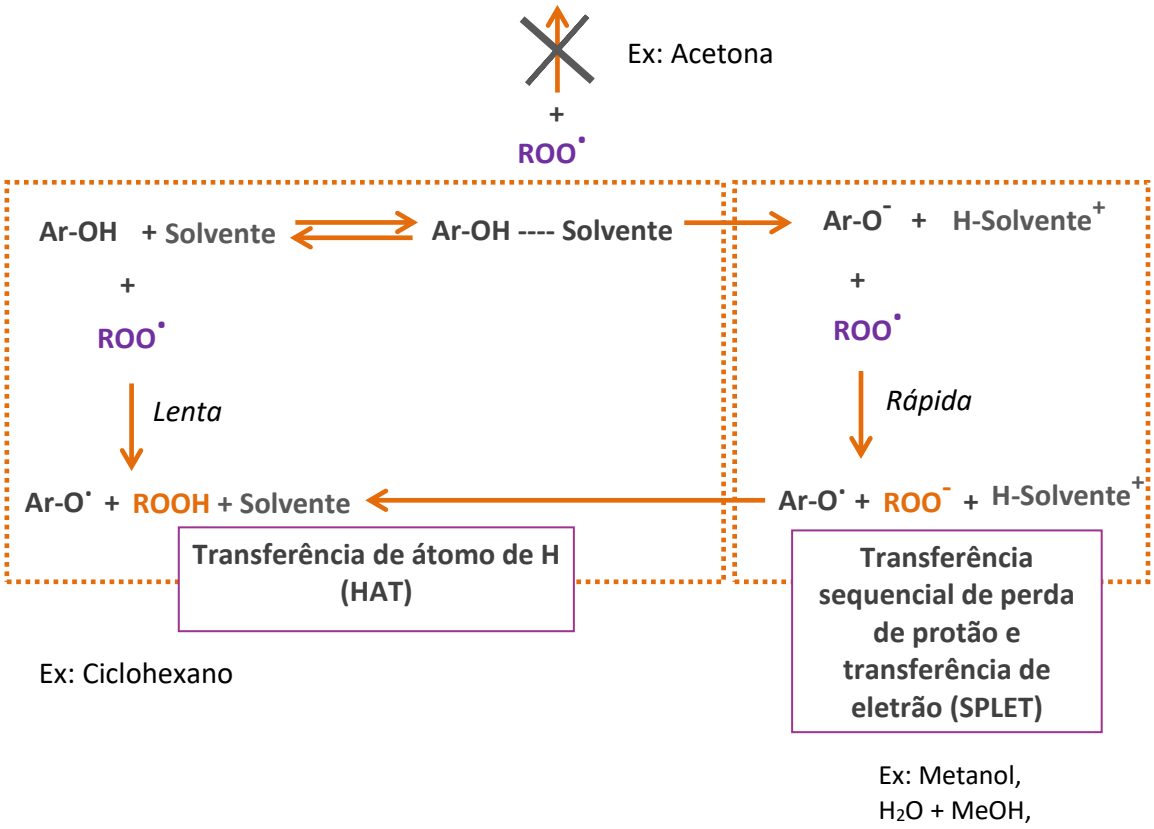


Figura 11 – Mecanismos de reação de fenóis com radicais, por transferência de átomo de hidrogénio (HAT) e por transferência sequencial de perda de protão e transferência de eletrão (SPLET).

As reações de TAH e TE ocorrem muitas vezes simultaneamente, mas o mecanismo dominante num dado sistema será determinado por vários fatores, como a estrutura do antioxidante e suas propriedades, a energia de dissociação da ligação O-H (EDL) e o potencial de ionização (PI), e em particular do solvente [126-128].

Normalmente em solventes apróticos o mecanismo mais habitual é o TAH, mas a velocidade da reação diminuí consideravelmente quando o solvente tem capacidade para receber pontes de hidrogénio, uma vez que apenas os hidrogénios que não formam estas pontes poderão ser transferidos (por exemplo em acetona).

Em solventes ionizantes, como a água, metanol e etanol, ocorre normalmente a transferência de um eletrão do anião fenolato para o radical. Este mecanismo TE é normalmente apelidado de “transferência sequencial de perda de protão e transferência de eletrão”, SPLET [129]. A velocidade da reação é normalmente muito maior que para as reações de TAH e deste modo influenciada pelo pH do meio, ocorrendo mais rapidamente a pH mais altos. Assim, o mecanismo de TAH deverá ter um papel mais importante na proteção de sistemas como os óleos alimentares, mas o mecanismo de

SPLET será com certeza de maior relevância quer em biofluidos quer em sistemas emulsionados [88].

A interação dos polifenóis com os metais é de especial relevância para a sua capacidade antioxidante. De facto, os polifenóis em geral têm uma alta capacidade para reduzir iões metálicos produzindo espécies metálicas reduzidas com um poder pró-oxidante superior (Ver *equações 13* e *14 e Figura 12*).

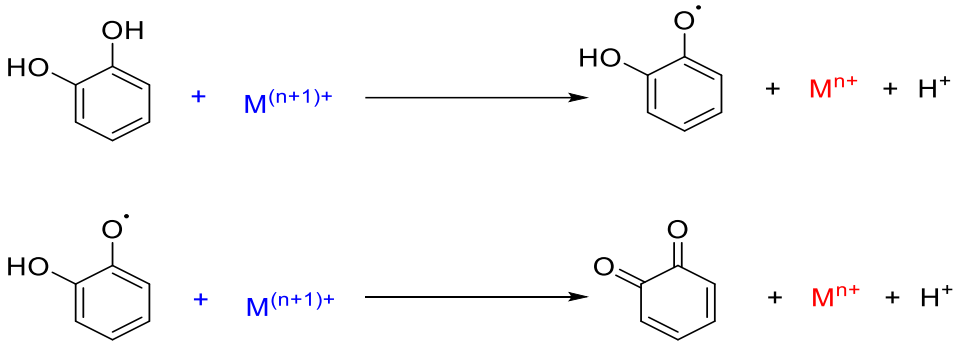


Figura 12 – Reações de redução de iões metálicos na presença de antioxidantes catecólicos.

Por outro lado, esta reação provoca a destruição do antioxidante que deixa de estar disponível para a neutralização de radicais. De notar que uma pequena quantidade de metais pode provocar a diminuição da quantidade de antioxidante rapidamente uma vez que o O_2 atmosférico vai reciclando o metal reduzido com produção de novas espécies metálicas oxidadas que irão reagir com mais moléculas de antioxidante (*Figura 13*.

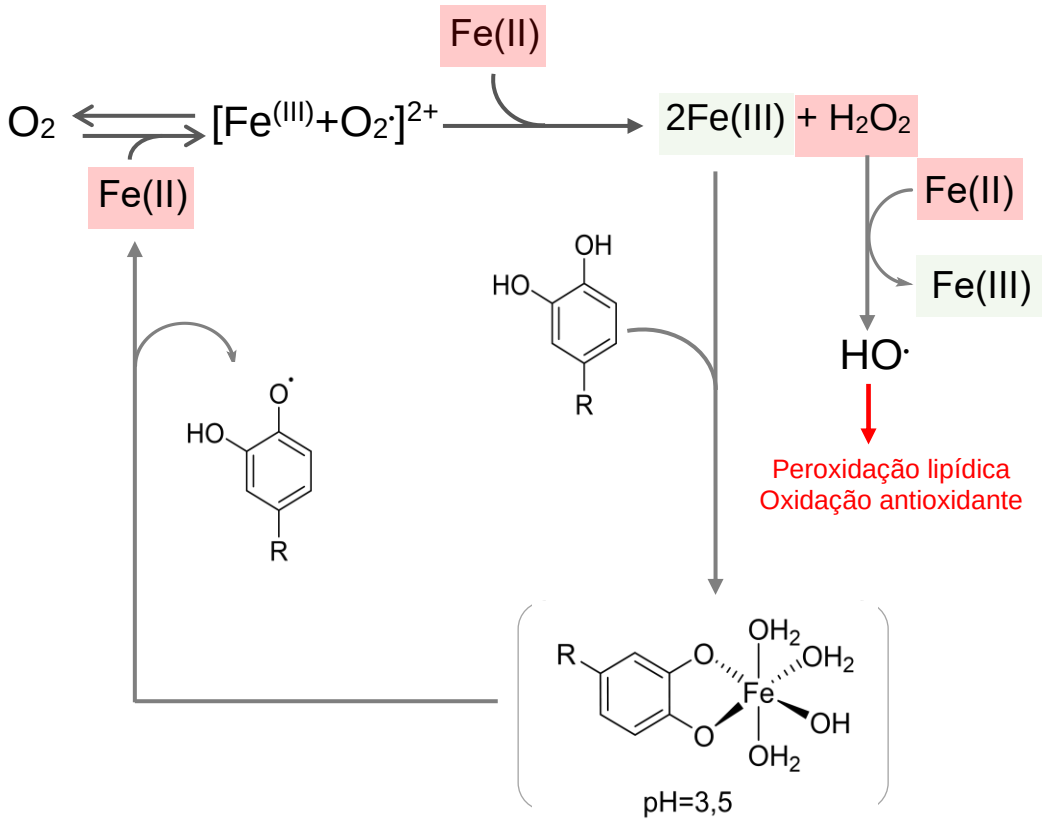


Figura 13 – Esquema ilustrativo do mecanismo pelo qual os catecóis são destruídos na presença de iões férricos e/ou ferrosos e oxigénio atmosférico.

4.1.2. Antioxidantes secundários

Os antioxidantes secundários [114] ou preventivos reduzem a velocidade do processo de iniciação da oxidação, impedindo ou retardando a formação de radicais livres resultantes da decomposição dos hidroperóxidos, através de vários mecanismos tais como a complexação de metais e absorção de radiação UV [130, 131]. Os antioxidantes secundários mais utilizados são sem dúvida os agentes quelantes como por exemplo o ácido cítrico e seus sais (*Figura 14*).

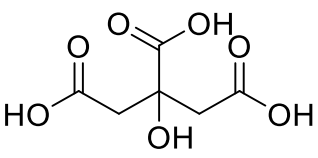


Figura 14 – Estrutura do ácido cítrico.

Este quelante é de origem natural e é o ácido mais utilizado como aditivo alimentar [132], podendo formar vários tipos de complexos / quelatos, dependendo do pH do meio, exemplificados na *Figura 15.*

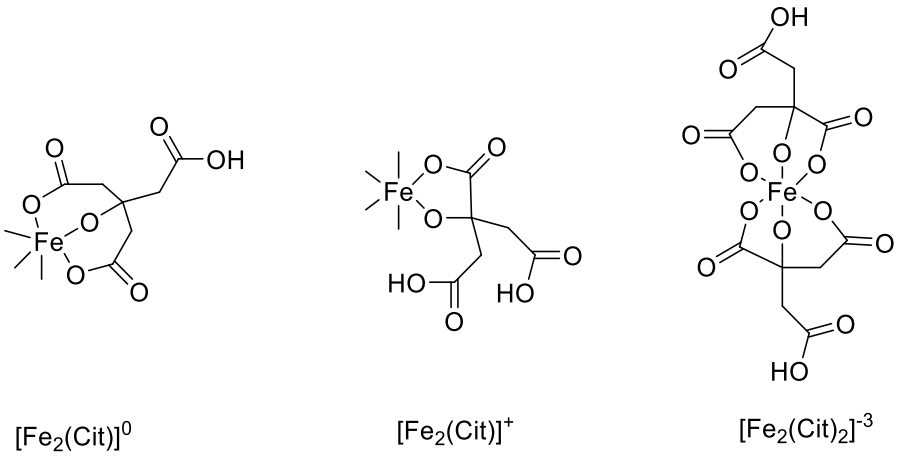


Figura 15 - Representação de exemplos de estrutura dos complexos citrato- ferro existentes em solução aquosa [133], as H_2O de coordenação não foram representadas para simplificação.

Deste modo, os agentes quelantes são utilizados muitas vezes juntamente com os antioxidantes primários de modo a evitar os efeitos pró-oxidantes muitas vezes observados para os antioxidantes primários na presença de metais e já descrito no ponto anterior.

4.2. Compostos fenólicos

A maior parte dos antioxidantes usados comercialmente são compostos fenólicos de origem natural *(*ex. tocoferóis [65, 134]) ou sintética *(*ex. BHT, BHA [65, 135-139]), os quais atuam de uma forma geral como antioxidantes primários.

Os antioxidantes de origem sintética têm revelado elevada capacidade de proteção contra os fenómenos oxidativos. No entanto, questões que se relacionam diretamente com a toxicidade de alguns desses compostos (ex. promotor da carcinogénese) conduziram à rejeição generalizada destes aditivos, independentemente da sua alta estabilidade, baixo custo e outras vantagens tecnológicas [140, 141].

A realização de diversos trabalhos com extratos de plantas tem permitido isolar e identificar novos compostos com propriedades antioxidantes, a maior parte dos quais apresentam estruturas fenólicas (ex. ácidos fenólicos, flavonoides) [72, 142-144]. Porém, esses compostos de origem natural têm demonstrado, na maior parte dos casos,

uma menor eficácia de ação quando comparados com os antioxidantes sintéticos legalmente permitidos, fato para o qual contribui sobretudo a sua menor estabilidade nas condições normais de processamento e manuseamento dos produtos.

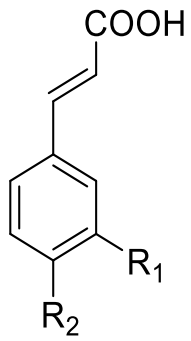
A insatisfação quanto à eficácia e segurança dos compostos antioxidantes atualmente usados em produtos alimentares, cosméticos ou medicamentos, motiva a investigação e desenvolvimento de novos antioxidantes, obtidos não só a partir de fontes naturais, mas também por síntese química total ou parcial.

Os polifenóis encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal, fazendo parte do seu sistema antioxidante endógeno. Estes compostos encontram-se sobretudo na forma de ésteres de ácidos orgânicos ou como glicosídeos [145], e raramente como ácidos livres. Como consequência dessa ubiquidade encontram-se também presentes em muitos alimentos, influenciando de modo significativo algumas das suas propriedades, nomeadamente as características organoléticas, a estabilidade e o valor nutricional.

Os diferentes tipos de atividades biológicas associados a este grupo de compostos justificam o potencial interesse da sua aplicação em diferentes áreas, nomeadamente alimentar e farmacêutica.

4.2.1. Ácido hidroxicinâmico e seus derivados

O maior grupo de compostos pertencentes aos ácidos fenólicos são os derivados do ácido hidroxicinâmico como o ácido cafeico [146, 147], (*Figura 16*) que são encontrados em quase todas as plantas. Os ácidos hidroxicinâmicos são de particular interesse devido á sua potencial atividade biológica, tendo sido já demonstrado que podem possuir efeitos antialérgicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antiviral, anti-carcinogénicos entre outras [148, 149].



R_1	R_2	ÁCIDO FENÓLICO
OH	H	Ácido hidroxicinâmico
OH	OH	Ácido cafeico

Figura 16 - Estrutura química dos derivados do ácido cinâmico [150].

As funções biológicas de ácidos hidroxicinâmicos estão intrinsecamente dependentes do número e orientação relativa dos substituintes hidroxilo ou metoxilo do anel [145].

Quando livres, os ácidos fenólicos têm normalmente solubilidade relativamente baixa em meio aprótico [93] . O carácter hidrofílico destes antioxidantes reduz a sua aplicabilidade em sistemas lipofílicos, havendo, portanto, necessidade de por vezes aumentar a lipofilia destes compostos e por consequência diversificar a sua aplicação em matrizes alimentares e, possivelmente, a sua atividade biológica [151].

A hidrofobicidade dos ácidos hidroxicinâmicos pode ser aumentada por esterificação do grupo carboxilo do ácido fenólico com um álcool. Desta forma, obtém-se uma molécula mais lipofílica que deve manter as suas propriedades funcionais originais, mas que pode estender as possíveis aplicações destes antioxidantes naturais em matrizes alimentares ou cosméticos contendo lípidos.

A síntese dos ésteres dos ácidos hidroxicinâmicos pode ser efetuada através da esterificação direta do ácido cafeico com álcoois ou através da reação condensação de Knoevenagel modificada por Verley-Doebner [151].

Nesta última via sintética, é necessário sintetizar monomalonatos derivados dos álcoois gordos apropriados (*Figura 17*), por simples aquecimento dos álcoois gordos com o ácido de Meldrum (2, 2-dimetil-1, 3-dioxano-4, 6-dione) em tolueno.

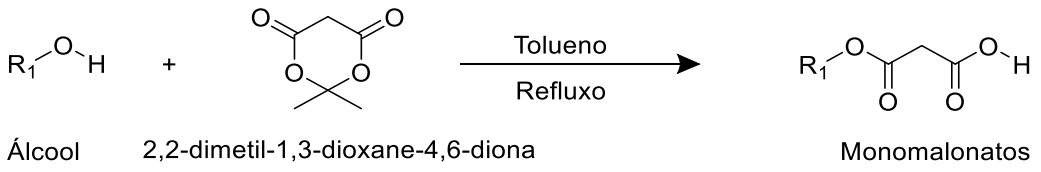


Figura 17 - Síntese de monomalonatos.

Posteriormente faz-se reagir o monomalonato com o derivado do benzaldeído apropriado, na presença de piridina e β-alanina, através de uma reação de condensação de Knoevenagel modificada por Verley-Doebner (*Figura 18*).



Figura 18 - Síntese de derivados do ácido cinâmico, a partir de monomalonatos.

O mecanismo proposto para a condensação de Knoevenagel modificada por Verley-Doebner [152, 153], encontra-se descrito na *Figura 19.*

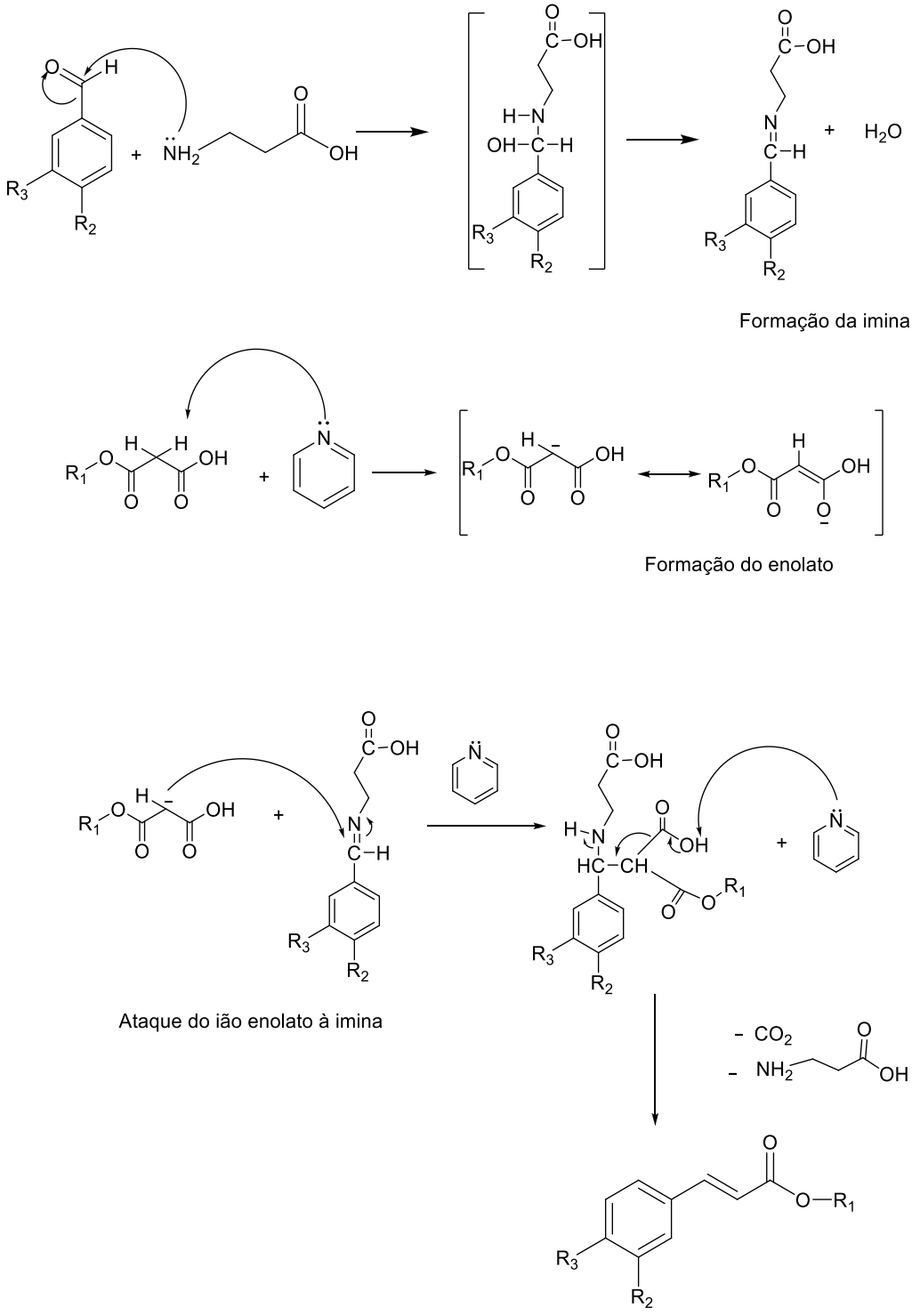


Figura 19 - Mecanismo de síntese da formação de cinamatos através da condensação de Knoevenagel modificada por Verley-Doebner.

4.2.1.1. Ácido clorogénico e seus ésteres

O ácido clorogénico (CGA, *Figura 20),* é uma molécula que se encontra presente no café verde e, que devido às suas propriedades antibacterianas, terapêuticas e antioxidantes revela ter uma enorme aplicabilidade [154].

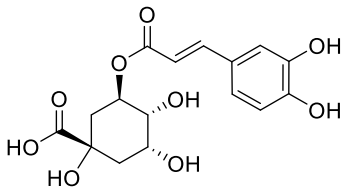


Figura 20 - Estrutura química do ácido clorogénico.

Como é possível observar pela sua estrutura química, este antioxidante derivado do ácido cafeico, é muito hidrofílico devido à presença de inúmeros grupos hidroxilo. De modo a aumentar a sua hidrofobicidade é possível proceder à sua esterificação com álcoois de cadeia alquílica linear de vários tamanhos, por catálise ácida ou enzimática *Figura 21*.

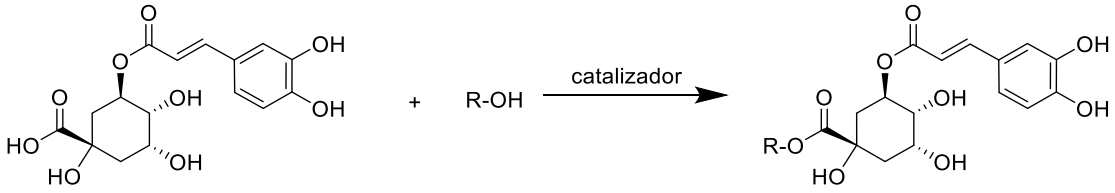


Figura 21 - Síntese dos ésteres derivados do ácido clorogénico.

4.2.1.2. Ácido diidrocafeico e seus ésteres

O ácido diidrocafeico (ácido 3-(3,4-diidroxifenil) propanoico) (*Figura 22*), é um metabolito obtido por hidrogenação do ácido cafeico, com potente propriedades antioxidantes [155]. Este composto foi encontrado nos fluidos humanos após ingestão de alimentos contendo ácido cafeico e ácido clorogénico e promove uma melhor função plaquetária, demonstrada em estudos com células humanas [155].

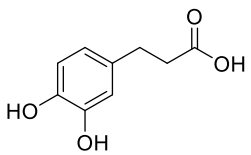


Figura 22 – Estrutura do diidrocafeico.

Neste caso, é também possível efetuar a síntese de ésteres do ácido diidrocafeico por esterificação enzimática com um álcool apropriado (*Figura 23*) e deste modo modular a hidrofobicidade deste antioxidante.

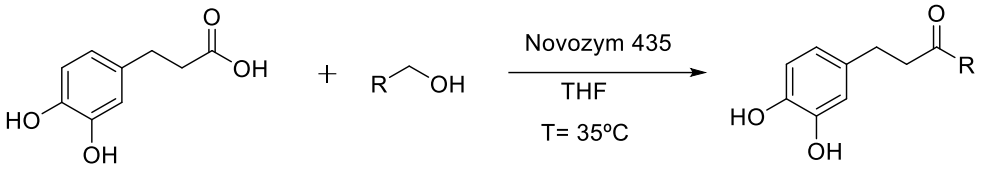


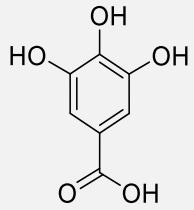
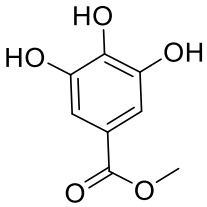
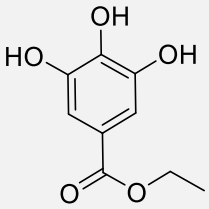
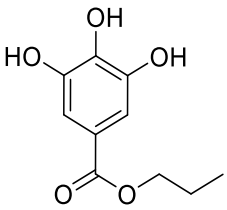
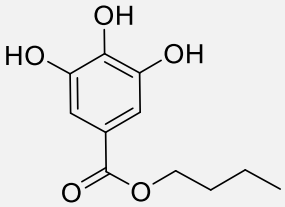
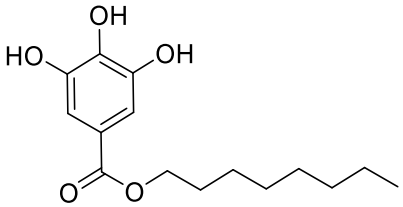
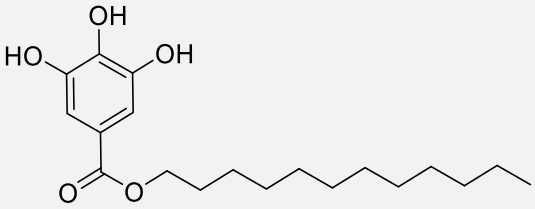
Figura 23 – Síntese dos ésteres do ácido diidrocafeico.

4.2.2. Ácido Gálico e seus ésteres

O ácido gálico (ácido 2,3,4-trihidroxibenzóico) é um composto fenólico de origem natural que se encontra igualmente distribuído nas plantas [156-158]. Na bibliografia encontra-se descrita a sua atividade anti-imunológica, anticarcinogénica e antioxidante [159-165]. A partir deste composto podem ser sintetizados por esterificação os ésteres galato de metilo, etilo, etc. Os galatos são substâncias que se utilizam como aditivos antioxidantes em cosméticos, alimentos e na indústria farmacêutica para prevenir a oxidação das gorduras [166], vitaminas, perfumes e óleos, evitando desta forma que adquiram um aspeto rançoso e um odor desagradável. Do ponto de vista químico, são ésteres de álcoois de cadeia linear do ácido gálico que se diferenciam entre si pela extensão da cadeia lateral. A esterificação permite melhorar a solubilidade do AG em gorduras e óleos [167].

Estes aditivos são comerciais e apresentam-se habitualmente sob a forma de sólidos cristalinos brancos ou branco-creme. No entanto, a sua utilização não está isenta de perigos para a saúde reconhecendo-se alguns efeitos secundários, como por exemplo reações alérgicas, principalmente nos asmáticos e em pessoas alérgicas ao ácido acetilsalicílico. A sua perigosidade é elevada para bebés e crianças e está proibida a respetiva utilização em alimentos específicos para essas faixas etárias. Na *Tabela 3*, encontram-se os galatos autorizados e mais utilizados como aditivos alimentares [168]. São aplicados essencialmente em banha, óleos e gorduras para fritar, óleos de peixe, entre outras. Deste modo é necessária a otimização da utilização destes aditivos de modo a serem utilizadas concentrações o mais baixas possível sem diminuir a sua eficácia antioxidante.

Tabela 3 - Estrutura química do ácido gálico e dos seus derivados fazendo referência aos galatos autorizados como antioxidantes [167, 168].

Nº E	Designação	Fórmula Química	Estrutura
	Ácido gálico (GA)	$C_7H_6O_5$	
	Galato de metilo (MG)	$C_8H_8O_5$	
	Galato de etilo (EG)	$C_9H_{10}O_5$	
E310	**Galato de propilo (PG)**	$C_{10}H_{12}O_5$	
	Galato de butilo (BG)	$C_{11}H_{12}O_5$	
E311	**Galato de octilo (OG)**	$C_{15}H_{22}O_5$	
E312	**Galato de dodecilo (LG)**	$C_{19}H_{30}O_5$	

4.2.3. Hidroxitirosol e seus ésteres

O hidroxitirosol (HT), (*Figura 24*), também conhecido como 3,4-dihidroxitirosol ou (2-(3,4-dihidroxifenil) etanol), é um composto orto-difenólico [169], hidrofílico que pode ser encontrado em azeitonas, azeite e folhas de oliveira [170]. É considerado um antioxidante poderoso devido à sua elevada capacidade de neutralização de radicais livres. Tem-se demostrado que o hidroxitirosol possui várias propriedades biológicas, despertando assim, o interesse deste antioxidante no que diz respeito à sua aplicabilidade farmacoterapêutica num vasto leque de patologias.

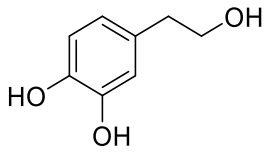


Figura 24 - Estrutura do Hidroxitirosol.

A atividade antioxidante é a propriedade mais estudada dos compostos fenólicos. As espécies reativas de oxigénio provenientes do *stress* oxidativo podem causar oxidação e dano celular em macrocélulas, e assim, contribuir para o desenvolvimento de doenças degenerativas, como a aterosclerose, cancro, diabetes, artrite reumatoide e outras doenças inflamatórias. A elevada eficiência antioxidante do hidroxitirosol possibilita a eliminação dos radicais livres durante os processos oxidativos, através da doação de um átomo de hidrogénio. Exerce ainda propriedades antimicrobianas, antiagregantes, vasodilatadoras, hipotensivas e hipoglicémicas [58, 171-174].

Em alimentos contendo lípidos, o hidroxitirosol tem mostrado um poder superior na proteção contra oxidação em comparação com o hidroxitolueno butilado (BHT) ou o α-tocoferol [175]. Assim, o interesse da indústria alimentar e farmacêutica em novos antioxidantes lipofílicos torna o desenvolvimento de ésteres de hidroxitirosol de cadeia longa bastante atraente [176].

Os ésteres do hidroxitirosol podem ser obtidos quer por esterificação enzimática com um ácido carboxílico, (*Figura 25*), quer por transesterificação enzimática com um éster metílico ou etílico do ácido (*Figura 26*).

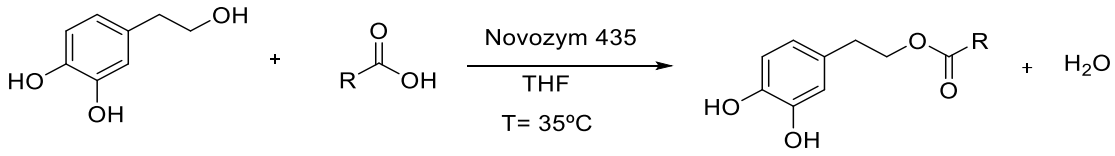


Figura 25 - Síntese dos ésteres derivados de hidroxitirosol de cadeia alquílica curta (C1-C8) a partir de hidroxitirosol e o ácido gordo.

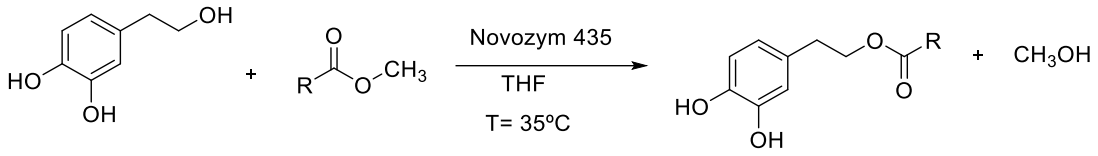


Figura 26 - Síntese dos ésteres de hidroxitirosol de cadeia alquílica longa a partir de hidroxitirosol e de um éster metílico.

Os ésteres do hidroxitirosol tem a particularidade de, ao serem hidrolisados in vivo, produzirem moléculas normalmente existentes na alimentação humana.

4.3. Avaliação da capacidade antioxidante

Os métodos para a avaliação da capacidade antioxidante dos compostos nos processos de autoxidação de materiais orgânicos são extremamente importantes quer na Biologia, quer em Química [127]. Vários métodos *in vitro* têm vindo a ser desenvolvidos com o intuito de avaliar esta capacidade antioxidante. Contudo, estes métodos muitas vezes têm baixa correlação com a real habilidade dos compostos para inibir a oxidação em alimentos, uma vez que embora avaliem a reatividade destes frente a radicais livres, muitas vezes não levam em conta numerosos fatores como sejam a localização física da molécula, o solvente e a sua interação com os componentes do alimento. Assim, o método de avaliação mais apropriado será aquele em que as condições de ensaio sejam o mais semelhante possíveis com o alimento onde vão ser utilizados os antioxidantes e às condições a que irá ser sujeito esse alimento.

Muitos ensaios utilizados para o estudo da capacidade antioxidante tentam acelerar o processo de oxidação normal para produzir resultados mais rapidamente.

A oxidação lipídica desenvolve-se inicialmente de modo lento e depois acelera em etapas posteriores durante o armazenamento. O período de indução (PI) é definido como o tempo para atingir um determinado nível de oxidação do lípido ou o fim da vida de prateleira [177]. O período de indução pode ser medido como o tempo necessário

para atingir um determinado nível de rancidez ou limite de aceitabilidade. Por exemplo, de acordo com a Legislação Portuguesa, para a maior parte dos óleos vegetais avaliados pelo índice de peróxidos o limite de aceitabilidade é de 10 meq / kg [178]. O tempo de indução também pode ser determinado como o tempo necessário para uma mudança repentina na velocidade de oxidação, estimada pela determinação do ponto de intersecção entre as velocidades iniciais e finais da oxidação (PI), *Figura 27*.

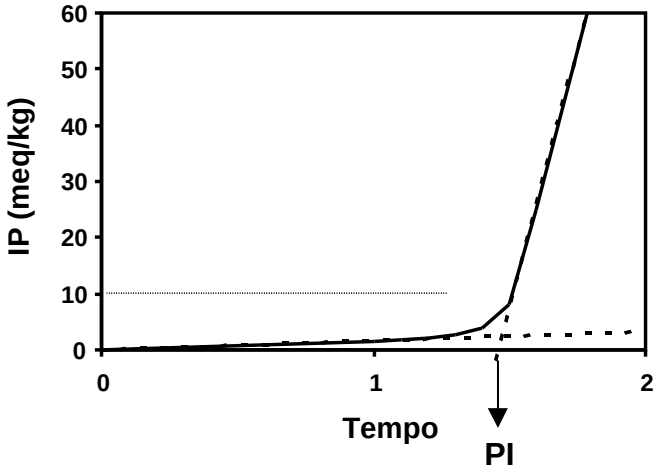


Figura 27 – Desenvolvimento de rancidez dos lipídios durante o armazenamento. O tempo de armazenamento é dado em valores arbitrários. IP = índice de peróxidos; PI = período de indução.

Para estimar a capacidade antioxidante num dado sistema contendo lípidos, amostras com e sem AOs são submetidas a um teste de oxidação acelerado sob condições padronizadas e é escolhido um ponto final adequado para determinar os níveis apropriados de deterioração oxidativa. A determinação do aumento no tempo necessário para que as amostras contendo as moléculas potencialmente antioxidante atinjam o limite de aceitabilidade relativamente às amostras sem essas moléculas, permite avaliar a capacidade antioxidante destas.

A aceleração do processo de oxidação pode ser efetuada pelo aumento da temperatura (40-140 ºC), pela adição de catalisadores metálicos (1-100 ppm), pelo aumento da pressão de oxigénio (3-165 psi) ou pela adição de substâncias iniciadoras de radicais [179]. A escolha do método mais apropriado e das condições de oxidação é crítica na interpretação dos resultados obtidos.

Como a velocidade de oxidação é exponencialmente relacionada com a temperatura, o prazo de validade de um lípido alimentar diminui logaritmicamente com o aumento da temperatura de armazenamento. No entanto, a temperatura é um fator

importante a ser considerado na avaliação da atividade antioxidante dos óleos alimentares, uma vez que o mecanismo de oxidação muda com a temperatura. Assim, os diferentes hidroperóxidos decompõem-se a velocidades diferentes a temperaturas diferentes, alterando o tipo e concentração dos produtos da oxidação. Por outro lado, a temperaturas elevadas, as reações de polimerização e de ciclização tornam-se também importantes, embora não sejam significativas para as temperaturas normais de armazenamento. Do mesmo modo, à temperatura ambiente, a velocidade de oxidação lipídica é independente da pressão de oxigénio, mas a altas temperaturas, a velocidade da oxidação lipídica torna-se dependente da pressão de oxigénio porque a solubilidade deste diminui e torna-se limitante durante o progresso da reação. De realçar que a contaminação por metais também aumenta com o aumento da temperatura.

Assim, os resultados dos testes de estabilidade a alta temperatura podem ser enganadores na avaliação da eficácia dos antioxidantes. Normalmente, a sua eficácia aumenta à medida que a temperatura diminui e, por vezes, a atividade pró-oxidante de alguns antioxidantes pode ser promovida a altas temperaturas. O Schaal Oven teste usa as condições mais brandas dentro dos testes acelerados (temperaturas até 60ºC) (*Tabela 4*) , correlacionando-se bastante bem com os tempos de prateleira reais. Vários estudos mostram que não há alterações significativas dos mecanismos de oxidação quando este teste é efetuado a temperaturas até aos 60 ºC [180]. É um método simples, podendo exigir, no entanto, e apesar da aceleração provocada pela temperatura, longos períodos de ensaio.

Tabela 4 – Testes de oxidação acelerada, retirado de [180].

Teste	Condições	Caraterísticas
Ambiente de armazenagem	Temperatura ambiente, pressão atmosférica	Muito moroso
Luz	Temperatura ambiente, pressão atmosférica	Mecanismo diferente
Catalisadores metálicos	Temperatura ambiente, pressão atmosférica	Mais decomposição
Método ganho de peso	30 – 80ºC, pressão atmosférica	Ponto final questionável
Teste do forno de Schaal	20 – 60ºC, pressão atmosférica	Menor quantidade de problemas
Consumo de oxigénio	80 – 100 ºC, pressão atmosférica	Mecanismo diferente
Bomba de oxigénio (ASTM)	99 ºC, 65-110 psi O_2	Mecanismo diferente
Oxigénio ativo (AOM)	98 ºC,	Mecanismo diferente
Rancimato	110-140 ºC	Ponto final questionável, mecanismo diferente

4.3.1. Capacidade antirradicalar - Método de DPPH [126]

Uma vez que um dos objetivos deste trabalho é tentar correlacionar a atividade antioxidante em emulsões com a sua localização, será importante avaliar a reatividade dos antioxidantes em meios homogéneos, ou seja, verificar se os compostos dentro de uma mesma família independentemente da sua lipossolubilidade têm reatividade semelhante, desde que não existam limitações de solubilidade destes no meio em que será efetuado o teste. Só deste modo, poderá ser afirmado posteriormente que havendo diferenças na sua atividade antioxidante, esta diferença são devidas à diferente localização dos AOs no sistema em estudo.

Os ensaios mais frequentemente utilizados para avaliar a capacidade antirradicalar de moléculas baseiam-se na medida da variação de absorvância ou fluorescência de soluções contendo uma substância oxidante corada, que ocorre quando esta reage com a molécula de antioxidante. A medida é feita geralmente após um determinado tempo de reação em que se considera que foi atingido o equilíbrio. Um exemplo destes ensaios é o teste do DPPH onde é empregue o radical corado 2,2-difenil-1 -picril-hidrazilo como oxidante, *Figura 28 [125]*.

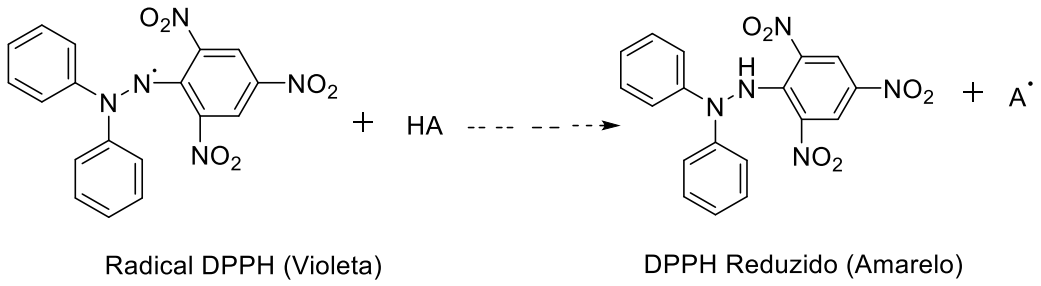


Figura 28 - Reação do DPPH$^{\bullet}$ com o antioxidante.

Este tipo de ensaio tem, no entanto, vários inconvenientes. Em primeiro lugar o resultado é dado após ser atingido o equilíbrio e não é dada informação sobre a cinética da reação com o radical. Em segundo lugar, este teste é efetuado em meios aquosos ou em outros solventes próticos que podem não ser representativos do meio onde posteriormente a molécula será utilizada como antioxidante. Assim, não só a cinética da reação como o mecanismo da mesma pode variar, dependendo do solvente utilizado (*Ver ponto 4.1.1*).

Deste modo, este teste não permite avaliar se uma molécula é ou não capaz de interromper as reações de autoxidação e apenas fornece informação sobre a reatividade das moléculas frente ao radical DPPH•, quando sujeitas às mesmas condições de ensaio. Como este valor depende do tempo de reação, do solvente utilizado e da temperatura do ensaio, um valor único por si só não tem grande significado a não ser que várias moléculas sejam testadas nas mesmas condições, se possível, no mesmo ensaio. Os resultados deste teste são expressos normalmente como EC_{50}, definido como a concentração do potencial AO necessária para diminuir a absorção inicial da solução de DPPH• em 50%.

Devido à semelhante configuração eletrónica entre o radical DPPH• e os radicais peróxilo, as constantes de reação entre os dois radicais e os potenciais AO, embora com ordem de grandeza diferentes, têm normalmente a mesma ordem de reatividade desde que as reações sejam efetuadas em meios semelhantes. Deste modo, o método é utilizado para fazer uma avaliação preliminar da ordem de reatividade de várias moléculas, num meio prótico (metanol) e onde todas são solúveis.

No caso concreto do presente trabalho, o teste foi efetuado com o intuito de verificar a não existência de alterações na reatividade dos compostos frente ao radical DPPH• com a introdução das cadeias alquílicas. Também foi tido em conta o facto de que, devido a presença de uma região aquosa e de uma interface contendo vários grupos polares com capacidade para efetuar pontes de hidrogénio com o antioxidante, o mecanismo pelo qual o antioxidante reage com os radicais livres em emulsões deverá ser semelhante ao observado neste teste de DPPH•.

4.3.2. Determinação do primeiro potencial anódico

Dos diversos métodos eletroquímicos, tais como a potenciometria, a titulação potenciométrica, a eletrogravimetria, a coulometria e a condutimetria, a voltametria é, possivelmente, a técnica mais versátil para o estudo das propriedades de sistemas redox. A voltametria é um método eletroanalítico que mede a corrente em função de um potencial aplicado a um elétrodo de trabalho, sendo medida a corrente na célula eletrolítica sob condições de completa polarização da concentração. Assim, a velocidade de oxidação ou redução do analíto é limitada pela velocidade de transferência de massa do analíto para a superfície do elétrodo [181].

Para a realização da voltametria cíclica (VC), utiliza-se uma célula com três elétrodos. Os elétrodos são conectados a um potencióstato, acoplado a um gerador de ondas, que irá fazer variar uma diferença de potencial entre o elétrodo de trabalho e o elétrodo de referência a uma velocidade constante [182]. O elétrodo auxiliar irá fornecer a corrente para o elétrodo de trabalho, de forma que praticamente não passe nenhuma corrente pelo elétrodo de referência, possibilitando que o seu potencial se mantenha constante [182]. Assim, o potencial aplicado ao elétrodo de trabalho varia de forma cíclica entre dois valores. Primeiro aumenta linearmente com o tempo até a um valor máximo, após o qual ocorre inversão do varrimento e o potencial diminui, sendo percorrido o caminho inverso até chegar ao potencial final, que pode ser o mesmo valor do potencial inicial ou outro pré-estabelecido [182]. A escolha do tipo de elétrodo de trabalho, do solvente e do eletrólito de suporte depende da gama de potencial que se pretende estudar.

Uma vez que os antioxidantes podem agir doando eletrões diretamente às espécies reativas de oxigénio, funcionando como agentes redutores, a avaliação do potencial de oxidação dos compostos através da VC pode refletir a sua capacidade antioxidante [183-187]. Para o estudo de agentes redutores, o potencial deve ser aplicado no sentido negativo para o positivo, apenas sendo analisada a corrente anódica [182, 188]. Dessa forma, os antioxidantes transferem os seus eletrões a um potencial específico para o elétrodo de trabalho, que se apresenta com carga positiva, registando picos de corrente anódica no voltamograma. Quando a região próxima da superfície do elétrodo de trabalho fica desprovida de compostos passíveis de se oxidarem, observa-se a diminuição da corrente. O potencial do pico anódico (*Epa*) é determinado pelo potencial redox do composto analisado e quanto menor o valor de *Epa* de um composto, maior é sua capacidade de doar eletrões. A correlação entre o perfil antioxidante e as propriedades redox de antioxidantes de baixo peso molecular está bem estabelecida [189]. A voltametria cíclica tem sido utilizada como uma ferramenta importante para a avaliação da capacidade antioxidante deste tipo de antioxidantes. Compostos com potenciais de oxidação baixos são mais facilmente oxidados e geralmente apresentam melhores atividades antioxidantes. *Galato et all* [190], determinaram a capacidade antirradicalar de vários compostos fenólicos frente ao radical superóxido e compararam esta capacidade com os potenciais de oxidação determinados por VC observando que quanto maior o número de hidroxilos ligados ao anel aromático dos compostos analisados, menor era o potencial de oxidação e maior era sua atividade antirradicalar.

4.3.3. Teste da estufa de Schaal (“Schaal Oven Test”)

O teste da estufa (“Schaal Oven Test”) é um dos métodos mais utilizados na avaliação da capacidade antioxidante uma vez que utiliza condições de ensaio o mais semelhante possível às condições a que o alimento será sujeito. Neste teste, as amostras de alimento (óleo, emulsão, etc), contendo diferentes antioxidantes a uma mesma concentração são submetidas a temperaturas até 60 ºC, e o seu estado de oxidação é examinado a intervalos de tempo regulares, mediante a avaliação sensorial ou da medida do conteúdo nos produtos da oxidação [191, 192]. As alterações primárias podem ser avaliadas através da quantidade de hidroperóxidos (ex. teste dos dienos conjugados) e as alterações secundárias pela formação de compostos carbonílicos, monaldeído e outros aldeídos, entre outros (ex. teste da *p* –anisidina) [193]. Os resultados fornecidos por este teste apresentam normalmente boa correlação com a avaliação efetuada nas condições normais de armazenamento dos óleos e gorduras [83, 194]. Este método tem vindo mais recentemente a ser aplicado a emulsões [195].

4.4. Eficácia antioxidante em sistemas emulsionados

A reatividade química dos antioxidantes frente aos radicais livres, tem sido estudada durante décadas em meios homogéneos (água e óleo), sendo que o seu principal mecanismo de ação nos referidos meios já são razoavelmente conhecidos, estando a relação de estrutura-reatividade nestes meios relativamente bem estabelecida.

No entanto a reatividade química do antioxidante não é o único parâmetro que afeta a sua eficácia em sistemas emulsionados, já que nestes sistemas a distribuição dos antioxidantes entre as regiões oleosa, aquosa e interfacial desempenha um papel muito importante [60, 105, 196, 197]. A observação fenomenológica de que os antioxidantes polares são mais eficazes em óleos puros do que os não-polares, enquanto, ao contrário, os apolares são mais eficazes em sistemas emulsionados do que os polares foi denominada por *Porter [198]* por “ Paradoxo Polar “ há mais de três décadas. Estas diferenças observadas na eficácia dos antioxidantes foram explicadas pelas suas afinidades à interface ar-óleo, ao óleo e à interface O/A das emulsões (*Figura 29*), sem que fosse conseguido verificar este fenómeno experimentalmente.

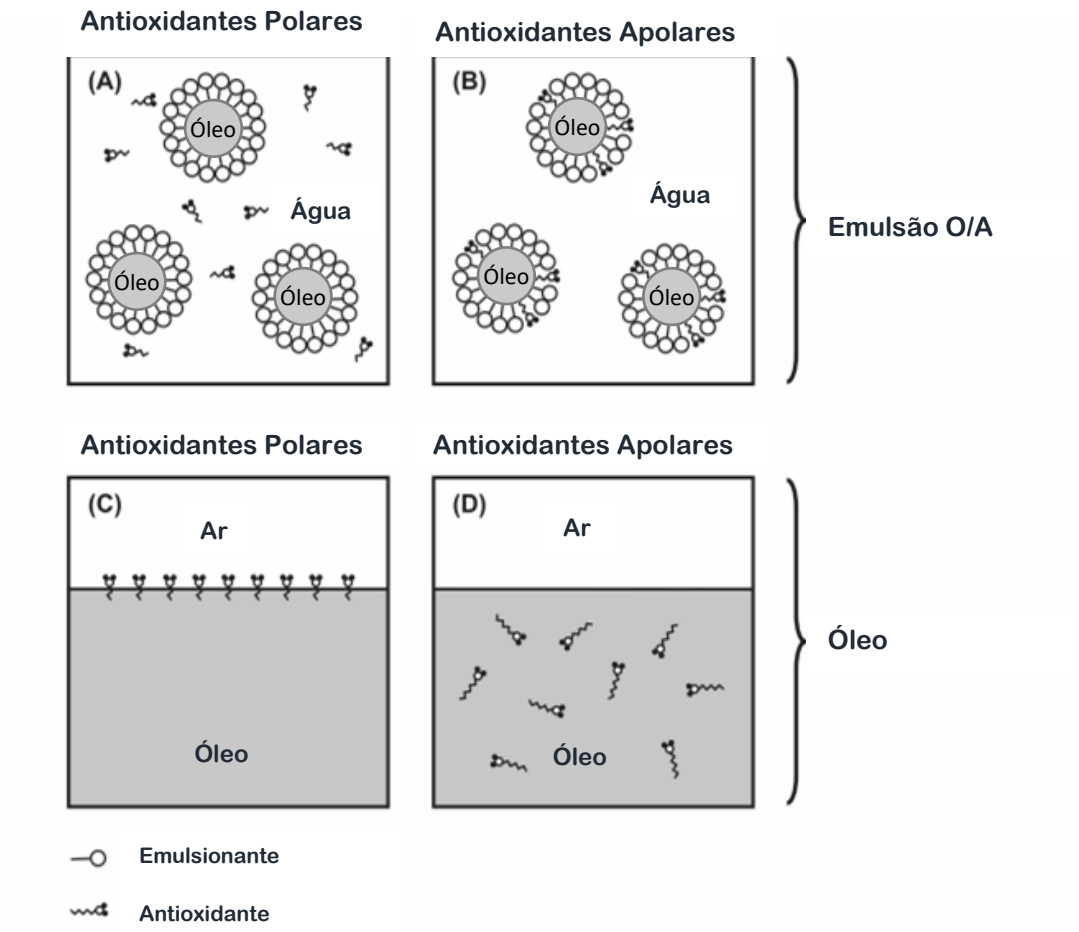


Figura 29 – Efeito e localização de antioxidantes polares e apolares em emulsões de óleo em água e em óleo. Adaptado de: Laguerre, et al [199].

Estas observações experimentais foram no entanto confirmadas em diferentes estudos em sistemas emulsionados, verificando-se que um aumento na lipofilicidade da molécula aumentava a sua eficácia do AO [60, 79].

A teoria do paradoxo polar implicava uma relação linear entre a hidrofobicidade e a capacidade antioxidante, no entanto, estudos recentes [58, 59, 61, 136, 200-203], sobre os efeitos da lipofilização de antioxidantes em relação à sua eficácia, mostram que a eficácia dos antioxidantes que possuam o mesmo grupo funcional (anel fenólico) mas diferente hidrofobicidade, aumenta à medida que a lipossolubilidade aumenta até que um valor máximo seja alcançado, a partir do qual, o aumento na hidrofobicidade leva a uma diminuição na eficiência antioxidante. A este fenómeno denominou-se “efeito cut-off” .

Vários investigadores tentaram relacionar a eficácia antioxidante com algumas propriedades físico-químicas dos AOs, tais como a tensão superficial, os seus

coeficientes de difusão, ou ainda a possibilidade de auto-agregação (micelas) no meio aquoso [59, 61]. No entanto, nenhuma dessas tentativas foi conclusiva, pelo que, os esforços de investigação continuaram no sentido de compreender o efeito cut-off observado.

Parte dos problemas que surgem para interpretar os resultados obtidos e estabelecer correlações estrutura-eficácia em sistemas emulsionados reside na falta de métodos adequados para a determinação da distribuição de antioxidantes em emulsões, sendo este um fator crítico na interpretação dos resultados experimentais.

Têm sido efetuadas enumeras tentativas para determinar a distribuição dos antioxidantes em emulsões alimentares modelo, tendo a maioria dos métodos requerido o isolamento das regiões aquosa e oleosa, com posterior análise da concentração de antioxidante em cada uma das regiões [79, 80, 204-208]. No entanto, a quebra da emulsão implica que se modifiquem os equilíbrios dos reagentes entre as diferentes regiões da emulsão, pelo que não fornecem resultados confiáveis.

Em sistemas binários, na ausência de emulsionante, a distribuição de um soluto entre duas fases imiscíveis (genericamente óleo e água) é avaliada quantitativamente a partir da sua constante de partição P_A^O (coeficiente adimensional das concentrações do antioxidante em cada fase), sendo AO_O a concentração do antioxidante na fase oleosa, e AO_A a concentração de antioxidante na fase aquosa [208-212]:

$$P_A^O = \frac{AO_O}{AO_A} \quad (20)$$

No entanto, a distribuição de um soluto em sistemas multifásicos [79] é muito mais complexa que num sistema binário. A determinação das constantes de partição e da atividade antioxidante dos compostos em emulsões é uma tarefa complexa porque o emulsionante cria uma nova região, a região interfacial, entre as regiões oleosa e aquosa (fases continuas). Por este motivo, os antioxidantes e outros componentes da emulsão distribuem-se entre as três regiões mencionadas. Para se definir a distribuição de um antioxidante ou de outros componentes numa emulsão composta pelas regiões interfacial, aquosa e oleosa, *Figura 30*, é necessário ter duas constantes de partição: a correspondente às regiões oleosa e interfacial, P_O^I , e a outra entre as regiões aquosa e interfacial, P_A^I. Assim o quociente P_A^O, constante de partição, será dado por [31, 105, 211, 213-216]:

$$\boldsymbol{P_A^O = \frac{P_A^I}{P_O^I} = \frac{(AO_I)/(AO_A)}{(AO_I)/(AO_O)} = \frac{(AO_O)}{(AO_A)}}$$

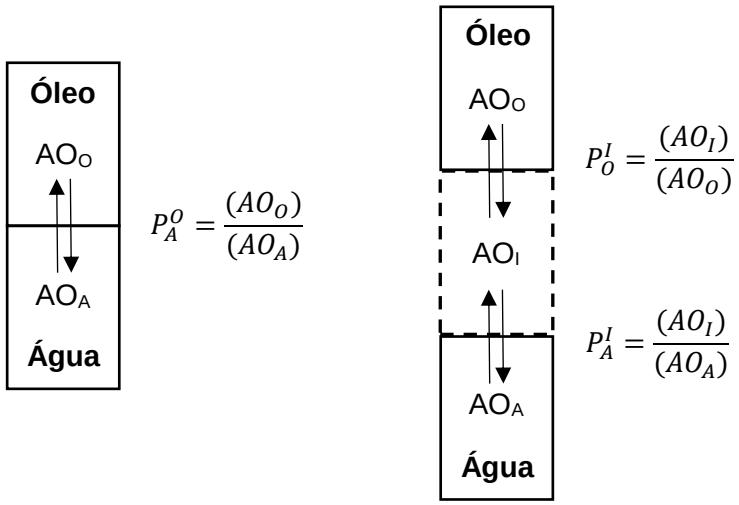


Figura 30 - Representação esquemática da partição de um antioxidante (AO) numa mistura binária (esquerda) e num sistema multifásico (direita).

A região interfacial não pode ser fisicamente separada das outras duas regiões, o que significa que P_O^I e P_A^I não podem ser determinadas independentemente a partir da determinação da concentração do antioxidante em cada uma das regiões [204, 217, 218]. Deste modo, a determinação da distribuição de antioxidantes em emulsões requer que a determinação das constantes de partição seja feita na própria emulsão.

A medição da concentração de antioxidantes nas regiões aquosa e oleosa pode ser utilizada para estimar P_A^O mas esta aproximação não fornece informação acerca da concentração do antioxidante na região interfacial [79, 204, 206, 208, 218]. De um modo geral, pode-se afirmar que os solutos se distribuem entre duas regiões de acordo com a sua afinidade com estas e a fração de moléculas que se encontra numa determinada região depende de certos fatores tais como: acidez [219], temperatura [220, 221], a composição e natureza das regiões [222-225], etc.

Sanchez *et al*. [214] desenvolveram um método cinético para estimar as constantes de partição de antioxidantes entre as regiões oleosa e interfacial e entre as regiões aquosa e interfacial de emulsões opacas, que não requer o isolamento de fases [75,76,78]. Este método baseia-se no modelo da pseudofase para microemulsões termodinamicamente estáveis e utiliza a reação entre catiões hexadecilbenzenodiazonio, 16-ArN_2^+, e os antioxidantes [211, 213, 214, 226-230].

4.5. Uso de sal arenodiazónio como sonda química para a determinação da distribuição dos AO em sistemas emulsionados

Os sais arenodiazónio, $ArN_2^+X^-$, podem-se obter de forma relativamente simples, pela ação do ácido nitroso com uma amina primária, *Figura 31*.

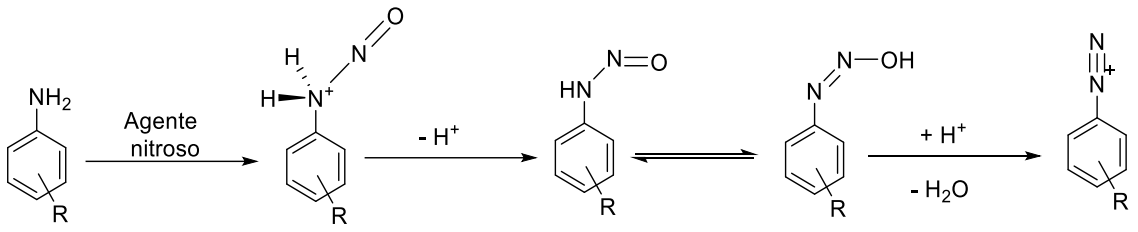


Figura 31 - Obtenção dos iões arenodiazónio.

Tanto as aminas primárias alifáticas como aromáticas reagem de forma fácil e rapidamente com um elevado número de agentes nitrosos dando lugar à formação de uma N-nitrosamina instável que evolui para a formação do sal diazónio correspondente, reação que se domina por reação de diazotização.

Os iões arenodiazónio apresentam um carácter eletrofílico devido á presença do grupo - N_2^+, comportando-se como um ácido de Lewis, reagindo com nucleófilos (bases de Lewis, Nu^- ou NuH seguida de perda de protão) no azoto **β** do grupo - N_2^+, para dar aductos covalentes do tipo ArN_2-Nu, *Figura 32*. Exemplos destes aductos são os corantes azoicos [227, 231-233] (C- acopulamento) [234] ou a formação de diazo-éteres (O- acopulamento [235]).

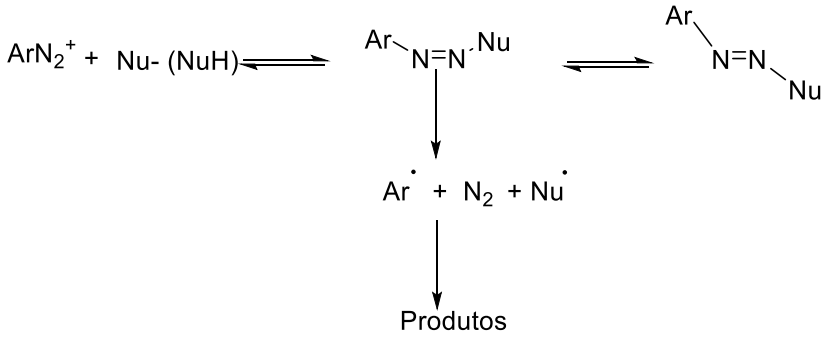


Figura 32 – Mecanismo de reação de adição nucleófila a iões $ArN_2^{+\cdot}$ levando á formação de aductos Ar – N═N – Nu na conformação (*Z*) que se encontra e equilíbrio com o isómero (*E*).

Os aductos formados podem ser estáveis (conformação *E*), ou pelo contrário podem ser quebrados homoliticamente resultando em processos de redução que ocorre através de diferentes mecanismos.

Os iões ArN_2^+ são relativamente instáveis e decompõem-se espontaneamente em meio aquoso através da formação, na etapa limitante da reação, de um carbocatião muito instável que reage imediatamente com os nucleófilos presentes na sua esfera de solvatação, mecanismo $D_N + A_N$, *Figura 33*.

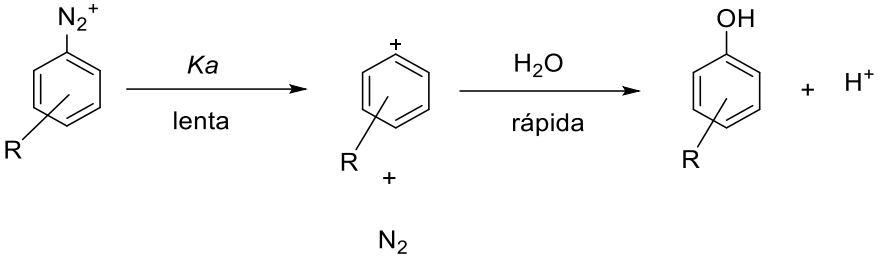
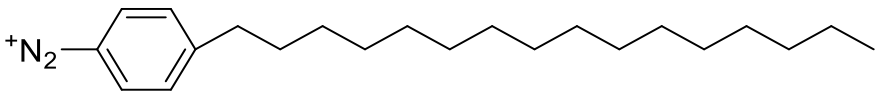


Figura 33 – Mecanismo DN + AN, para a decomposição de sais arenodiazónios em meio aquoso.

Os iões arenodiazónio ArN_2^+ tem características especiais que os tornaram úteis como sondas químicas na caracterização de interfaces coloidais. Algumas dessas características são as seguintes:

- ✓ Pode-se preparar um elevado número de iões ArN_2^+ a partir de aminas comerciais adaptando-se às necessidades particulares de cada caso. No presente trabalho sintetizou-se o iões ArN_2^+ hidrofóbico (ião 4-hexadecilbenzenodiazónio ,16-ArN_2^+) que tem a particularidade de ser insolúvel na água e no óleo, situando-se o grupo reativo na região interfacial dos sistemas emulsionados utilizados.



Ião 4- Hexadecilbenzenodiazónio (16-ArN_2^+)

- ✓ Os iões arenodiazónio (ArN_2^+) reagem, virtualmente, com todos os nucleófilos orgânicos e inorgânicos, podendo os produtos da reação ser facilmente detetados e identificados por técnicas como por exemplo a cromatografia [226, 229, 236, 237].

- ✓ Em particular, os iões ArN_2^+ reagem com moléculas que possuem grupos – OH na estrutura (como os antioxidantes), o que os torna potenciais candidatos como sonda química na determinação da distribuição dos antioxidantes. O mecanismo de reação depende do tipo de substituinte no anel aromático, do tipo de nucleófilo, da natureza do solvente, do pH, da presença ou ausência de catalisador, da luz, etc.

- ✓ A velocidade da reação de decomposição dos iões ArN_2^+ em solução aquosa é normalmente insignificante em comparação com a reação destes com os antioxidantes.

- ✓ As reações, podem ser estudadas utilizando-se técnicas usuais em cinética química como as espectroscópicas, cromatográficas ou eletroquímicas.

A cinética e o mecanismo de reação de iões ArN_2^+ com antioxidantes fenólicos, tem vindo a ser estudados. Verificou-se nestes estudos que o hidroxitirosol, o ácido gálico e o galato de metilo, reagem através de uma reação de acoplamento O produzindo diazo-éteres do tipo Ar – N = N – O – Ar ′ [231]. Na *Figura 34* encontra-se como exemplo a reação entre os iões-metilbenzenodiazonio (3MBD) e o antioxidante hidroxitirosol (HT) [227].

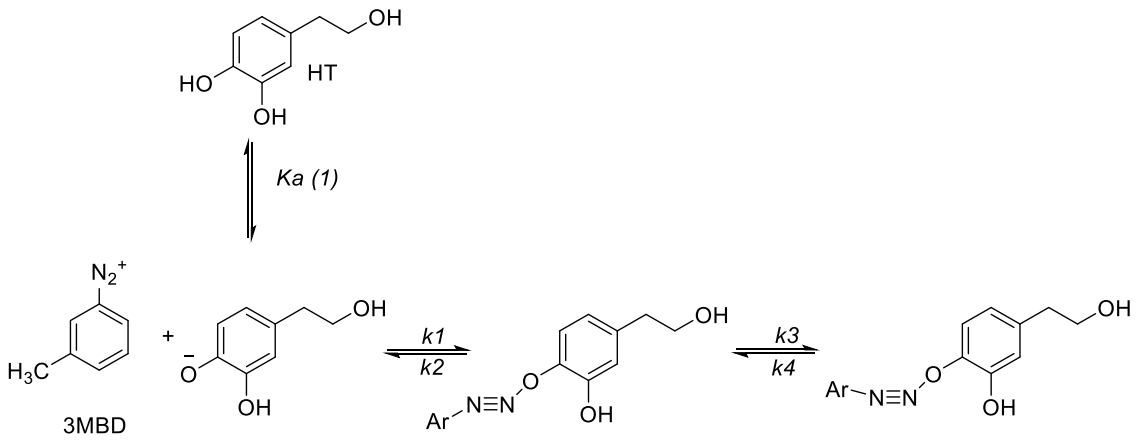


Figura 34 – Mecanismo de reação entre o 3MBD e o hidroxitirosol (HT), adaptado de Dudzik *et al* [227].

De acordo com a literatura, o mecanismo de reação entre o 3MBD e os antioxidantes estudados divide-se em duas etapas de equilíbrio, que implica a formação reversível de um (Z)-diazo-éter instável posteriormente isomerização com a formação do isómero (E) mais estável [227].

No entanto, o mecanismo pelo qual os AOs reagem com o sal arenodiazónio e o conhecimento dos produtos da reação podem não ser relevantes na utilização dos sais arenodiazónios como sondas químicas desde que seja possível quantificar a quantidade de sonda que não reage.

5. Modelo Cinético da Pseudofase (MCP)

O modelo cinético da pseudofase (MCP), na sua conceção original [238-242], foi desenvolvido para sistema micelares e basicamente, pressupõe a existência de duas pseudofases distintas *(Figura 35)*: a pseudofase micelar e a pseudofase aquosa.

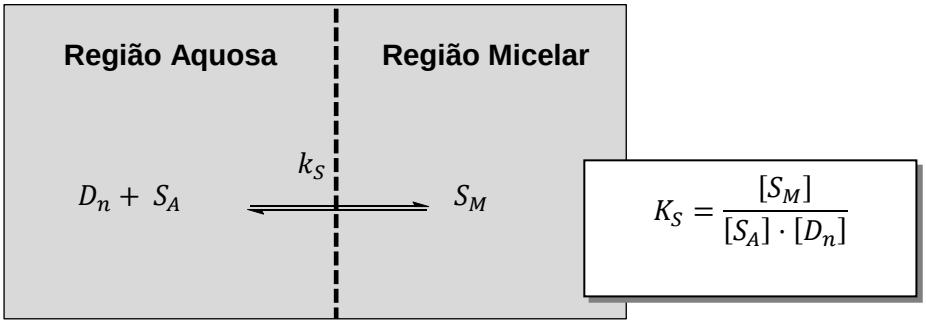


Figura 35 - Esquema básico das duas pseudofases que compõem um sistema micelar D_n=[Emulsionante total]-CMC, representa a concentração de emulsionante micelizado, S é a substância.

Qualquer substância que estiver presente no sistema micelar irá distribuir-se entre as referidas pseudofases de acordo com o valor da energia livre de Gibbs de transferência, ΔG_T^0, normalmente expressa em termos da constante de distribuição ou associação da substância ao agregado micelar, K_S. Este modelo pressupõe que a distribuição de substâncias neste sistema é rápida na escala de tempo da sua reatividade química, o que na prática implica considerar que, no caso de existir alguma reação química, neste sistema os reagentes encontram-se em equilíbrio dinâmico durante o percurso da mesma. Como consequência, a reação pode ocorrer em ambas as pseudofases, sendo a velocidade global da reação a soma das velocidades em cada região.

Neste trabalho aplicaram-se as ideias básicas do modelo cinético da pseudofase (MCP) a sistemas emulsionados.

No entanto, a aplicação do MCP a sistemas emulsionados pressupõe as seguintes hipóteses [31, 214, 220, 221, 225, 243]:

- A velocidade de reação que ocorre entre duas substâncias nas diferentes regiões da emulsão (oleosa, aquosa e interfacial) não esta limitada pela velocidade de transporte entre as referidas regiões. Esta hipótese supõe, na prática, considerar que os antioxidantes se encontram em equilíbrio dinâmico durante o decorrer de qualquer reação química a que estejam sujeitos.
- A distribuição de uma substância entre as várias regiões da emulsão encontram-se em equilíbrio termodinâmico e só depende da sua solubilidade relativa em cada uma delas (sempre e quando não se atinja o limite de solubilidade) e é independente de a emulsão ser O/A ou A/O e do tamanho das gotas que compõem a emulsão.

Assim, a distribuição de uma substância num sistema emulsionado, como por exemplo de um antioxidante, descreve-se através de duas constantes de partição, uma entre as regiões oleosa-interfacial, P_O^I, e a outra entre as regiões aquosa-interfacial, P_A^I [243], definidas através do quociente entre as concentrações do antioxidante nas várias regiões, como mostram as equações *21 e 22*:

$$P_O^I = \frac{[AO_I]}{[AO_O]} \quad \textbf{(21)}$$

$$P_A^I = \frac{[AO_I]}{[AO_A]} \quad \textbf{(22)}$$

onde os parêntesis retos indicam concentrações em moles por litro no volume da região considerada, e os índices I, O, A representam as regiões interfacial, oleosa e aquosa, respetivamente. Assumindo que todo o emulsionante utilizado se encontra na interface, os valores numéricos dos volumes destas regiões são idênticos aos valores numéricos dos volumes de óleo, água e emulsionante utilizados na preparação da emulsão.

De modo a ser possível aplicar o MCP na determinação da distribuição dos antioxidantes, utilizou-se a reação entre os iões 4- hexadecilbenzenodiazónio (16-ArN_2^+) e os antioxidantes (*Figura 36*).

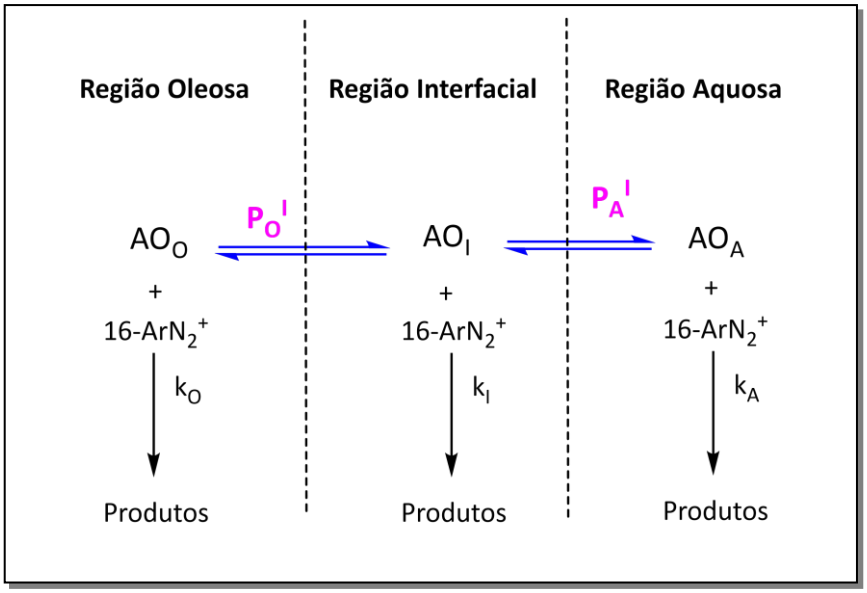


Figura 36 - Representação básica das três regiões de uma emulsão que contém um substrato AO cuja distribuição vem definida pelas constantes de partição $\mathbf{P_O^I}$ **e** $\mathbf{P_A^I}$.

De acordo com o modelo cinético, a velocidade da reação das duas substâncias, neste caso entre os iões $16\text{-}ArN_2^+$ e o antioxidante, *Figura 36*, pode expressar-se pelo somatório das velocidades da reação em cada uma das regiões da emulsão, como mostra a *equação 23*:

$$v = k_I \cdot \left[16 - ArN_2^+{}_T\right] \cdot [AO_T] =$$

$$= k_O \cdot \left[16 - ArN_2^+{}_O\right] \cdot [AO_O] \cdot \Phi_O + k_I \cdot \left[16 - ArN_2^+{}_I\right] \cdot [AO_I] \cdot \Phi_I + k_A \cdot \left[16 - ArN_2^+{}_A\right] \cdot [AO_A] \cdot \Phi_A \quad \textbf{(23)}$$

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

Devido ao facto de terem uma cadeia longa hidrófoba e de serem ao mesmo tempo catiões, os iões $16\text{-}ArN_2^+$ são insolúveis tanto em água como em óleo pelo que se distribuem preferencialmente na região interfacial da emulsão, sendo a sua concentração nas regiões oleosa e aquosa desprezável. Em consequência, a reação

dos iões 16-ArN_2^+ com o AO terá lugar preferencialmente na região interfacial [244, 245] (*Figura 37*).

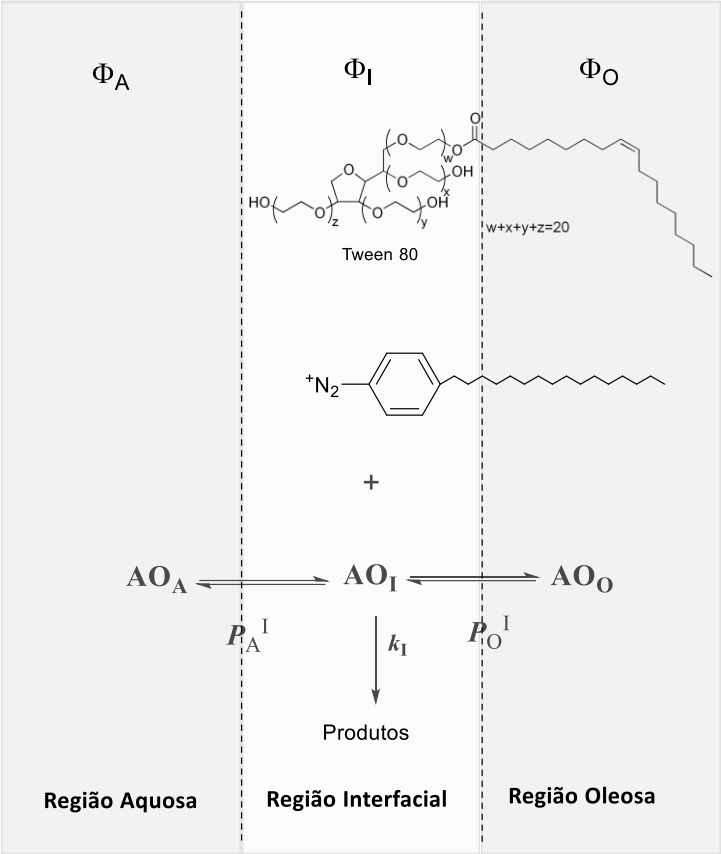


Figura 37 - Representação esquemática de uma emulsão: Φ indica a fração de volume para cada uma das regiões, AO é o antioxidante, P é a constante de partição, k_I é a constante de velocidade para a reação dos iões 16-ArN_2^+ na interface e os índices O, I e A referem-se às regiões orgânica, interfacial e aquosa, respetivamente.

Deste modo a *equação 23* pode ser simplificada à *equação 24*:

$$v = k_2 \cdot \left[16 - ArN_2^+{}_T\right] \cdot [AO_T] = k_I \cdot \left[16 - ArN_2^+{}_I\right] \cdot [AO_I] \cdot \Phi_I \quad \textbf{(24)}$$

A fração de volume de emulsionante é dada pela *equação 25*:

$$\Phi_I = \frac{V_I}{V_O + V_I + V_A} \quad \textbf{(25)}$$

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

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

$$\Phi_O + \Phi_I + \Phi_A = 1 \quad (26)$$

O balanço de massas do antioxidante e dos iões arenodiazónio é dado pelas *equações 27* e *28:*

$$[AO_T] = \Phi_O[AO_O] + \Phi_I[AO_I] + \Phi_A[AO_A] \quad (27)$$

$$\left[16 - ArN_2^+{}_T\right] = \Phi_I\left[16 - ArN_2^+{}_I\right] \quad (28)$$

Combinando as *equações 21, 22,* e *27*, chega-se à seguinte expressão:

$$[AO_I] = [AO_T] \cdot \frac{P_O^I P_A^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_O^I P_A^I + \Phi_A P_O^I} \quad (29)$$

Combinando as *equações 24,28 e 29* e tendo presente que se trabalha em condições de pseudo-primeira ordem ($[AO_T]$ >>> $[16\text{-}ArN_2^+]$), a constante de velocidade observada virá dada pela *equação 30*.

$$k_{obs} = k_I[AO_T] = k_I[AO] = \frac{[AO_T]k_I P_A^I P_O^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_A^I P_O^I + \Phi_A P_O^I} \quad (30)$$

Matematicamente, a *equação 30* é equivalente á *equação 31*, e o inverso de k_{obs} corresponde à *equação 32*, onde a e b vêm dados pelas *equações 33* e *34*:

$$k_{obs} = a/(1+b\ \Phi_I) \quad (31)$$

$$1/k_{obs} = 1/a + b/a\,\Phi_I \quad (32)$$

$$b = \frac{P_A^I P_O^I (1 + \Phi_A/\Phi_O)}{P_A^I + \Phi_A/\Phi_O\, P_O^I} - 1 \quad (33)$$

$$a = \frac{[AO_T]k_I P_A^I P_O^I (1+\Phi_A/\Phi_O)}{P_A^I+\Phi_A/\Phi_O P_O^I} \quad \textbf{(34)}$$

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

Como se pode observar, a *equação 33* contém unicamente as constantes de partição e a *equação 34* contém, para além das constantes de partição, a constante de velocidade na interface k_I que não se pode determinar independentemente. Como consequência, as constantes de partição P_O^I e P_A^I podem obter-se a partir da *equação 33* de duas maneiras distintas:

- A partir de dois valores de **b**, para assim se resolver um sistema de duas equações a duas incógnitas, as quais são precisamente estas constantes de partição. Os valores de **b** podem obter-se a partir do estudo das variações de k_{obs} em função de Φ_I, para pelo menos dois valores distintos de razão $\frac{\Phi_A}{\Phi_O}$.
- A partir do valor experimental de P_A^O e de um só valor de b. O quociente das constantes de partição P_O^I e P_A^I, *equações 21* e *22*, representa o valor da constante de partição entre as fases aquosa e oleosa (P_A^O), *equação 35*.

$$P_A^O = \frac{P_A^I}{P_O^I} = \frac{[AO_I]/[AO_A]}{[AO_I]/[AO_O]} = \frac{[AO_O]}{[AO_A]} \quad \textbf{(35)}$$

Deste modo, podem-se determinar as constantes de partição P_O^I e P_A^I a partir da medida experimental da constante de partição P_A^O que representa a constante de partição do antioxidante num sistema binário água-óleo na ausência de emulsionante, requerendo apenas o conhecimento de um valor de b (*equação 33)*, que pode ser determinado a partir da variação de k_{obs} em função de Φ_I para uma determinada razão $\frac{\Phi_A}{\Phi_O}$.

Uma vez determinadas as constantes de partição, pode-se determinar k_I, que representa a constante de velocidade bimolecular para a reação que tem lugar entre 16-ArN_2^+ e o antioxidante na interface, utilizando a *equação 34*.

A percentagem de antioxidante presente em cada uma das regiões pode ser obtida a partir das *equações 36 – 38*.

$$\%AO_I = \frac{100\Phi_I P_A^I P_O^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_A^I P_O^I + \Phi_A P_O^I} \quad (36)$$

$$\%AO_O = \frac{100\Phi_O P_A^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_A^I P_O^I + \Phi_A P_O^I} \quad (37)$$

$$\%AO_A = \frac{100\Phi_A P_O^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_A^I P_O^I + \Phi_A P_O^I} \quad (38)$$

5.1. Simplificação do modelo cinético da pseudofase (MPCS)

Nas situações em que a solubilidade de um determinado antioxidante (AO) é muito baixa numa das regiões do sistema emulsionado, a determinação das constantes de partição pode estar sujeitas a um grande erro, já que isto implica que uma das constantes de partição seja muito maior que a outra.

Nestes casos, o modelo da pseudofase anteriormente descrito pode ser simplificado [221] pressupondo-se que a concentração de AO numa das regiões é praticamente nula. Este facto simplifica bastante o tratamento matemático e a interpretação dos resultados, uma vez que só é necessário determinar uma constante de partição.

Assim, supondo que a distribuição tem lugar fundamentalmente entre regiões oleosa e interfacial (ou seja, a solubilidade do AO na região aquosa é nula), *Figura 38*, a concentração total de AO definida na *equação 27,* reduz-se a *equação 39*:

$$[AO_T] = [AO_I]\Phi_I + [AO_O]\Phi_O \quad (39)$$

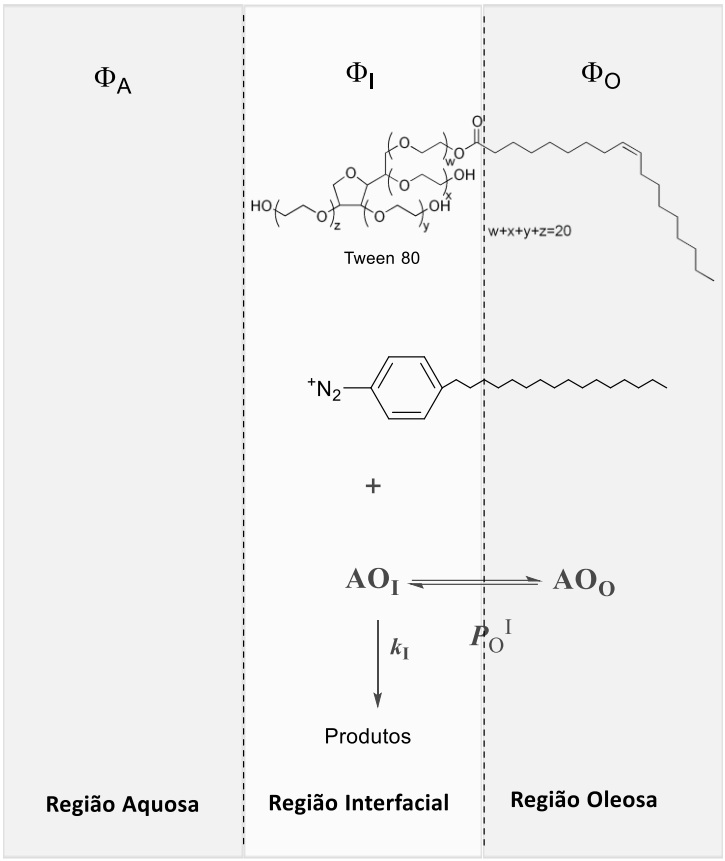


Figura 38 - Representação esquemática da região interfacial de uma emulsão com base no modelo cinético da pseudofase que mostra a partição do antioxidante, AO, entre as regiões interfacial e oleosa.

Substituindo a *equação 22* na *equação 39* obtém-se a *equação 40*:

$$[AO_I] = \frac{[AO_T]P_O^I}{\Phi_I P_O^I + \Phi_O} \quad \textbf{(40)}$$

Substituindo esta equação na *equação 28* obtém-se a expressão que relaciona a constante de velocidade observada com a constante de partição do AO entre as regiões oleosa-interfacial, *equação 41:*

$$k_{obs} = \frac{k_I[AO_T]P_O^I}{\Phi_I P_O^I + \Phi_O} \quad \textbf{(41)}$$

Matematicamente, a *equação 41* é equivalente à *equação 42*:

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{\Phi_A}{k_I[AO_T]P_A^I} + \frac{\Phi_I}{k_I[AO_T]} = \frac{1}{ab} + \frac{1}{a}\Phi_I \quad (42)$$

onde os parâmetros *a* e *b* são definidos pelas *equações 43* e *44* :

$$b = \frac{P_O^I}{\Phi_O} \quad (43)$$

$$a = k_1[AO_T] \quad (44)$$

A *equação 42* prevê que a variação de $1/k_{obs}$ em função de Φ_I é linear, com uma ordenada na origem igual a $\frac{1}{ab}$ e um declive igual a $\frac{1}{a}$.

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

$$P_O^I = \frac{\Phi_O \times declive}{ordenada\ na\ origem} \quad (45)$$

A fração de antioxidante presente na região oleosa e a interfacial e do sistema emulsionado vem dada pelas *equações 46 e 47* respetivamente.

$$\%\ AO_O = \frac{100\ \Phi_O}{\Phi_I P_O^I + \Phi_O} \quad (46)$$

$$\%\ AO_I = \frac{100\ \Phi_I P_O^I}{\Phi_I P_O^I + \Phi_O} \quad (47)$$

Já para os casos em que a distribuição tenha lugar fundamentalmente nas regiões aquosa-interfacial (*Figura 39*), ou seja, aqueles casos em que a concentração de AO na região oleosa é desprezável, pode-se obter seguindo o mesmo procedimento, uma expressão que relaciona a constante de velocidade observada com a constante de partição do AO entre as regiões aquosa-interfacial, *equação 48*. Esta equação pode ser linearizada chegando assim a *equação 49*.

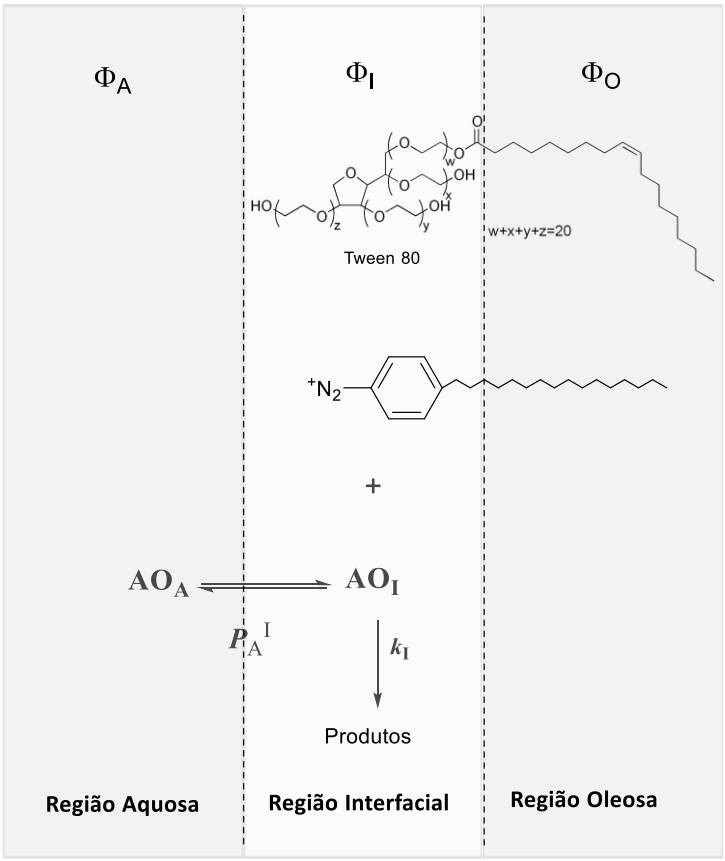


Figura 39 - Representação esquemática da região interfacial de uma emulsão com base no modelo cinético da pseudofase que mostra a partição do antioxidante, AO, entre as regiões interfacial e aquosa.

$$k_{obs} = \frac{k_I\,[AO_T]P_A^I}{\Phi_I P_A^I + \Phi_A} \quad \textbf{(48)}$$

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{\Phi_A}{k_I[AO_T]P_A^I} + \frac{\Phi_I}{k_I[AO_T]} = \frac{1}{ab} + \frac{1}{a}\Phi_I \quad \textbf{(49)}$$

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

$$P_A^I = \frac{\Phi_A \times declive}{ordenada\ na\ origem} \quad \textbf{(50)}$$

Desta forma, a percentagem de AO nestas regiões virá dada pelas *equações 51 e 52*.

$$\%\, AO_I = \frac{100\ \Phi_I P_A^I}{\Phi_I P_A^I + \Phi_A} \quad (51)$$

$$\%\, AO_A = \frac{100\ \Phi_A}{\Phi_I P_A^I + \Phi_A} \quad (52)$$

II. Objetivos

Este estudo surge pelo facto de uma das maiores causas de deterioração dos alimentos ser a oxidação lipídica [24, 87, 108]. Estima-se que mais de 20% dos alimentos produzidos em todo o mundo são perdidos devido a esta causa, originando perdas económicas substanciais quer para a indústria quer para o consumidor. A oxidação dos lípidos causa o aparecimento de sustâncias prejudiciais à saúde e o aparecimento de aromas e odores desagradáveis nos alimentos, e isso acarreta uma diminuição na qualidade nutricional e, portanto, problemas de segurança alimentar devido à formação de produtos secundários tóxicos após o seu processamento [246].

A fim de minimizar o problema da oxidação lipídica, a indústria alimentar tem vários métodos. Entre eles, pode-se citar o uso de atmosferas inertes para minimizar o contato do alimento com o oxigénio, o uso de baixas temperaturas para retardar as reações envolvidas no processo de oxidação, a inativação das enzimas que catalisam a oxidação e a adição de inibidores (antioxidantes). De todos eles, o método de proteção mais eficaz do ponto de vista técnico e económico é o uso de antioxidantes, cujo consumo pode apresentar igualmente certas vantagens para a saúde do consumidor, principalmente os antioxidantes naturais.

O principal objetivo desta Tese de Doutoramento foi aumentar o conhecimento existente sobre a complexa relação estrutura-atividade que controla a eficácia antioxidante de moléculas em sistemas emulsionados (emulsões e nanoemulsões). Parte do problema em interpretar a eficácia antioxidante em sistemas emulsionados deve-se ao facto de não existirem métodos fiáveis para a determinação da distribuição destas moléculas nas várias regiões dos sistemas. Por outro lado, a distribuição dos antioxidantes depende de vários fatores incluindo a estrutura do antioxidante, da estrutura e concentração do emulsionante e óleo empregue, e das condições de temperatura e pH. Assim, devido à falta de conhecimento sobre como as propriedades de solubilidade dos potenciais AO afetam a sua capacidade antioxidante em sistemas emulsionados, pretende-se neste trabalho perceber qual a relação entre a distribuição dos potenciais AO e a sua atividade antioxidante e, deste modo, entender qual a localização do AO dentro de um sistema emulsionado que permite a sua máxima eficácia. Tendo conhecimento dessa localização, pretende-se igualmente estudar quais os fatores que afetam a concentração dos AOs nessa localização, nomeadamente o tamanho de gota, a relação O/A e a fração de emulsionante utilizada.

Com este fim planeou-se:

- Sintetizar várias séries de antioxidantes contendo o mesmo grupo reativo, mas apresentando diferentes hidrofobicidades (*Tabela 5*). As

alterações na hidrofobicidade dos polifenóis a estudar (ácido cafeico, ácido gálico, ácido clorogénico, ácido 4-hidroxicinâmico, hidroxitirosol, tirosol e diidrocafeico) será realizada através de reações de esterificação nos quais, por meio de uma ligação covalente, serão incorporadas cadeias alquilo inertes de diferentes comprimentos.

- Estudar a sua distribuição em sistemas emulsionados O/A.

- Avaliar a capacidade antirradicalar dos compostos sintetizados em solução.

- Avaliar a capacidade antioxidante dos compostos sintetizados em sistemas emulsionados modelo.

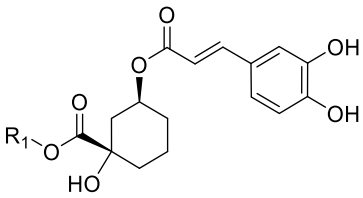
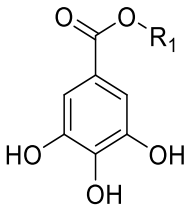
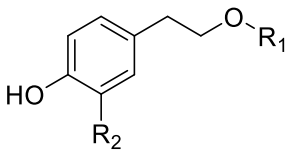
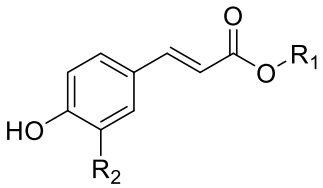
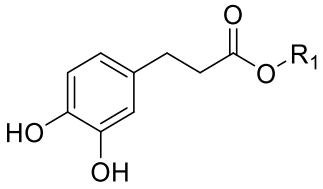
- Correlacionar a atividade antioxidante das várias moléculas com a sua localização nos sistemas emulsionados estudados.

- Estudar o efeito do tamanho da gota, da relação O/A utilizada e da fração de emulsionante na distribuição dos antioxidantes nos sistemas emulsionados e consequentemente na atividade antioxidante destes.

Com base nos resultados obtidos pretende-se no futuro conseguir modular e aumentar a eficiência antioxidante otimizando as suas concentrações na localização apropriada através da modificação da hidrofobicidade de compostos com capacidade antirradicalar ou por alteração de algumas propriedades das emulsões nomeadamente pela alteração da fração de emulsionante a utilizar.

Este conhecimento permitirá utilizar os AOs mais eficientemente, uma necessidade acrescida quando temos sistemas emulsionados contendo óleos de peixe muito ricos em ácidos gordos ómegas 3 e por isso muito instáveis frente à oxidação.

Tabela 5 - Antioxidantes a utilizar no presente trabalho.

Antioxidante /Estrutura	Nome	R_1	R_2
	Ácido Clorogénico (CGA)	H	---
	Clorogetano de metilo (CGA1)	CH_3	---
	Clorogenato de etilo (CGA2)	CH_2CH_3	---
	Clorogenato de propilo (CGA3)	$CH_2CH_2CH_3$	---
	Clorogenato de butilo (CGA4)	$(CH_2)_3CH_3$	---
	Clorogenato de octilo (CGA8)	$(CH_2)_7CH_3$	---
	Clorogenato de decilo (CGA10)	$(CH_2)_9CH_3$	---
	Clorogentato de dodecilo (CGA12)	$(CH_2)_{11}CH_3$	---
	Clorogenato de hexadecilo (CGA16)	$(CH_2)_{15}CH_3$	---
	Ácido gálico (AG)	H	---
	Galato de metilo (MG)	CH_3	---
	Galato de etilo (EG)	CH_2CH_3	---
	Galato de propilo (PG)	$CH_2CH_2CH_3$	---
	Galato de butilo (BG)	$(CH_2)_3CH_3$	---
	Galato de octilo (OG)	$(CH_2)_7CH_3$	---
	Galado de dodecilo (LG)	$(CH_2)_{11}CH_3$	---
	Hidroxitirosol (HT)	H	OH
	Formiato de 3,4-di-hidroxifenilo (HT1)	COH	OH
	Acetato de 3,4-di-hidroxifenilo (HT2)	$COCH_3$	OH
	Butanoato de 3,4-di-hidroxifeniloo HT4)	$CO(CH_2)_2CH_3$	OH
	Hexanoato de 3,4-di-hidroxifenilo (HT6)	$CO(CH_2)_4CH_3$	OH
	Octanoato de 3,4-di-hidroxifenilo (HT8)	$CO(CH_2)_6CH_3$	OH
	Decanoato de 3,4-di-hidroxifenilo (HT10)	$CO(CH_2)8CH_3$	OH
	Dodecanoato de 3,4-di-hidroxifenilo (HT12)	$CO(CH_2)_{10}CH_3$	OH
	Tetradecanoato de 3,4-di-hidroxifenilo (HT14)	$CO(CH_2)_{12}CH_3$	OH
	Hexadecanoato de 3,4-di-hidroxifenilo (HT16)	$CO(CH_2)_{14}CH_3$	OH
	Tirosol (TY)	H	H
	Octanoato de 4-hidroxifenilo (TY8)	$CO(CH_2)_6CH_3$	H
	Hexadecanoato de 4-hidroxifenilo (TY16)	$CO(CH_2)_{14}CH_3$	H
	Ácido cafeico (AC)	H	OH
	Cafeiato de metilo (AC1)	CH_3	OH
	Cafeiato de etilo (AC2)	CH_2CH_3	OH
	Cafeiato de propilo (AC3)	$CH_2CH_2CH_3$	OH
	Cafeiato de butilo (AC4)	$(CH_2)_3CH_3$	OH
	Cafeiato de hexilo (AC6)	$(CH_2)_5CH_3$	OH
	Cafeiato de octilo (AC8)	$(CH_2)_7CH_3$	OH
	Cafeiato de decanoilo (AC10)	$(CH_2)_9CH_3$	OH
	Cafeiato de dodecilo (AC2)	$(CH_2)_{11}CH_3$	OH
	Cafeiato de tetradecilo (AC14)	$(CH2)_{13}CH_3$	OH
	Cafeiato de hexadecilo (AC16)	$(CH2)_{15}CH_3$	OH
	Ácido 4- hidroxinâmico (4-OH-AC)	H	H
	4- OH-cinamato de octilo (4-OH-AC8)	$(CH_2)_7CH_3$	H
	4- OH-cinamato de hexadecilo (4-OH-AC16)	$(CH2)_{15}CH_3$	H
	Ácido diidrocafeico (DH)	H	OH
	Diidrocafeiato de octilo (DH8)	$(CH_2)_7CH_3$	OH
	Diidrocafeiato de hexadecilo (DH16)	$(CH2)_{15}CH_3$	OH

III. Métodos e procedimentos experimentais

1. Reagentes e Equipamentos

Todos os solventes usados nas extrações eram de qualidade “Puro” e os usados nas cromatografias em coluna e HPLC foram de qualidade “Para Análise (PA)” da Merck, Sigma Aldrich ou da Fluka. Além dos solventes utilizados, adquiriram-se comercialmente os seguintes compostos:

- ✓ Ácido cafeico 99% ($C_9H_8O_4$), Sigma-Aldrich /Acros Organics
- ✓ Ácido p-hidroxicinámico 98% ($C_9H_8O_3$), Acros Organics
- ✓ Ácido o-hidroxicinámico 97% ($C_9H_8O_3$), Acros Organics
- ✓ Ácido gálico (GA) monohidratado ≥ 98,0% ($C_7H_6O_5$. H_2O), Sigma Aldrich
- ✓ Galato de metilo ≥98,0% ($C_8H_8O_5$), Fluka
- ✓ Galato de etilo ≥96,0% ($C_9H_{10}O_5$), Fluka
- ✓ Galato de propilo≥ 98% ($C_{10}H_{12}O_5$), Sigma-Aldrich
- ✓ Galato de butilo ($C_{11}H_{14}O_5$), Sigma Aldrich
- ✓ Galato de octilo ≥ 99,0% ($C_{15}H_{22}O_5$), Sigma-Aldrich
- ✓ Galato de laurilo ≥ 99,0% ($C_{19}H_{30}O_5$), Fluka
- ✓ Hidroxitirosol ($C_8H_{10}O_3$), Seprox Biotech
- ✓ Acetato de hidroxitirosol 99% ($C_{11}H_{14}O_5$), Seprox Biot
- ✓ Ácido Clorogénico 98% ($C_{16}H_{18}O_9$), Acros Organics
- ✓ Éter etílico 99.9% ($C_2H_5OC_2H_5$), Panreac
- ✓ 4-hexadecilanilina, 97% ($CH_3(CH_2)_{15}C_6H_4NH_2$), Aldrich
- ✓ Trifluorboro eterato 99.8 % (($C_2H_5)_2O{\cdot}BF_3$), Aldrich
- ✓ DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$), Aldrich
- ✓ n-(1-Naftil) -etilendiamina dihidroclorado 98% ($C_{12}H_{14}N_2$)
- ✓ Tween 80 ($C_{64}H_{124}O_{26}$), Fluka

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

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

As placas de TLC usadas na identificação dos compostos foram de gel de sílica em suporte de alumínio (Merck 60 S_{254}).

A revelação das placas de TLC foi efetuada de três modos:

- UV/Vis
- Com iodo;
- Solução de Mostain (100 mL H_2SO_4 10%, 5,0 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$, 0,22 g $Ce(SO_4)_2.4H_2O$).

As análises de ESI-MS foram realizadas num espectrómetro de massa Finnigan LCQ DECA XP MAX equipado com uma fonte API, com recurso a uma sonda de ionização de electrospray (ESI), com um fluxo de bomba de 3 $\mu L.min^{-1}$. A temperatura do capilar foi de 180ºC e a voltagem foi de 3V, e os espectros foram obtidos em modo de iões positivos.

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

Para as determinações espectrométricas pelo método DPPH, utilizou-se um espectrofotómetro PowerWave XS, Bio-Tek®.

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

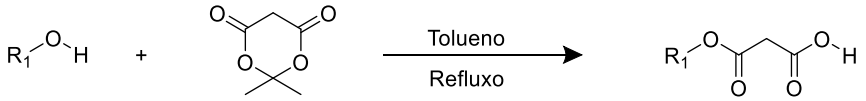
As emulsões foram preparadas com um homogenizador Polytron® PT 1600 E System, equipado com um rotor PT-DA 1612/2EC (f 12 mm).

As nanoemulsões foram preparadas com um homogeneizador de alta pressão (Nozzle Z5, Nano DeBEE, Bee International, USA).

2. Síntese de ésteres do ácido cinâmico

2.1. Síntese de monomalonatos

Sintetizaram-se os monomalonatos a partir do álcool gordo apropriado com o ácido de Meldrum (2, 2-dimetil-1, 3-dioxano-4, 6-diona), por simples aquecimento em tolueno de acordo com o procedimento descrito por Menezes *et al [151]* (*Figura 40*).



1 R_1= CH_3
2 R_1= C_2H_5
3 R_1= C_3H_7
4 R_1= C_4H_9
5 R_1= C_6H_{13}
6 R_1= C_8H_{17}
7 R_1= $C_{10}H_{21}$
8 R_1= $C_{12}H_{25}$
9 R_1- $C_{14}H_{29}$
10 R_1- $C_{16}H_{33}$

Figura 40 - Síntese de monomalonatos.

Para um balão de fundo redondo, pesaram-se quantidades equimolares (2 mmol) do álcool gordo e do ácido Meldrum (2,2-dimetil-1,3-dioxane-4,6-diona), adicionaram-se 5 mL de tolueno e colocou-se esta mistura em refluxo durante 4 horas. Uma vez terminada a reação, deixou-se arrefecer à temperatura ambiente. Seguidamente, colocou-se a solução num funil de separação e adicionaram-se 10 ml de tolueno. Extraiu-se a camada orgânica com 3 porções de 30 mL de uma solução de bicarbonato de sódio saturada, e neutralizou-se a amostra com ácido clorídrico 1 M até pH=1. Voltou-se a colocar a amostra num funil de separação e extraiu-se a camada aquosa com 3 porções de 30 mL de éter etílico, secou-se com sulfato de sódio anidro, filtrou-se por vácuo e evaporou-se o solvente.

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

2.1.1. Caracterização espectroscópica dos monomalonatos

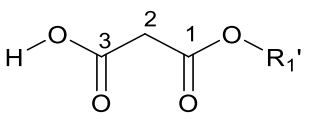


Figura 41 - Estrutura numerada dos monomalonatos.

Malonato de monometilo (1)

^{1}H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 3,45 (m, 2H, H-2), 3,67 (t, J= 6,0 Hz, 2H, H-1´).

^{13}C RMN ($CDCl_3$; 100 MHz): δ 40,7 (C-2); 51,7 (C-1'); 166,7 (C1); 171,3 (C3).

Malonato de monoetilo (2)

^{1}H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 0,95 (t, J=7,6 Hz, 3H, H2'); 1,69 3,45 (m, 2H, H-2), 4,14 (t, J= 6,0 Hz, 2H, H-1´).

^{13}C RMN ($CDCl_3$; 100 MHz): δ 9,9 (C-2'); 21,5 (C-1'); 40,7 (C-2); 67,2 (C-1); 166,7 (C-3); 171,3 (C-1).

Malonato de monopropilo (3)

^{1}H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 0,95 (t, J=7,6 Hz, 3H, H-3'); 1,69 (m, 2H, H-2'); 3,45 (m, 2H, H-2), 4,14 (t, J= 6,0 Hz, 2H, H-1´).

^{13}C RMN ($CDCl_3$; 100 MHz): δ 9,9 (C-3'); 21,5 (C-2'); 40,7 (C-2); 67,2 (C-1'); 166,7 (C-3); 171,3 (C-1).

Malonato de monobutilo (4)

^{1}H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):δ 0,90 (t, J=7,4 Hz, 3H, H-4'); 1,36 (m, 2H, H-3'); 1,62 (m, 2H, H-2'); 3,41 (s, 2H, H-2), 4,15 (t, J= 6,8 Hz, 2H, H-1´).

^{13}C RMN ($CDCl_3$; 100 MHz): δ 13,6 (C-4'); 18,9 (C-3'); 30,4 (C-2'); 40,9 (C-2); 65,9 (C-1'); 166,9 (C-3); 171,8 (C-1).

Malonato de monohexilo (5)

^{1}H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 0,88 (t, J=6,8 Hz, 3H, H-6'); 1,32 (m, 6H, H-5'-3'); 1,64 (m, 2H, H-2'); 3,43 (s, 2H, H-2), 4,16 (t, J= 6,8 Hz, 2H, H-1´).

^{13}C RMN ($CDCl_3$; 100 MHz): δ13,9 (C-6'); 22,5 (C-5'); 25,4 (C-3'); 28,3 (C-2'); 31,3 (C-4'); 41,0 (C-2); 66,1 (C-1'); 166,9 (C-3); 171,7 (C-1).

Malonato de monooctanoilo (6)

^{1}H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 0,88 (t, J=7,0 Hz, 3H, H-8'); 1,27 (m, 10H, H-7'-3'); 1,65 (m, 2H, H-2'); 3,44 (s, 2H, H-2), 4,15 (t, J= 6,8 Hz, 2H, H-1´).

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 14,1 (C-8'); 22,7 (C-7'); 25,8 (C-3'); 28,4 (C-2'); 29,2 (C-4',5'); 31,8 (C-6'); 40,8 (C-2); 66,3 (C-1'); 167,2 (C-3); 171,4 (C-1).

Malonato de monodecilo (7)

^{1}H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 0,85 (t, J=7,0 Hz, 3H, H-10'); 1,24 (m, 14H, H-9'-3'); 1,63 (m, 2H, H-2'); 3,41 (s, 2H, H-2), 4,17 (t, J= 6,8 Hz, 2H, H-1´).

^{13}C RMN ($CDCl_3$; 100 MHz): δ 14,1 (C-10'); 22,6 (C-9'); 25,7 (C-3'); 28,4 (C-2'); 29,3 (C-4',7'); 29,5 (C-5',6'); 31,9 (C-8'); 40,5 (C-2); 66,2 (C-1'); 167,2 (C-3); 170,9 (C-1).

Malonato de monododecilo (8)

^{1}H RMN ($CD\text{-}Cl_3$, 400 MHz): δ 0,89 (t, J= 6,8 Hz, 3H, H-12'); 1,26 (m, 18H, H-11'-3'); 1,66 (m, 2H, H-2'); 3,44 (s, 2H, H-2), 4,18 (t, J=6,8 Hz, 2H, H-1').

^{13}C RMN ($CDCl_3$; 100 MHz): δ 14,1 (C-12'); 22,7 (C-11'); 25,7 (C-3'); 28,4 (C-2'); 29,3 (C-4',9'); 29,6 (C-5'-8'); 31,9 (C-10'); 40,4 (C-2); 66,2 (C-1'); 167,4 (C-3); 170,5 (C-1).

Malonato de monotetradecilo (9)

^{1}H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 0,88 (t, J=6,8 Hz, 3H, H-14'); 1,26 (bs, 22H, H-13'-3'); 1,66 (m, 2H, H-2'); 3,43 (s, 2H, H-2), 4,18 (t, J= 6,8 Hz, 2H, H-1´).

^{13}C RMN ($CDCl_3$, 100 MHz): δ 13,49 (C-14'); 22,1 (C-13'); 25,1 (C-3'); 27,8 (C-2'); 28,7 (C-4',11'); 29,0 (C-5'-10'), 31,3 (C-12'); 39,8 (C-2); 65,7 (C-1'); 166,8 (C-3); 170,0 (C-1).

Resultados espectroscópicos de acordo com os descritos na literatura [151].

Malonato de monohexadecilo (10)

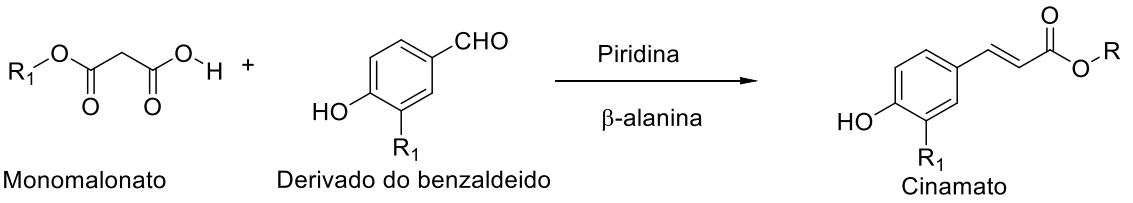
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz): δ 0,88 (t, J=6,8 Hz, 3H, H-16'); 1,26 (bs, 26H, H-15'-3'); 1,65 (m, 2H, H-2'); 3,44 (s, 2H, H-2), 4,17 (t, J= 6,8 Hz, 2H, H-1´).

^{13}C RMN ($CDCl_3$; 100 MHz): δ 13,8 (C-16'); 22,4 (C-15'); 25,4 (C-3'); 28,0 (C-2'); 29,0 (C-4',13'); 29,4 (C-5'-12'), 31,6 (C-14'); 40,3 (C-2); 65,9 (C-1'); 166,8 (C-3); 170,8 (C-1).

Resultados espectroscópicos de acordo com os descritos na literatura [151].

2.2. Síntese de cinamatos

Sintetizaram-se os cinamatos de acordo com o procedimento descrito por Menezes *et al [151]* (*Figura 42*).



AC1	R= CH_3	R_1= OH
AC2	R= C_2H_5	R_1= OH
AC3	R= C_3H_7	R_1= OH
AC4	R= C_4H_9	R_1= OH
AC6	R= C_6H_{13}	R_1= OH
AC8	R= C_8H_{17}	R_1= OH
AC10	R= $C_{10}H_{21}$	R_1= OH
AC12	R= $C_{12}H_{25}$	R_1= OH
AC14	R- $C_{14}H_{29}$	R_1= OH
AC16	R- $C_{16}H_{33}$	R_1= OH
4-OH-C8	R= C_8H_{17};	R_1= H
4-OH-C16	R= $C_{15}H_{31;}$	R_1= H

Figura 42 - Síntese dos cinamatos.

Para um balão de fundo redondo, pesaram-se quantidades equimolares dos monomalonatos preparados anteriormente (1 g) e do derivado benzaldeído apropriado, 37 mg de β-alanina e 2,5 mL de piridina. Colocou-se em refluxo, a 40 ºC, durante um determinado período de tempo.

Todos os compostos foram purificados por cromatografia em coluna utilizando gel de sílica (~ 300 g) como fase estacionária e com acetato de etilo / éter de petróleo (1:1) como eluente. Seguiu-se a purificação por TLC utilizando o mesmo eluente da coluna e a revelação das placas em câmara de iodo.

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

Caracterização espectroscópica dos cinamatos

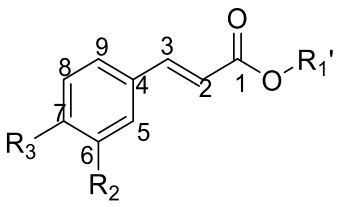


Figura 43 - Estrutura numerada dos cinamatos de cadeia alquilo longa.

***Trans*-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de metilo ou cafeiato de metilo (AC1)**

^{1}H RMN (CD_3COCD_3, 400 MHz): δ3,7 (s, J= 6,8 Hz, 2H, H-1´), 6,3 (d, J= 16,0 Hz, 1H, H-2), 6,9 (d, J=8,0 Hz, 1H- H-8), 7,02 (dd, J=8,0 e 2,0 Hz, 1H, H-9); 7,15 (d, J=2 Hz, 1H, H-5), 7,55 (d, J=16,0 Hz, 1H, H-3).

^{13}C RMN (CD_3COCD_3; 100 MHz): δ 52,5 (C-1'); 61,5 (C-2); 116,1 (C-8); 116,3 (C-5); 117,3 (C-9); 123,5 (C-4); 128,6 (C-6); 146,7 (C-3); 149,8, (C-7); 168,8,2 (C-1).

MS: *m/z* 195,20 (M+ H) $^{+}$

Resultados espectroscópicos de acordo com os descritos na literatura [247].

***Trans*-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de etilo ou cafeiato de etilo (AC2)**

^{1}H RMN (CD_3COCD_3, 400 MHz): δ 1.25 (t, J= 6,8 Hz, 2H, H-2´), 4,7 (m, 2H, H-1'), 6,3 (d, J= 16,0 Hz, 1H, H-2), 6,9 (d, J=8,0 Hz, 1H- H-8), 7,02 (dd, J=8,0 e 2,0 Hz, 1H, H-9); 7,14 (d, J=2 Hz, 1H, H-5), 7,5 (d, J=16,0 Hz, 1H, H-3).

^{13}C RMN (CD_3COCD_3; 100 MHz): δ 15,2 (C-2'); 61,0(C-1'); 115,7(C-2); 116,3 (C-8); 116,9 (C-5); 123,0(C-9); 128,2(C-4); 146,0 (C-6); 149,9 (C-3); 149,3 (C-7); 167,9 (C-1).

MS: *m/z* 209,20 (M+ H) $^{+}$

***Trans*-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de propilo ou cafeiato de propilo (AC3)**

^{1}H RMN (CD_3COCD_3, 400 MHz): δ 0,95 (t, J=7,4 Hz, 3H, H-3'); 1,67 (m, 2H, H-2'); 4,08 (t, J= 6,8 Hz, 2H, H-1´), 6,278 (d, J= 16,0 Hz, 1H, H-2), 6,86 (d, J=8,0 Hz, 1H-H-8), 7,03 (dd, J=8,0 e 2,0 Hz, 1H, H-9); 7,15 (d, J=2 Hz, 1H, H-5),7,53 (d, J=16,0 Hz, 1H, H-3).

^{13}C RMN (CD_3COCD_3; 100 MHz): δ: 11,4 (C-3'); 23,6 (C-2'); 66,9 (C-1'); 115,9 (C-2); 116,5 (C-8); 117,1 (C-5); 123,2 (C-9); 128,4 (C-4); 146,2 (C-6); 146,5 (C-3); 149,4 (C-7); 168,2 (C-1).

MS: *m/z* 223,20 (M+ H) $^{+}$

Resultados espectroscópicos de acordo com os descritos na literatura [247].

***Trans*-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de butilo ou cafeiato de butilo (AC4)**

^{1}H RMN (CD_3COCD_3, 400 MHz): δ 0,93 (t, J=7,4 Hz, 3H, H-4'); 1,19 (m, 2H, H-3'); 1,66 (quin, 2H, H-2'); 4,12 (t, J= 6,8 Hz, 2H, H-1´), 6,26 (d, J= 16,0 Hz, 1H, H-2), 6,87

(d, J=8,0 Hz, 1H- H-8), 7,04 (dd, J=8,0 e 2,4 Hz, 1H, H-9); 7,16 (d, J=2 Hz, 1H, H-5),7,55 (d, J=16,0 Hz, 1H, H-3).

^{13}C RMN (CD_3COCD_3; 100 MHz): δ 14,7 (C-4'); 20,6 (C-3'); 32,4 (C-2'); 65,1 (C-1'); 115,9 (C-2); 116,5 (C-8); 117,1 (C-5); 123,2 (C-9); 128,4 (C-4); 146,2 (C-6); 146,9 (C-3); 149,4 (C-7); 168,2 (C-1).

MS: *m/z* 237,20 (M+ H) $^+$

***Trans*-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de hexilo ou cafeiato de hexilo (AC6)**

^{1}H RMN (CD_3COCD_3, 400 MHz): δ 0,88 (t, J=7,0 Hz, 3H, H-6'); 1,32 (m, 6H, H-5'-3'); 1,66 (quin, 2H, H-2'); 4,12 (t, J= 6,6 Hz, 2H, H-1´), 6,26 (d, J= 16,0 Hz, 1H, H-2), 6,85 (d, J=8,4 Hz, 1H- H-8), 7,02 (dd, J=8,4 e 1,6 Hz, 1H, H-9); 7,14 (d, J=2,0 Hz, 1H, H-5),7,52 (d, J=16,0 Hz, 1H, H-3).

^{13}C RMN (CD_3COCD_3; 100 MHz):δ 15,3 (C-6'); 24,2 (C-5'); 27,4 (C-3'); 30,5 (C-2'); 33,2 (C-4'); 65,7 (C-1'); 116,1 C-2); 116,7 (C-8); 117,3 (C-5); 123,5 (C-9); 128,6 (C-4); 146,5 (C-6); 147,2 (C-3); 149,6 (C-7); 168,5 (C-1).

MS: *m/z* 265,20 (M+ H) $^+$

***Trans*-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de octilo ou cafeiato de octilo (AC8)**

^{1}H RMN (CD_3COCD_3, 400 MHz): δ 0,87 (t, J=6,8 Hz, 3H, H-8'); 1,28 (m, 10H, H-7'-3'); 1,66 (qui, 2H, H-2'); 4,13 (t, J= 6,6 Hz, 2H, H-1´), 6,27 (d, J= 16,0 Hz, 1H, H-2), 6,86 (d, J=8,0 Hz, 1H- H-8), 7,03 (dd, J=8,4 e 2,0 Hz, 1H, H-9); 7,15 (d, J=2,0 Hz, 1H, H-5),7,53 (d, J=16,0 Hz, 1H, H-3).

^{13}C RMN (CD_3COCD_3; 100 MHz):δ 15,3 (C-8'); 24,3 (C-7'); 27,7 (C-3'); 30,5 (C-2'); 30,9 (C-4',5'); 33,5 (C-6'); 65,7 (C-1'); 116,1 (C-2); 116,8 (C-8); 117,3 (C-5); 123,5 (C-9); 128,7 (C-4); 146,5 (C-6); 147,2 (C-3); 149,6 (C-7); 168,5 (C-1).

MS: *m/z* 293,27 (M+ H) $^+$

***Trans*-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de decanoilo ou cafeiato de decanoilo (AC10)**

^{1}H RMN (CD_3COCD_3, 400 MHz): δ 0,87 (t, J=6,8 Hz, 3H, H-10'); 1,29 (m, 14H, H-9'-3'); 1,67 (m, 2H, H-2'); 4,14 (t, J= 6,6 Hz, 2H, H-1´), 6,28 (d, J= 16,0 Hz, 1H, H-2), 6,87 (d, J=8,0 Hz, 1H- H-8), 7,04 (dd, J=8,0 e 2,0 Hz, 1H, H-9); 7,16 (d, J=2,0 Hz, 1H, H-5),7,52 (d, J=16,0 Hz, 1H, H-3).

^{13}C RMN (CD_3COCD_3; 100 MHz):δ 15,1 (C-10'); 24,1 (C-9'); 27,4 (C-3'); 30,3 (C-2'); 30,8 (C-4',7'); 31,0 (C-5',6'); 33,4 (C-8'); 65,4 (C-1'); 115,9 (C-2); 116,5 (C-8); 117,1 (C-5); 123,2 (C-9); 128,4 (C-4); 146,2 (C-6); 147,0 (C-3); 149,4 (C-7); 168,2 (C-1).

MS: *m/z* 321,33 (M+ H) $^+$

***Trans*-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de dodecilo ou cafeiato de dodecilo (AC12)**

^{1}H RMN (CD_3COCD_3, 400 MHz): δ 0,86 (t, J=7,0 Hz, 3H, H-12'); 1,27 (m, 18H, H-11'-3'); 1,66 (m, 2H, H-2'); 4,13 (t, J= 6,8 Hz, 2H, H-1´), 6,27 (d, J= 16,0 Hz, 1H, H-2), 6,86 (d, J=8,0 Hz, 1H- H-8), 7,03 (dd, J=8,4 e 2,0 Hz, 1H, H-9); 7,14 (d, J=2,4 Hz, 1H, H-5),7,52 (d, J=15,6 Hz, 1H, H-3).

^{13}C RMN (CD_3COCD_3; 100 MHz): δ 15,6 (C-12'); 24,6 (C-11'); 28,0 (C-3'); 30,8 (C-2'); 31,6 (C-4',9'); 31,7 (C-5'-8'); 33,9 (C-10'); 66,0 (C-1'); 116,4 (C-2); 117,0 (C-8); 117,6 (C-5); 123,7 (C-9); 128,9 (C-4); 146,8 (C-6); 147,5 (C-3); 149,9 (C-7); 168,7 (C-1).

MS: *m/z* 347,47 (M+ H) $^+$

***Trans*-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de tetradecilo ou cafeiato de tetradecilo (AC14)**

^{1}H RMN (CD_3COCD_3, 400 MHz): δ 0,88 (t, J=6,6 Hz, 3H, H-14'); 1,29 (m, 22H, H-13'-3'); 1,67 (m, 2H, H-2'); 4,15 (t, J= 6,8 Hz, 2H, H-1´), 6,28 (d, J= 16,0 Hz, 1H, H-2), 6,87 (d, J=8,0 Hz, 1H- H-8), 7,05 (dd, J=8,4 e 2,0 Hz, 1H, H-9); 7,16 (d, J=2,0 Hz, 1H, H-5),7,54 (d, J=16,0 Hz, 1H, H-3).

^{13}C RMN (CD_3COCD_3; 100 MHz): δ 15,4 (C-14'); 24,3 (C-13'); 27,7 (C-3'); 30,6 (C-2'); 31,3 (C-4',11'); 31,4 (C-5'-10'), 33,6(C-12'); 65,7 (C-1'); 116,2 (C-2); 116,8 (C-8); 117,3 (C-5); 123,5 (C-9); 128,6 (C-4); 146,5 (C-6); 147,2 (C-3); 149,6 (C-7); 168,4 (C-1).

MS: *m/z* 377,33 (M+ H) $^+$

Resultados espectroscópicos de acordo com os descritos na literatura [151].

***Trans*-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de hexadecilo ou cafeiato de hexadecilo (AC16)**

^{1}H RMN (CD_3COCD_3, 400 MHz): δ 0,86 (t, J=6,8 Hz, 3H, H-16'); 1,41 (m, 26H, H-15'-3'); 1,65 (m, 2H, H-2'); 4,14 (t, J= 6,8 Hz, 2H, H-1´), 6,28 (d, J= 16,0 Hz, 1H, H-2), 6,87 (d, J=8,0 Hz, 1H- H-8), 7,02 (dd, J=8,4 e 2,0 Hz, 1H, H-9); 7,14 (d, J=2,4 Hz, 1H, H-5),7,52 (d, J=16,0 Hz, 1H, H-3).

^{13}C RMN (CD_3COCD_3; 100 MHz): 14,9 (C-16'); 23,9 (C-15'); 27,3 (C-3'); 28,0 (C-2'); 29,0 (C-4',13'); 29,4 (C-5'-12'), 31,6 (C-14'); 65,2 (C-1'); 115,7 (C-2); 116,4 (C-8), 116,8 (C-5), 123,0 (C-9); 128,2 (C-4); 146,0 (C-6), 146,8 (C-3); 149,1 (C-7); 167,9 (C-1).

MS: *m/z* 405,33 $(M+ H)^+$

Resultados espectroscópicos de acordo com os descritos na literatura [151].

***Trans*-3- (4-hidroxifenil) propenoato de octilo (4-OH-C8)**

^{1}H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):δ 0,87 (t, J=6,8 Hz, 3H, H-8'); 1,27 (m, 10H, H-7'-3'); 1,68 (m, 2H, H-2'); 4,18 (t, J= 6,6 Hz, 2H, H-1´), 6,29 (d, J= 16,0 Hz, 1H, H-2), 6,86 (d, J=8,8 Hz, 1H- H-6, 8), 7,41 (d, J=8,4 Hz, 2H, H-5, 9);7,62 (d, J=16,0 Hz, 1H, H-3).

^{13}C RMN ($CDCl_3$; 100 MHz): δ 13,8 (C-8'); 22,4 (C-7'); 25,8 (C-3'); 28,5 (C-2'); 29,0 (C-4',5'); 31,6 (C-6'); 64,6 (C-1'); 115,7 (C-6,8); 126,7 (C-4); 129,8 (C-5, 9); 144,5 (C-3); 157,9 (C-7); 167, 8 (C-1).

***Trans*-3- (4-hidroxifenil) propenoato de tetradecílo (4-OH-C16)**

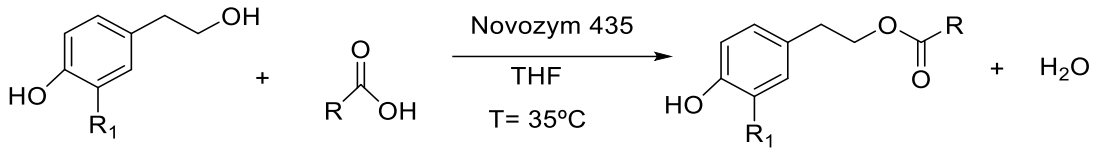
^{1}H RMN ($CDCl_3$, 400 MHz):δ 0,88 (t, J=6,8 Hz, 3H, H-16'); 1,27 (m, 26H, H-15'-3'); 1,71 (m, 2H, H-2'); 4,20 (t, J= 6,6 Hz, 2H, H-1´), 6,31 (d, J= 16,0 Hz, 1H, H-2), 6,86 (d, J=8,4 Hz, 1H- H-6, 8), 7,44 (d, J=8,4 Hz, 2H, H-5, 9);7,64 (d, J=16,0 Hz, 1H, H-3).

^{13}C RMN (CD-Cl_3; 100 MHz):δ 14,1 (C-16'); 22,7 (C-15'); 25,9 (C-3'); 28,7 (C-2'); 29,2 (C-4',13'); 29,6 (C-5'-12'), 31,9 (C-14'); 64,8 (C-1'); 115,9 (C-6,8); 127,2 (C-4); 129,9 (C-5, 9); 144,5 (C-3); 157,8 (C-7); 167,8 (C-1).

Resultados espectroscópicos de acordo com os descritos na literatura [58].

3. Síntese dos ésteres do hidroxitirosol e tirosol

Os ésteres do hidroxitirosol (HT) e do tirosol (TY) de cadeia alquila curta (C1-C8) foram obtidos por esterificação do HT e do TY com ácidos gordos de cadeia linear de diferentes tamanhos com catálise enzimática, de acordo com o procedimento descrito por Almeida *et al* [248], *Figura 44*.

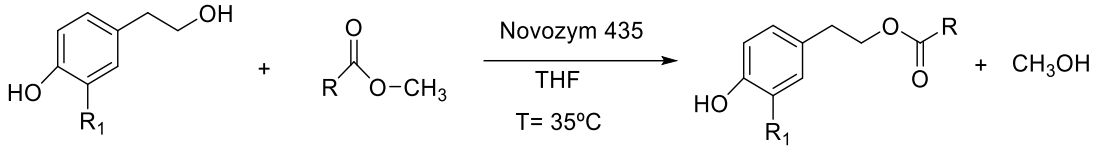


HT1: R = H R_1 = OH
HT2: R = CH_3 R_1 = OH
HT3: R = CH_2CH_3 R_1 = OH
HT4: R = $(CH_2)_2CH_3$ R_1 = OH
HT6: R = $(CH_2)_4CH_3$ R_1 = OH
HT8: R = $(CH_2)_6CH_3$ R_1 = OH
TY8 : R = $(CH_2)_6CH_3$ R_1 = H

Figura 44 - Síntese de ésteres do hidroxitirosol e do tirosol de cadeia curta / intermédia.

Num balão de fundo redondo colocaram-se 3,24 mmol de hidroxitirosol ou tirosol, 9,72 mmol do ácido apropriado, 0,972 g de enzima Novozym 435 e 33 mL de THF. Deixou-se a solução a 35°C durante um determinado tempo, controlando a reação por TLC. Após o tempo necessário de reação, efetuou-se a filtração da enzima e transferiu-se a solução para uma ampola de decantação e adicionaram-se 80 mL de éter etílico. Procedeu-se à lavagem da camada orgânica com três porções de 30 mL de solução aquosa de bicarbonato de sódio 0,6M. Secou-se com sulfato de sódio anidro e evaporou-se o solvente no evaporador rotativo. Todos os ésteres obtidos foram analisados e caracterizados por ^{1}H-RMN e ^{13}CRMN.

Os ésteres de cadeia alquílica longa (C10-C16) foram obtidos por transesterificação do HT ou do TY com o éster metílico apropriado, procedimento descrito por *Almeida et al*, com modificações (*Figura 45*).



HT10: R = $(CH_2)_8CH_3$ R_1 = OH
HT12: R = $(CH_2)_{10}CH_3$ R_1 = OH
HT14: R = $(CH_2)_{12}CH_3$ R_1 = OH
HT16: R = $(CH_2)_{14}CH_3$ R_1 = OH
TY16: R = $(CH_2)_{14}CH_3$ R_1 = H

Figura 45 - Síntese dos ésteres do hidroxitirosol e do tirosol de cadeia longa.

Num balão de fundo redondo, colocaram-se 3,24 mmol de hidroxitirosol ou de tirosol e 9,72 mmol do éster metílico, 0,972 g de enzima Novozym 435 e 33 mL de THF. Deixou-se a reação a 35°C durante um determinado tempo. No fim da reação, filtrou-se a enzima e procedeu-se à purificação da mistura por cromatografia em coluna, usando sílica 0,063-0,200 mm como fase estacionária e éter de petróleo/acetato de etilo 2:1 (v: v) como eluente. Acompanhou-se a purificação por cromatografia de camada fina (revelação UV e câmara de iodo). Após evaporação do solvente, os ésteres obtidos foram identificados por ^{1}H-RMN e ^{13}C-RMN.

3.1. Caraterização espetroscópica dos ésteres do hidroxitirosol e tirosol

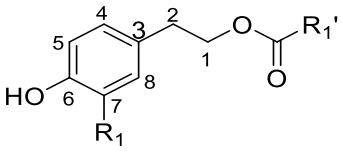


Figura 46 - Estrutura numerada dos ésteres do hidroxitirosol e tirosol.

Formiato de 3,4-di-hidroxifelino (HT1)

^{1}H RMN (400 MHz, (CD3)2CO): δ 6,76 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H5); 6,75 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H8); 6,59 (dd, J3 = 8,0 Hz, J4 =2,0 Hz, 1H, H4); 4,27 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H1); 2,81 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H2); 7,7 (1H, H').

^{13}C RMN (101 MHz, (CD3)2CO): δ 161,9 (C9); 145,9 (C7); 144,6 (C6); 130,2 (C3); 121,1 (C4); 116,8 (C5); 116,1 (C8); 65,2 (C1); 35,0 (C2).

Acetato de 3,4-di-hidroxifenilo (HT2)

^{1}H RMN (400 MHz, (CD3)2CO): δ 6,75 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H5); 6,74 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H8); 6,58 (dd, J3 = 8,0 Hz, J4 =2,0 Hz, 1H, H4); 4,15 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H1); 2,76 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H2); 1,96 (t, J = 8,0 Hz, 3H, H1').

^{13}C RMN (101 MHz, (CD3)2CO): δ 170,0 (C9); 145,0 (C7); 143,6 (C6); 129,7 (C3); 120,1 (C4); 115,9 (C5); 115,2 (C8); 64,8 (C1); 34,2 (C2); 27,0 (C1').

Butanoato de 3,4-di-hidroxifenilo (HT4)

^{1}H RMN (400 MHz, (CD3)2CO): δ 6,76 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H5); 6,75 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H8); 6,58 (dd, J3 = 8,0 Hz, J4 =2.0 Hz, 1H, H4); 4,18 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H1); 2;76 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H2); 2,24 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H1'); 1,58 (m, J = 8,0 Hz, 2H, H2'); 0,89 (t, J = 8,0 Hz, 3H, H3').

^{13}C RMN (100 MHz, (CD3)2CO): δ 173,5 (C9); 145,9 (C7); 144,5 (C6); 130,6 (C3); 121,0 (C4); 116,8 (C5); 116,0 (C8); 65,6 (C1); 36,5 (C2); 35,2 (C1'); 19,0 (C2'); 13,8 (C3').

Hexanoato 3,4-di-hidroxifenilo (HT6)

^{1}H RMN (400 MHz, (CD3)2CO): δ 6,75 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H5); 6,74 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H8); 6,58 (dd, J3 = 8,0 Hz, J4 =2,0 Hz, 1H, H4); 4,18 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H1); 2,77 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H2); 2,26 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H1'); 1,57 (quint, J = 8,0 Hz, 2H, H2'); 1,28 (m, 4H, H3'-H4'); 0,88 (t, J = 8,0 Hz, 3H, H5').

^{13}C RMN (100 MHz, (CD3)2CO): δ 172,8 (C9); 145,0 (C7); 143,6 (C6); 129,7 (C3); 120,1 (C4); 115,9 (C5); 115,2 (C8); 64,7 (C1); 34,3 (C2); 33,7 (C1'); 31,1 (C2'); 24,5 (C3'); 22,1 (C4'); 13,3 (C5').

Octanoato de 3,4-di-hidroxifenilo (HT8)

^{1}H RMN (400 MHz, (CD3)2CO): δ 6,75 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H5); 6,74 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H8); 6,58 (dd, J3 = 8,0 Hz, J4 =2,0 Hz, 1H, H4); 4,17 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H1); 2,77 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H2); 2,26 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H1'); 1,57 (quint, J = 8,0 Hz, 2H, H2'); 1,28 (m, 6H, H3'-H6'); 0,88 (t, J = 8,0 Hz, 3H, H7').

^{13}C RMN (100 MHz, (CD3)2CO): δ 172,7 (C9); 145,0 (C7); 143,9 (C6); 129,7 (C3); 120,1 (C4); 115,8 (C5); 115,2 (C8); 64,7 (C1); 34,3 (C2); 33,8 (C1'); 31,5 (C2'); 24,8 (C3'); 24,8 (C4'); 22,4 (C5'); 22,4 (C6'); 13,4 (C7').

Decanoato de 3,4-di-hidroxifenilo (HT10)

^{1}H RMN (400 MHz, (CD3)2CO): δ 6,75 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H5); 6,74 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H8); 6,58 (dd, J3 = 8,0 Hz, J4 =2,0 Hz, 1H, H4); 4,17 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H1); 2,77 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H2), 2,26 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H1'); 1,57 (quint, J = 8,0 Hz, 2H, H2'), 1,29 (m, 12H, H3'-H8'); 0,88 (t, J = 8,0 Hz, 3H, H9').

^{13}C RMN (100 MHz, (CD3)2CO): δ 172,7 (C9); 145,0 (C7); 143,6 (C6); 129,7 (C3); 120,3 (C4); 115,9 (C5); 115,1 (C8); 64,6 (C1); 34,3 (C2); 33,8 (C1'); 31,7 (C2'); 24,8 (C3'); 24,8 (C5'); 24,8 (C6'); 22,4 (C7'); 22,4 (C8'); 13,5 (C9').

Dodecanoato de 3,4-di-hidroxifenilo (HT12)

^{1}H RMN (400 MHz, (CD3)2CO): δ 6,75 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H5); 6,74 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H8); 6,58 (dd, J3 = 8,0 Hz, J4 =2,0 Hz, 1H, H4); 4,17 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H1); 2,77 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H2), 2,26 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H1'); 1,57 (quint, J = 8,0 Hz, 2H, H2'), 1,29 (m, 16H, H3'-H10'); 0,88 (t, J = 8,0 Hz, 3H, H11').

^{13}C RMN (100 MHz, (CD3)2CO): δ 172,7 (C9); 145,0 (C7); 143,6 (C6); 129,7 (C3); 120,1 (C4); 115,8 (C5); 115,2 (C8); 64,7 (C1); 34,3 (C2); 33,8 (C1'); 31,7 (C2'); 24,8 (C3'); 24,8 (C4'); 24,8 (C5'); 24,8 (C6'); 22,4 (C7'); 22,4 (C8'); 22,4 (C9'); 22,4 (C10'); 13,5 (C11').

Tetradecanoato de 3,4-di-hidroxifenilo (HT14)

^{1}H RMN (400 MHz, (CD3)2CO): δ 6,75 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H5); 6,74 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H8); 6,57 (dd, J3 = 8,0 Hz, J4 =2,0 Hz, 1H, H4); 4,17 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H1), 2,76 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H2); 2,26 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H-1'); 1,56 (quint, J = 8,0 Hz, 2H, H2'); 1,29 (m, 20H, H3'-H12'); 0,88 (t, J = 8,0 Hz, 3H, H13').

^{13}C RMN (100 MHz, (CD3)2CO): δ 173,6 (C9); 145,8 (C7); 144,5 (C6); 130,6 (C3); 121,0 (C4); 116,8 (C5); 116,0 (C8); 65,6 (C1); 35,2 (C2); 34,7 (C1'); 32,6 (C2'); 25,7 (C3'); 25,7 (C4'); 25,7 (C5'); 25,7 (C6'); 25,7 (C7'); 23,3 (C8'); 23,3 (C9'); 23,3 (C10'); 23,3 (C11'); 23,3 (C12'); 14,5 (C13').

Hexadecanoato de 3,4-di-hidroxifenilo (HT16)

^{1}H RMN (400 MHz, (CD3)2CO): δ 6,75 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H5); 6,74 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H8); 6,58 (dd, J3 = 8,0 Hz, J4 =2,0 Hz, 1H, H4); 4,17 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H1); 2,76 (t, J = 8.0 Hz, 2H, H2); 2,26 (t, J = 8,0 Hz, 2H, H1'); 1,57 (quint, J = 8,0 Hz, 2H, H2'); 1,29 (m, 24H, H3'-H14'); 0,88 (t, J = 8,0 Hz, 3H, H15').

^{13}C RMN (100 MHz, (CD3)2CO): δ 173,6 (C9); 145,9 (C7); 144,5 (C6); 130,6 (C3); 122,0 (C4); 116,8 (C5); 116,0 (C8); 65,6 (C1); 35,2 (C2); 34,7 (C1'); 32,7 (C2'); 25,7 (C3'); 25,7 (C4'); 25,7 (C5'); 25,7 (C6'); 25,7 (C7'); 25,7 (C8'); 23,3 (C9'); 23,3 (C10'); 23,3 (C11'); 23,3 (C12'); 23,3 (C13'); 23,3 (C14'); 14,4 (C15').

Octanoato de 4- hidroxifenilo (TY8)

^{1}H RMN (400 MHz, (CD3)2CO): δ 7,11 (dd, J = 8,8, J = 4,4 Hz, 2H, H4 e H8); 6,77 (dd, J = 8,8 Hz, J =4,4 Hz, 1H, H5 e H7); 4,21 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H1); 2,83 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H2); 2,26 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H1'); 1,56 (quint, J = 7,2 Hz, 2H, H2'); 1,28 (m, 8H, H3'-H6'); 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 3H, H7').

^{13}C RMN (100 MHz, (CD3)2CO): δ 174,6 (C9); 157,9 (C6); 131,7 (C4 , C8); 130,7 (C3); 117,1 (C5, C7); 66,6 (C1); 36,0 (C2); 35,7 (C1'); 33,4 (C5'); 30,7 (C3',C4'); 26,7 (C2'); 24,3 (C6'); 15,3 (C7').

Hexadecanoato de 4- hidroxifenilo (TY16)

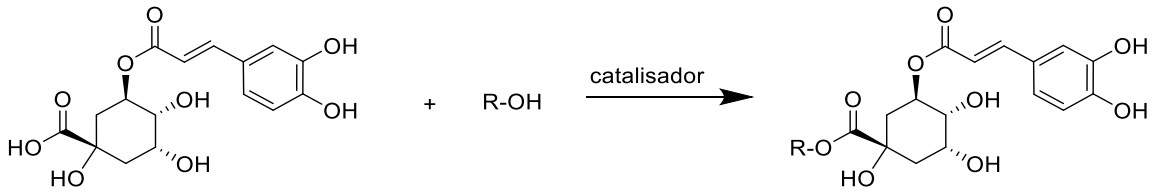
^{1}H RMN (400 MHz, (CD3)2CO): δ 7,09 (dd, J = 8,8, J = 4,4 Hz, 2H, H4 e H8); 6,77 (dd, J = 8,8 Hz, J =4,4 Hz, 1H, H5 e H7); 4,19 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H1); 2,83 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H2); 2,26 (t, J = 7,2 Hz, 2H, H1'); 1,57 (quint, J = 7,2 Hz, 2H, H2'); 1,29 (m, 24H, H3'-H14'); 0,88 (t, J = 6,8 Hz, 3H, H15').

^{13}C RMN (100 MHz, (CD3)2CO): δ 174,6 (C9); 157,9 (C6); 131,7 (C4 , C8); 130,7 (C3); 117,1 (C5, C7); 66,6 (C1); 36,0 (C2); 35,7 (C1'); 33,6 (C4',C13'); 26,7 (C2'); 24,3 (C14'); 15,3 (C15').

4. Síntese de ésteres do ácido clorogénico

Sintetizaram-se os ésteres derivados do ácido clorogénico por esterificação, adicionando ao ácido clorogénico, na proporção de (1:10, mol/mol) um álcool com cadeia alquílica a variar de um a dezasseis carbonos (*Figura 47*), de acordo com o procedimento descrito por *Giraldo et al*.[249] com algumas modificações.

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



CGA1: R= CH_3
CGA2: R= C_2H_5
CGA3: R= C_3H_7
CGA4: R= C_4H_9
CGA8: R= C_8H_{17}
CGA10: R= $C_{10}H_{21}$
CGA12: R= $C_{12}H_{25}$
CGA16: R= $C_{16}H_{33}$

Figura 47 - Síntese dos ésteres derivados do ácido clorogénico.

4.1. Síntese do clorogenato CGA1

Para um balão de fundo redondo contendo 120 mg de *molecular sieves*, transferiu-se 0,5 g de ácido clorogénico (Acros, 1,41 mmol), 34 mL de metanol e 2,36 g de amberlite. Deixou-se em refluxo durante 24 h. Filtrou-se a amberlite e os *molecular sieves*. Evaporou-se o metanol, obtendo-se um sólido de cor esbranquiçada.

4.2. Síntese dos clorogenatos CGA2-CGA4

Para um balão de fundo redondo transferiu-se 0,5 g de ácido clorogénico (Acros, 1,41 mmol), 14,1 mmol de álcool pretendido e 1 mL de H_2SO_4. Deixou-se a reagir durante 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente neutralizou-se a mistura reacional com uma solução de bicarbonato de sódio 2 M e extraiu-se a camada aquosa com 3 porções de 150 mL de éter etílico. Secou-se a camada orgânica com sulfato de

sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente, obtendo-se um sólido de cor esbranquiçada.

4.3. Síntese dos clorogenatos CGA6-CGA16

Para um balão de fundo redondo, transferiram-se 0,5 g de ácido clorogénico (Acros, 1,41 mmol), 0,5 g de novoenzym, 0,180 g de molecular sieves, 14,1 mmol de álcool pretendido e 2 mL de tetraidrofurano. Deixou-se a reagir durante 7 dias a uma temperatura de 65ºC. Posteriormente filtrou-se a enzima e os molecular sieves. Evaporou-se o tetraidrofurano, dissolveu-se o resíduo em 80 mL de acetato de etilo e lavou-se com 6 porções de 30 mL de bicarbonato de sódio 0,6 M. Secou-se a camada orgânica com sulfato de sódio anidro e filtrou-se. Evaporou-se o solvente, obtendo-se um sólido de cor esbranquiçada. Realizou-se a purificação por cromatografia em coluna utilizando com eluente tolueno:acetato de etilo (9:1, v/v).

4.4. Caraterização espetroscópica dos ésteres derivados do ácido clorogénico

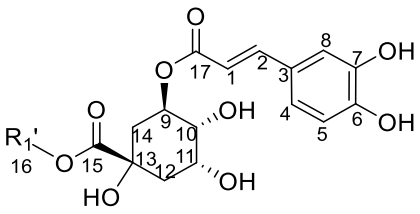


Figura 48 - Estrutura numerada dos ésteres clorogenatos.

Clorogenato de metilo (CGA1)

^{1}H RMN (CD_3OD, 400 MHz): δ 1.96-2.30 (m, 4H, H-12, 14); 3.72 (s, 3H, H-16); 3.76 (dd, J=7.5, 3.1 Hz, 1H, H-10); 4.07-4.27 (m, 1H, H-11); 5.19-5.40 (m, 1H, H-9); 6.24 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-1); 6.81 (d, J=8.2 Hz, 1H, H-5); 6.98 (dd, J=8.2, 1.9 Hz, 1H, H-4); 7.07 (d, J=1,9 Hz, 1H, H-8); 7.55 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-2).

^{13}C RMN (CD_3OD, 100 MHz): δ 37.79 (C-12); 38.04 (C-14); 52.96 (C-16); 70.32 (C-11); 72.11 (C-9); 72.57 (C-10); 75.83 (C-13); 115.07 (C-8); 115.13 (C-1); 116.54 (C-5); 122.96 (C-4); 127.65 (C-3); 146.85 (C-2); 147.18 (C-7); 149.67 (C-6); 168,27 (C-17); 175.42 (C-15).

Clorogenato de etilo (CGA2)

^{1}H RMN (C_3D_6O, 400 MHz): δ 1.23 (t, J=7.1 Hz, 3H, H-18); 1.96-2.30 (m, 4H, H-12, 14); 3.66-3.79 (m, 1H, H-10); 4.08-4.18 (m, 3H, H-16,11); 5.28-5.41 (m, 1H, H-9); 6.25 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-1); 6.87 (d, J=8.2 Hz, 1H, H-5); 7.05 (dd, J=8.2, 2.0 Hz, 1H, H-4); 7.16 (d, J=2.0 Hz, 1H, H-8); 7.54 (d=15.9 Hz, 1H, H-2).

^{13}C RMN (C_3D_6O, 100 MHz): δ 14.16 (C-18); 37.80 (C-12); 38.69 (C-14); 61.53 (C-16); 70.75 (C-11); 71.34 (C-9); 73.06 (C-10); 75.74 (C-13); 115.01 (C-8); 115.65 (C-1); 116.24 (C-5); 122.34 (C-4); 127.47 (C-3); 145.58 (C-2); 146.17 (C-7); 148.61 (C-6); 166.77 (C-17); 173.80 (C-15).

Clorogenato de propilo (CGA3)

^{1}H RMN (CD_3OD, 400 MHz): δ 0.95 (t, J=7.4 Hz, 3H, H-19); 1.63-1.76 (m, 2H, H-18); 1.99-2.31 (m, 4H, H-12, 14); 3.78 (dd, J=7.4, 3.1 Hz, 1H, H-10); 4.02-4.14 (m, 2H, H-16); 4.14-4.23 (m, 1H, H-11); 5.27-5.37 (m, 1H, H-9); 6.26 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-1); 6.82 (d, J=8.2 Hz, 1H, H-5); 6.99 (dd, J=8.2, 2.0 Hz, 1H, H-4); 7.08 (d, J=2.0 Hz, 1H, H-8); 7.57 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-2).

^{13}C RMN (CD_3OD, 100 MHz): δ 10.16 (C-19); 22.45 (C-18); 37.32 (C-12); 37.61 (C-14); 67.66 (C-16), 69.88 (C-11), 71.73 (C-9), 72.14 (C-10), 75.38 (C-13), 114.65 (C-8), 114.70 (C-1), 116.11 (C-5), 122.53 (C-4), 127.72 (C-3), 146.43 (C-2), 146.76 (C-7), 149.25 (C-6), 167.85 (C-17), 174.62 (C-15).

Clorogenato de butilo (CGA4)

^{1}H RMN (CD_3OD, 400 MHz): δ 0.94 (t, J=7.4 Hz, 3H, H-20); 1.34-1.46 (m, 2H, H-19); 1.56-1.73 (m, 2H, H-18); 1.97-2.34 (m, 4H, H-12,14); 3.78 (dd, J=7.4, 3.1 Hz, 1H, H-10); 3.99-4.26 (m, 2H, H-11,16); 5.28-5.36 (m, 1H, H-9); 6.26 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-1); 6.82 (d, J=8.2 Hz, 1H, H-5); 6.99 (dd, J=8.3 Hz, 1H, H-4); 7.08 (d, J=2.0 Hz, 1H, H-8); 7.57 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-2).

^{13}C RMN (CD_3OD, 100 MHz): δ 13.98 (C-20); 20.09 (C-19); 31.64 (C-18); 37.74 (C-12); 38.05 (C-14); 66.37 (C-16); 70.25 (C-11); 72.21 (C-9); 72.56 (C-10); 75.75 (C-13); 115.07 (C-8); 115.14 (C-1); 116.54 (C-5); 122.96 (C-4); 127.66 (C-3); 146.90 (C-2); 142.22 (C-7); 149.74 (C-6); 168.27 (C-17); 175.06 (C-15).

Clorogenato de octilo (CGA8)

^{1}H RMN (CD_3OD, 400 MHz): δ 0.93 (t, J=6.9 Hz, 3H, H-24); 1.32 (d, J=19.4 Hz, 10H, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23); 1.64 (dd, J=14.3, 7.0 Hz, 2H, H-18); 1.97-2.31 (m,

4H, H-12,14); 3.77 (dd, J=7.1, 3.1 Hz, 1H, H-10); 4.05-4.14 (m, 2H, H-16); 4.14-4.22 (m, 1H, H-11); 5.24-5.38 (m, 1H, H-9); 6.24 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-1); 6.82 (d, J=8.2 Hz, 1H, H-5); 6.98 (dd, J=8.2, 1.9 Hz, 1H, H-4); 7.07 (d, J=1.9 Hz, 1H, H-8); 7.56 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-2).

^{13}C RMN (CD_3OD, 100 MHz): δ 14.34 (C-24); 23.60 (C-23); 26.84 (C-19); 29.46 (C-18); 30.19 (C-20); 30.22 (C-21); 32.81 (C-22); 37.43 (C-12); 37.95 (C-14); 66.58 (C-16); 69.97 (C-11); 72.10 (C-10,9); 75.55 (C-13); 114.94 (C-8); 115.07 (C-1); 116.46 (C-5); 122.90 (C-4); 127.55 (C-3); 146.83 (C-2); 147.18 (C-7); 149.68 (C-6); 168.14 (C-17); 174.98 (C-15).

Clorogenato de decilo (CGA10)

^{1}H RMN (CD_3OD, 400 MHz): δ 0.92 (t, J=6.8 Hz, 3H, H-26); 1.30 (d, J=18.1 Hz, 14H, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25); 1.57-1.72 (m, 2H, H-18); 1.97-2.32 (m, 4H, H-12,14); 3.77 (dd, J=7.1, 3.1 Hz, 1H, H-10); 4.06-4.14 (m, 2H, H-16); 4.20-4.14 (m, 1H, H-11); 5.41-5.22 (m, 1H, H-9); 6.24 (d, J=15,9 Hz, 1H, H-1); 6.81 (d, J=8.2 Hz, 1H, H-5); 6.98 (dd, J=8.2, 1.9 Hz, 1H, H-4); 7.07 (d, J=1.9 Hz, 1H, H-8); 7.56 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-2).

^{13}C RMN (CD_3OD, 100 MHz): δ 14.42 (C-26); 23.71 (C-25); 26.91 (C-19); 29.53 (C-18): 30.29 (C-20); 30.41 (C-21); 30.58 (C-22); 30.61 (C-23); 33.02 (C-24); 37.57 (C-12); 38.02 (C-14); 66.65 (C-16); 70.03 (C-11); 72.25 (C-11,9); 75.63 (C-13); 115.00 (C-8); 115.14 (C-1); 116.53 (C-5); 122.97 (C-4); 127.61 (C-3); 146.91 (C-2); 147.26 (C-7); 149.76 (C-6); 168.21 (C-17); 175.05 (C-15).

Clorogenato de dodecilo (CGA12)

^{1}H RMN (CD_3OD, 400 MHz): δ 0.93 (t, J=6.9 Hz, 3H, H-28); 1.21-1.41 (m, 18H, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27); 1.57-1.73 (m, 2H, H-118); 1.98-2.31 (m, 4H, H-12,14); 3.75 (dd, J=7.2, 3.1 Hz, 1H, H-10); 4.07-4.15 (m, 2H, H-16); 4.21-4.15 (m, 1H, H-11); 5.40-5.23 (m, 1H, H-9); 6.24 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-1); 6.82 (d, J=8.2 Hz, 1H, H-5); 6.98 (dd, J=8.3, 2.0 Hz, 1H, H-4); 7.08 (d, J=2.0 Hz, 1H, H-8); 7.56 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-2).

^{13}C RMN (CD_3OD, 100 MHz): δ 14.22 (C-28); 23.51 (C-27); 26.69 (C-19); 30.08 (C-18): 30.39 (C-20, 21, 22, 23, 24, 25); 32.84 (C-26); 37.31 (C-12); 37.80 (C-14); 66.43 (C-16); 69.88 (C-11); 72.02 (C-9); 72.13 (C-10); 75.44 (C-13); 114.80 (C-8); 114.98 (C-1); 116.31 (C-5); 122.75 (C-4); 127.41 (C-3); 146.68 (C-2); 147.03 (C-7); 149.51 (C-6); 168.00 (C-17); 174.83 (C-15).

Clorogenato de hexadecilo (CGA16)

^{1}H RMN (CD_3OD, 400 MHz): δ 0.92 (t, J=6.8 Hz, 3H, H-32); 1.28 (d, J=13.6 Hz, 26H, H-19, H-20, H-21, H-22, H-23, H-24, H-25, H-26, H-27, H-28, H-29, H-30, H-31); 1.63 (dd, J=13.5, 6.6 Hz, 2H, H-18); 1.97-2.36 (m, 4H, H-12,14); 3.76 (dd, J=7.1, 3.1 Hz, 1H, H-10); 4.02-4.13 (m, 2H, H-16); 4.13-4.19 (m, 1H, H-11); 5.23-5.36 (m, 1H, H-9); 6.23 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-1); 6.80 (d, J=8.2 Hz, 1H, H-5); 6.96 (dd, J=8.2, 2.0 Hz, 1H, H-4); 7.06 (d, J=2.0 Hz, 1H, H-8); 7.55 (d, J=15.9 Hz, 1H, H-2).

^{13}C RMN (CD_3OD, 100 MHz): δ 14.43 (C-32); 23.73 (C-31); 26.91 (C-19); 29.53 (C-18): 30.61 (C-20, 21, 22, 23, 24, 25. 26. 27. 28. 29); 33.07 (C-30); 37.61 (C-12); 38.03 (C-14); 66.65 (C-16); 70.10 (C-11); 72.24 (C-9); 72.37 (C-10); 75.66 (C-13); 115.03 (C-8); 115.15 (C-1); 116.53 (C-5); 122.97 (C-4); 127.63 (C-3); 146.90 (C-2); 147.25 (C-7); 149.74 (C-6); 168.22 (C-17); 175.05 (C-15).

5. Síntese de derivados do ácido diidrocafeico

Sintetizaram-se dois ésteres do ácido 3,4-diidroxicinamico (DH) por esterificação do DH com um álcool gordo octanol e hexadecanol *Figura 49*.

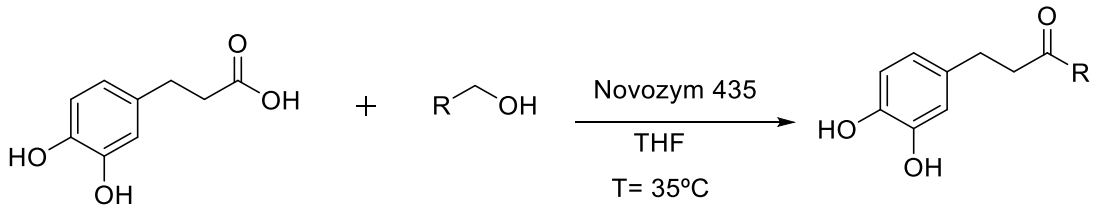


Figura 49 - Síntese de derivados diidrocafeiatos.

Num balão de fundo redondo, colocaram-se 3,24 mmol DH e 9,72 mmol do álcool , 0,972 g de enzima Novozym 435 e 33 mL de THF. Deixou-se a reação a 35°C durante 4 dias. No fim da reação, filtrou-se a enzima e procedeu-se à purificação da mistura por cromatografia em coluna, usando sílica 0,063-0,200 mm como fase estacionária e éter de petróleo/acetato de etilo 4:1 (v: v) como eluente. Acompanhou-se a purificação por cromatografia de camada fina (revelação UV e câmara de iodo). Após evaporação do solvente, os ésteres obtidos foram identificados por ^{1}H-RMN e ^{13}C-RMN.

5.1. Caraterização espetroscópica dos ésteres do ácido diidrocafeico

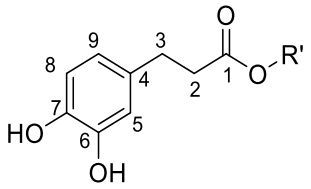


Figura 50 – Estrutura numerada dos ésteres diidrocafeiatos.

Diidrocafeiato de octilo (DH8)

^{1}H RMN (CD_3OD, 400 MHz): δ 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H, H8´), 1.30 (m, 10 H, H-7'-3'), 1.58 (m, 2 H H-2'), 2.54 (t, J = 7.6 Hz, 2H, H2), 2.76 (t, J = 7.6 Hz, 2 H, H3), 4.02 (t, J = 6.8 Hz, 2H- H-1'), 6.55 (dd, J = 8,0 1.8 Hz, 1-H, 9H), 6.71 (d, J = 1.8 Hz, 1H, 5H), 6.72 (d, J = 8.0 Hz, 1H, 8H).

^{13}C RMN (CD_3OD, 100 MHz): δ 15,3 (C-8'); 24,3 (C-7'); 27,6 (C-3'); 30,5 (C-2'); 30,9 (C-4',5'); 33,5 (C-6'); 37,8 (C-2); 65,7 (C-1'); 117,0 (C-8); 117,2 (C-5); 121,9 (C-9); 134,4 (C-4); 145,2 (C-7); 146,8 (C-6); 174.1 (C-1).

Diidrocafeiato de hexadecilo (DH16)

^{1}H RMN (CD_3OD, 400 MHz): δ 0,88 (t, J = 6.8 Hz, 3H, H-16'), 1.29 (m, 26H, H-15'-3'), 1,58 (m, 2H, H-2'), 2,53 (t, J = 7,6 Hz, 2H, H2), 2,76 (t, J = 7,60 Hz, 2 H-H3), 4,02 (t, J = 6,8 Hz, 2 H-H1'), 6,55 (dd, J = 8,0, J =1,8 Hz, 1H, H-9), 6,71 (d, J = 1,8 Hz, 1 H-5), 6,72 (d, J = 8,0 Hz, 1 H, H-8).

^{13}C RMN (CD_3OD, 100 MHz): δ 15,3 (C-16'); 24,3 (C-15'); 27,6 (C-3'); 30,3 (C-2'); 31,4 (C-4',13'); 32,1 (C-3); 36,6 (C-14'); 37,8 (C-2); 65,7 (C-1') 117,0 (C-8), 117,2 (C-5), 121,3 (C-9); 134,4 (C-4), 145,2 (C-7); 146,8 (C-6); 174,1 (C-1).

6. Preparação dos sistemas emulsionados

6.1. Obtenção do óleo de peixe e do azeite livre de antioxidantes naturais



Neste trabalho utilizou-se como fase oleosa o óleo de peixe e o azeite.

Os principais constituintes do óleo de peixe e do azeite são os ácidos gordos sob a forma de triacilglicerois (TAGs). Os ácidos gordos presentes no óleo de peixe em maior quantidade são os ácidos linolénico, o ácido icosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico. Já o azeite apresenta quantidades apreciáveis de ácidos oléico, palmítico, palmitoleico, esteárico e linoleico. O alto teor em ácido oleico (55 – 83 %), confere ao azeite elevada estabilidade em comparação com o óleo de peixe e outros óleos vegetais, e leva a que este seja considerado uma gordura essencialmente monoinsaturada [250].

O azeite contém igualmente α, β, γ e δ tocoferóis em quantidades variáveis (normalmente entre 100 a 200 ppm), bem como compostos fenólicos como o hidroxitirosol e o 3,4-DHPEA-EDA, cuja concentração total poderá ir até cerca de 1000 ppm. O óleo de peixe apenas apresenta α-tocoferol na sua composição. De modo a que estes compostos não interferiram com as experiências da determinação da distribuição dos antioxidantes, bem como com a avaliação da sua atividade antioxidante em emulsões, tornou-se necessário proceder á remoção destes antioxidantes do seguinte modo:

- Removeram-se os compostos fenólicos do azeite através de extração líquido-líquido com uma solução fortemente alcalina;

- Removeram-se os tocoferóis do óleo de peixe e do azeite passando o óleo por uma coluna de alumina sob pressão de azoto.

6.1.1. Remoção de compostos fenólicos

Removeram-se os compostos fenólicos presentes no azeite comercial através de uma extração líquido-líquido [251]. Para o efeito colocou-se 1 L de azeite (aproximadamente 820 g) num funil de separação e efetuaram-se 4 extrações (4 × 300 mL) com NaOH 0,5 M.

Lavou-se a fase oleosa com uma solução de HCl 0,5 M (2 × 200 mL) e finalmente com solução saturada de NaCl (5× 200 mL). Por último, secou-se a fase oleosa resultante com sulfato de sódio anidro e filtrou-se sob pressão reduzida.

Armazenou-se o azeite livre dos compostos fenólicos no frigorífico (4 ºC) até á remoção dos tocoferóis.

6.1.2. Remoção de tocoferóis

Os tocoferóis presentes no óleo de peixe comercial e no azeite foram removidos segundo o procedimento descrito por *Yoshida* [252]. Para tal, utilizou-se uma coluna cromatográfica contendo alumina como fase estacionária.

Ativou-se 400 g de alumina (óxido de alumínio 90, 0,056 – 0,200 mm, Merck) lavando-a com água desionizada. Posteriormente filtrou-se sob vácuo e secou-se a alumina ativada numa mufla a 200ºC durante 24 horas.

Os tocoferóis foram removidos passando o óleo de peixe e o azeite pela coluna cromatográfica com alumina ativada. Realizou-se a eluição sob pressão de azoto e recolheu-se o óleo num matraz, totalmente ao abrigo da luz, para evitar a fotoxidação.

6.1.3. Quantificação dos fenóis totais no azeite preparado [253]

Procedeu-se à ativação de uma coluna de SPE (Solid Phase Extraction) da Supelco, discovery DSC-Diol 60 mL, com 60 mL de metanol, seguido de 60 mL de hexano.

Dissolveram-se 25 g da amostra de azeite em 30 mL de hexano e transferiu-se quantitativamente essa solução para a coluna. Seguidamente, lavou-se com 80 mL de hexano. Extraíram-se os compostos fenólicos retidos na coluna com 4 porções de 60 mL de metanol, recolhendo-se o extrato para um balão de fundo redondo. Evaporou-se o solvente a uma temperatura inferior a 40 ºC, até à secura. Ao extrato fenólico adicionou-se 1 mL da solução metanol/água (1:1) e 2 mL de hexano, procedendo-se à mistura utilizando o vórtex. Centrifugou-se a mistura durante 10 minutos e separou-se a fase aquosa. Procedeu-se à filtração da fase aquosa utilizando um filtro GHP Acrodisc de 0,2 µm e analisou-se esta por HPLC.

6.1.4. Determinação dos ácidos gordos do óleo de peixe e do azeite

Analisou-se a composição em ácidos gordos dos óleos após a reação de transesterificação e a obtenção dos respetivos ésteres metílicos (FAMEs), *Figura 51*.

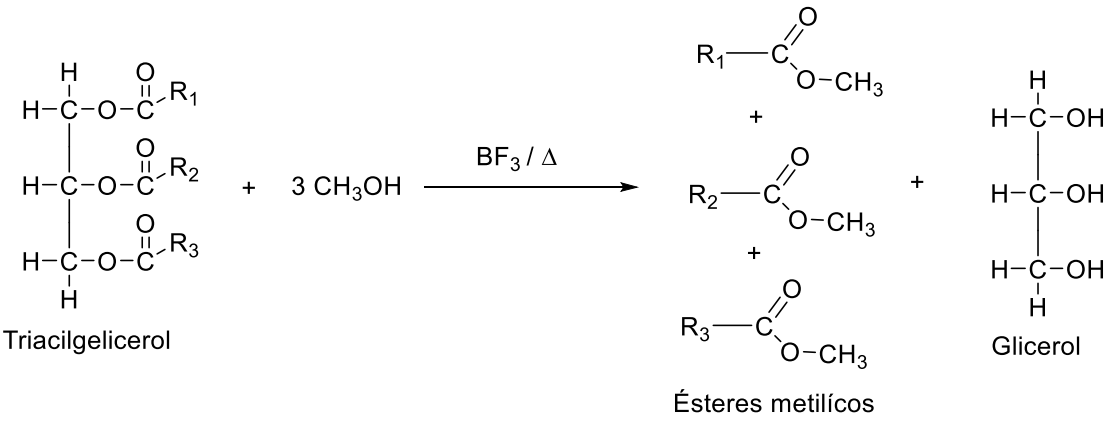


Figura 51 – Reação de transesterificação [254].

Pesaram-se aproximadamente 200 mg dos óleos utilizados ao longo do estudo para um tudo de hidrólise e adicionaram-se 2 mL de uma solução de BF_3 em MeOH. Aqueceu-se a mistura reacional em banho-maria durante 30 minutos. Arrefeceu-se a solução em gelo e adicionaram-se 5 mL de éter etílico. Lavou-se com 2 porções de 5 mL de salmoura e 1 de água e secou-se a fase etérea com sulfato de sódio anidro. Armazenou-se a amostra a -20 ºC até análise.

Efetuou-se a determinação dos ácidos gordos, após transesterificação, por cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (GC-FID). A identificação

dos ácidos gordos foi feita comparando os tempos de retenção relativos dos picos dos FAMEs das amostras com padrões.

Condições cromatográficas:

Coluna: DB Wax, 30 m × 0,53 mm i.d., 1µm
Detetor : Ionização de chama;
Temperatura do injetor: 205 ºC
Programa de temperatura: 110 ºC durante 5 minutos e depois aumentar para 200 ºC a uma velocidade de 3º C / min;
Temperatura do detetor: 205 ºC
Fluxo de Azoto: 10 mL/ min

6.2. Preparação de emulsões

Prepararam-se 10 mL de cada emulsão, misturando óleo purificado com tampão citrato (0,04 M e pH= 3.65) numa proporção de 1:9 ou 4:6 (O/A), com diferentes frações de emulsionante, Tween 80 ou Tween 20, (Φ= 0,005 – 0,040).

Para se formar a emulsão aplicou-se a agitação constante durante 1 minuto com um homogeneizador Polytron PT 1600 E, a uma velocidade de 20 000 r.p.m., formando-se assim uma mistura homogénea, opaca e de aspeto leitoso.

6.3. Preparação de nanoemulsões

Prepararam-se as nanoemulsões em duas etapas. Primeiro preparou-se uma emulsão numa proporção de 1:9, com diferentes frações de emulsionante Tween 80, (Φ_i= 0,005 – 0,040). Aplicou-se uma agitação constante durante 1 minuto com um homogeneizador Polytron PT 1600 E, a uma velocidade de 20 000 r.p.m. Na segunda etapa passou-se a emulsão anteriormente preparada através de um homogeneizador de alta pressão (Nozzle Z5, Nano DeBEE, Bee International, USA), a 2500 psi (137,5 MPa) durante 3 ciclos. Cobriu-se o aparelho com sacos de gelo para evitar a oxidação dos lípidos devido à alta temperatura causada pelas forças tangenciais. Uma vez preparadas as nanoemulsões foram armazenadas no frigorifico a 4ºC na ausência da luz. A olho nu, não se observou separação de fases durante o seu armazenamento.

6.3.1. Caracterização física das nanoemulsões

6.3.1.1. Morfologia das gotas da nanoemulsão

A morfologia das gotas da nanoemulsão preparadas foi analisada por microscopia eletrónica de varrimento de alta resolução a baixa temperatura (Crio-SEM) com Microanálise por Raios X e sistema para observação de amostras a baixa temperatura.

Nesta técnica, as amostras são colocadas sobre uma grelha, sendo arrefecidas rapidamente, mergulhando a amostra em azoto líquido subarrefecido. Depois desta fase inicial e sob condições de vácuo, transferiram-se as amostras para a câmara de preparação com a platina arrefecida. Nesta câmara, as amostras são fraturadas e sublimadas a uma temperatura de -90ºC durante 60 segundos, sendo revestidas por uma liga de ouro-paládio por pulverização iónica durante 40 segundos. Por fim, sob condições de vácuo, transferiram-se as amostras para a câmara do SEM, efetuando-se a observação das amostras a uma temperatura de -150ºC.

Observaram-se as amostras num microscópio JEOL JSM 6301F/ Oxford INCA Energy 350/ Gatan Alto 2500.

6.3.1.2. Tamanho da gota e polidispersão

Determinou-se a distribuição do tamanho das gotas e o índice de polidispersão (PDI) das nanoemulsões usando um DLS (Zetasizer Nano ZS-90, Malvern Instruments, Worcestershire, UK). Para as medições diluíram-se as nanoemulsões em solução tampão (1:10 v/v) antes da análise para evitar múltiplos efeitos de dispersão. Analisou-se cada amostra numa célula de poliestireno descartável (DTS0012, Malvern Instruments).

As medições realizaram-se em triplicado à temperatura ambiente e repetiu-se 3 vezes o procedimento para cada amostra.

6.3.1.3. Avaliação da estabilidade física das nanoemulsões

- **Método dispersão de Luz (DLS)**

De modo a avaliar a estabilidade das nanoemulsões preparadas, analisou-se por DLS a influência do tempo de armazenamento sobre o tamanho das gotículas e o índice de polidespersão a uma temperatura de 30ºC na ausência de luz. Para efetuar as

medições diluíram-se as nanoemulsões em solução tampão (1:10 v/v) antes da análise para evitar múltiplos efeitos de dispersão. Analisou-se cada amostra numa célula de poliestireno descartável (DTS0012, Malvern Instruments).

As medições realizaram-se em triplicado para cada amostra e à temperatura ambiente.

- **Método de dispersão de luz múltipla (MLS)**

Determinou-se a estabilidade das nanoemulsões preparadas por dispersão de luz múltipla (MLS) utilizando-se um Turbiscan Lab Expert (França).

Esta técnica é uma excelente ferramenta que permite de forma fácil determinar a estabilidade física das dispersões coloidais, uma vez que deteta fenómenos de desestabilização, sem recorrer à diluição da amostra.

O Turbiscan LAB Expert, encontra-se equipado com uma luz de infravermelho próximo (λ = 880 nm) e com dois detetores, um que deteta a luz retrodifundida ou refletida (BS) e outro que deteta a luz transmitida (T). Assim, o detetor T deteta a luz que passa através da amostra e o detetor BS deteta a luz difundida pela amostra para trás. Desta forma, estes dois detetores detetam flutuações no volume e tamanho das gotículas como resultado de fenómenos de migração ou agregação [255]. A migração das gotículas é causada por fenómenos reversíveis, nomeadamente, a sedimentação ou a formação de creme, enquanto a variação no tamanho das partículas é causada por fenómenos irreversíveis, com por exemplo a coalescência e floculação [276,281].

Colocou-se uma alíquota de cada nanoemulsão numa célula de vidro cilíndrico (4 cm de altura, 1,65 centímetro de diâmetro) e realizaram-se as medições a três alturas diferentes da célula, *Figura 52*. Repetiu-se este procedimento a diferentes intervalos de tempo para obter um perfil cinético que permitisse estudar a estabilidade das nanoemulsões com o tempo. Assim, as mudanças no tamanho das gotas das nanoemulsões devido aos processos de coalescência, floculação, sedimentação ou formação de creme, foram determinadas em função do tempo.

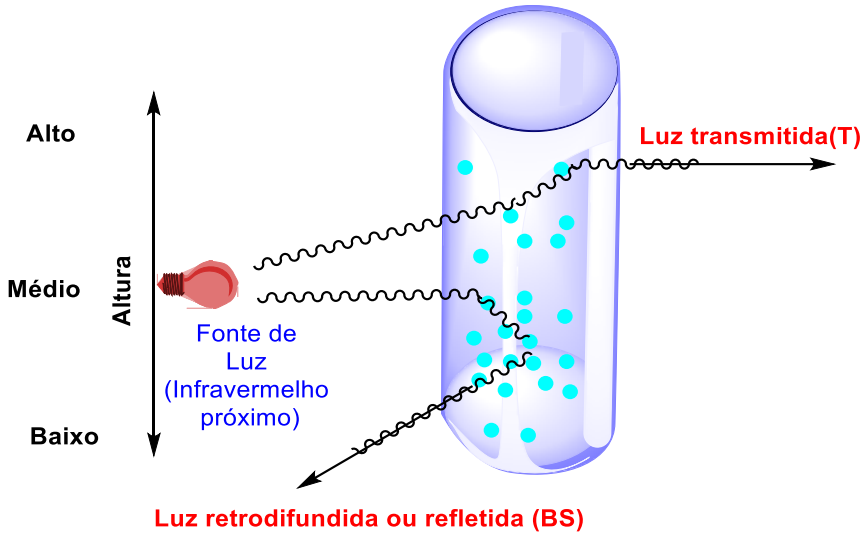


Figura 52 – Princípio do funcionamento do Turbiscan.

Analisaram-se os dados de BS em função da altura da célula ao longo de um tempo de envelhecimento de 16 dias (T = 30 ºC) para determinar o mecanismo predominante de desestabilização. Calcularam-se os valores do índice de estabilidade de Turbiscan (TSI), utilizados para avaliar a estabilidade física das nanoemulsões, empregando a seguinte equação:

$$TSI = \frac{\sum_j \left| Scan_{ref}(h_j) - Scan_i(h_j) \right|}{H}$$

Sendo:

$scan_{ref}$, valor da luz retrodifundida ou refletida inicial

$scan_i$, valor da luz retrodifundida ou refletida para um determinado tempo

hj, é altura na célula de medida

H, é a altura total da célula

Os gráficos cinéticos de destabilização mostram a variação do TSI com o tempo, sendo que, quanto maior o valor do TSI, menor a estabilidade do sistema.

6.3.1.4. Potencial Zeta

O potencial zeta é uma medida da magnitude da repulsão ou da atração eletrostática ou das cargas entre partículas, sendo um dos parâmetros fundamentais que, afetam a estabilidade. A sua medição oferece uma visão detalhada sobre as causas da dispersão, agregação ou floculação, podendo ser aplicada para melhorar a formulação das emulsões [256].

Determinou-se o potencial zeta nas nanoemulsões por medição do movimento das partículas quando sujeito a um determinado campo elétrico (mobilidade eletroforética), (Zetasizer Nano-Nanoseries ZS, Malvern Instruments, Worcestershire, RU). Para o efeito, diluíram-se as nanoemulsões em solução tampão (1:1000) e colocou-se na célula de medida. O software utilizou a equação de Smoluchowski para converter as medidas de mobilidade eletroforética em valores de potencial zeta.

7. Determinação da constante de partição P_A^0 em sistemas binários

Pode-se determinar a contante de partição, P_A^O, de um antioxidante numa mistura binaria O/A aplicando um método direto de análise baseado em medições espectrofotométricas, que permite quantificar o antioxidante existente em cada uma das fases de forma independente [105]. Para a determinação de P_A^O(*Figura 53*), preparou-se uma mistura binária 4:6 (V_{Total} =10 mL) de óleo de peixe purificado e solução aquosa (Tampão citrato 0,04 M e pH=3,65). Dissolveu-se cada antioxidante (os hidrófilos na fase aquosa e os hidrofóbicos na fase oleosa) de modo a obter uma concentração final de antioxidante de $3{,}5 \times 10^{-3}\ M$ no volume total da mistura binária. Termostatizou-se a mistura a 25 ºC e agitou-se com um homogeneizador *Polytron PT 1600 E* a uma velocidade de 20 000 r.p.m. Transferiu-se a mistura para um tubo de centrífuga e procedeu-se à separação das fases por centrifugação durante 45 minutos.

Preparou-se outra mistura binária 4:6 (óleo de peixe, solução tampão citrato 0,04M, pH=3), sem antioxidante, e procedeu-se do mesmo modo.

Diluiu-se uma alíquota (normalmente 30 µL) de cada fase (oleosa e aquosa) em 2,7 mL de uma mistura butanol:etanol (50:50, v/v) ou de tampão citrato, dependendo da

fase analisar e leu-se a absorvância das fases ao comprimento de onda adequado para cada composto.

A fim de quantificar a concentração de antioxidante em cada uma das fases, prepararam-se curvas de calibração absorvância-concentração para cada antioxidante utilizando como solvente solução tampão citrato 0,04 M, pH=3.65 ou uma mistura butanol:etanol (50:50, v/v), dependendo da solubilidade do antioxidante.

Efetuou-se esta determinação para todos os antioxidantes estudados em triplicado.

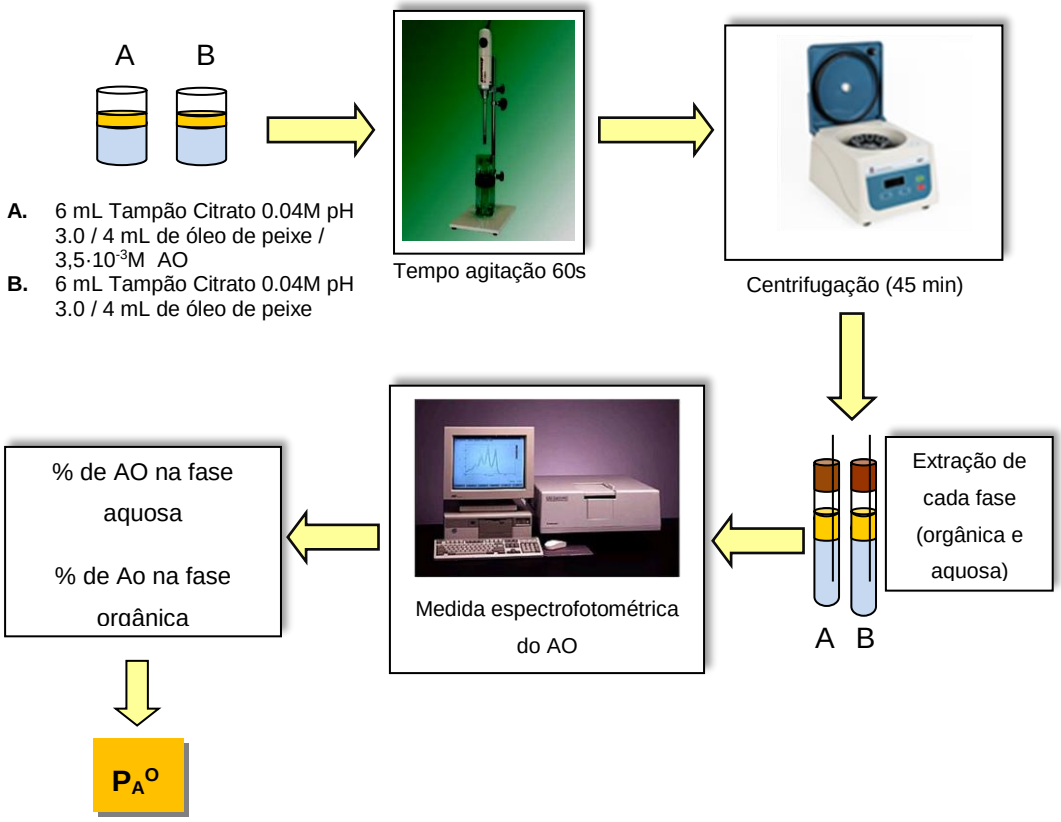


Figura 53 - Procedimento experimental seguido para a obtenção de P_A^O.

8. Determinação das constantes de partição

8.1. Síntese do sal de arenodiazónio

Sintetizou-se o sal de arenodiazónio a utilizar, de acordo com o procedimento descrito por Doyle [257]. Para o efeito, colocaram-se num gobelé 4,5 mL de $BF_3.Et_2O$ que se manteve em banho de gelo-acetona a -15 ºC. De seguida, dissolveram-se 2,45

g de 4-hexadecilanilina (0,008 mol) num volume mínimo de tetraidrofurano (THF) e adicionou-se esta solução ao $BF_3.Et_2O$ com agitação continua. À mistura resultante e em agitação adicionaram-se gota a gota 3,3 mL de n-butil nitrito (BuONO) (0,028 mol) iniciando-se a reação de diazotação.

Uma vez adicionado todo o BuONO colocou-se a mistura reacional num banho de gelo-acetona durante 20 minutos para assegurar que a reação fosse completa, *Figura 54*.

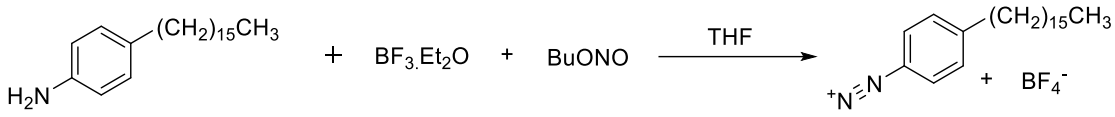


Figura 54 - Síntese do sal de arenodiazónio.

Decorrido este tempo, procedeu-se á purificação do sal obtido por cristalização com acetonitrilo e éter etílico. Filtrou-se o precipitado sob vácuo e recristalizou-se mais três vezes com acetonitrilo e éter etílico frio.

O produto obtido, é um sólido cristalino de cor branca que foi armazenado em condições adequadas de humidade, luminosidade e temperatura com o objetivo de minimizar a sua decomposição. Recristalizou-se o sal arenodiazónio obtido, periodicamente para garantir a sua pureza.

Realizou-se esta síntese várias vezes ao longo deste trabalho, com rendimentos entre os 75-85%, tendo o produto sido caracterizado por UV-Vis e RMN.

O sal arenodiazónio apresenta um espetro UV-Vis com um pico máximo de absorvância a 280 nm, típico de compostos de diazonio substituídos em posição *para*.

8.2. Método de derivatização: Formação de um corante

Para determinar as constantes de velocidade entre os iões 16-ArN_2^+ e os antioxidantes é empregue um método de derivatização [214, 258], que basicamente consiste em fazer reagir os iões arenodiazónio com um agente acopulante que dá lugar á formação de um corante azoico estável, que para desta forma a reação com o antioxidante de estudo.

Para que este método de derivatização seja útil para fins cinéticos, é necessário garantir que a velocidade da reação dos iões ArN_2^+ com o agente acopulante seja muito

maior que a reação dos iões ArN_2^+ com o antioxidante [214], de tal forma que a concentração do corante formado reflita a concentração do sal que não reagiu para esse instante [214, 221, 243]. Para tal foi necessário otimizar uma serie de variáveis que dependeram em grande parte do meio da reação e das condições experimentais sob as quais a reação iónica iria ocorrer.

A escolha do agente acopulante foi feita tendo em conta que os ensaios seriam realizados em meio ácido de modo a não modificar a acidez do meio com fim de minimizar reações competitivas entre os iões ArN_2^+ e os iões hidroxilo, e ser solúvel no solvente escolhido.

Assim utilizou-se como agente acopulante o N-1- (1-Naftil) etilenodiamina (NED) que dá lugar á formação de um corante azoico estável em meio ácido cujo espectro de absorção apresenta um máximo a 572 nm, *Figura 55*.

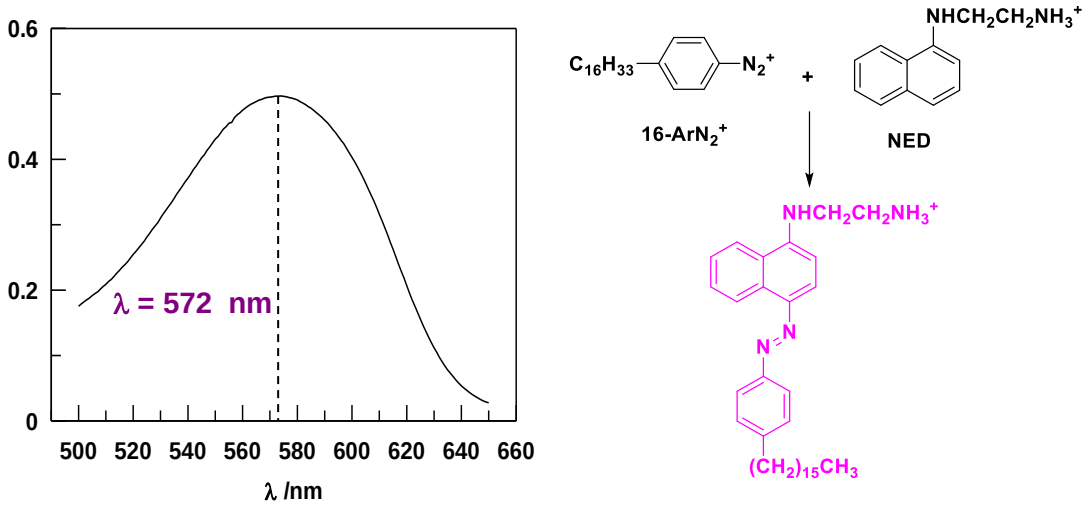


Figura 55 - Especto do corante azoico formado entre a reação $16ArN_2^+$ e o NED em meio emulsionado.

8.3. Determinação das constantes de velocidade k_{obs} aplicando o método de derivatização

Depois de preparada a emulsão ou a nanoemulsão, contendo AO, transferiu-se esta para uma célula termostatizada fechada, a uma temperatura de 25 ºC e em agitação continua com a finalidade de minimizar a separação das fases e favorecer a perfeita distribuição das soluções a seguir adicionadas. Em simultâneo termostatizou-se uma série de tubos de ensaio contendo 2,5 mL de solução de NED 0,0190 M. Uma vez alcançada a temperatura de trabalho na célula e nos tubos de ensaio, adicionou-se uma alíquota de 20 µL de uma solução de $16\text{-}ArN_2^+$ 0,17 M à emulsão ou nanoemulsão.

No momento em que se adiciona a alíquota de 16-ArN_2^+ inicia-se a reação com o antioxidante presente na emulsão. Retirou-se uma alíquota de 200 µL a tempos diferentes de reação e adicionou-se a um dos tubos de ensaio contendo solução de NED termostatizada, observando-se a rápida formação do corante azoico. Determinou-se a absorvância da solução contendo o corante obtido para cada tempo de reação a um comprimento de onda de 572 nm, *Figura 56*. Obteve-se o valor de k_{obs} para a decomposição dos iões arenodiazónio ajustando os dados absorvância-tempo à equação seguinte:

$$\ln\frac{A_t - A_\infty}{A_0 - A_\infty} = -k_{obs}t$$

onde A_t, A_0 e A_∞representam a absorvância a um tempo t, a absorvância inicial e a absorvância a um tempo infinito, respetivamente e k_{obs} é a constante de velocidade observada.

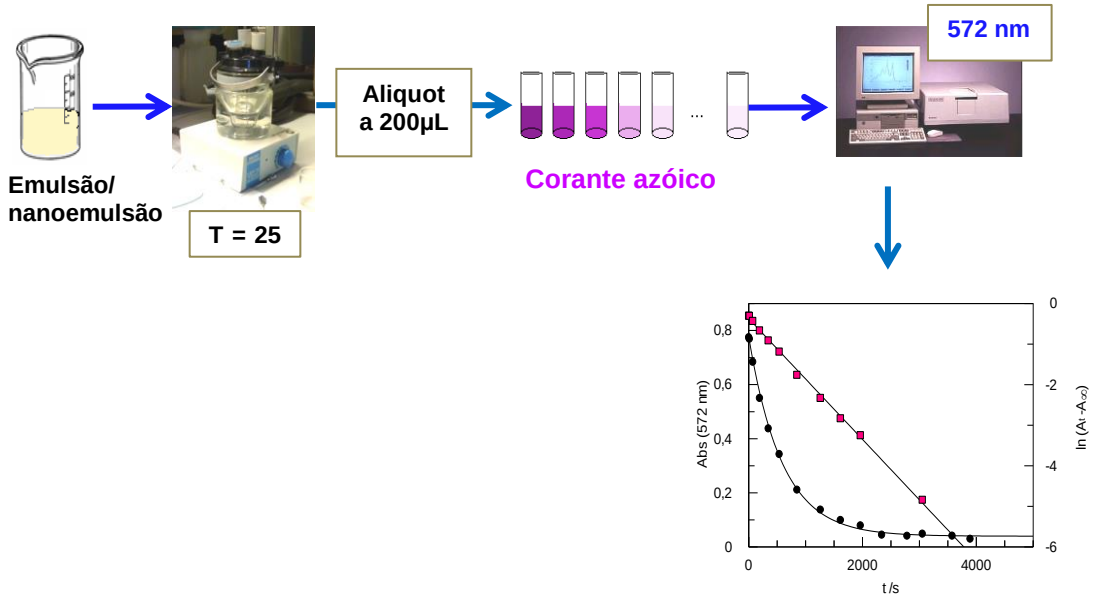


Figura 56 - Procedimento experimental seguido para a determinação do k_{obs}.

9. Avaliação da atividade antioxidante

A eficácia antioxidante depende, entre outros, fatores da sua localização no sistema emulsionado. Portanto para correlacionar a distribuição do antioxidante com a sua capacidade antioxidante é necessário ter em conta que essa atividade antioxidante depende, da reatividade das moléculas e em grande parte da localização onde ocorre a

reação de oxidação. Assim, realizaram-se estudos em meios homogéneos de modo a fazer uma avaliação da reatividade das moléculas e em meios emulsionados, de modo a entender o efeito da distribuição na atividade antioxidante.

9.1. Atividade antirradicalar frente ao radical DPPH [63]

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

A atividade antirradicalar define-se a partir do parâmetro EC_{50}, que representa a concentração necessária para o antioxidante captar 50% dos radicais iniciais do DPPH.

Efetuou-se a determinação dos valores do EC_{50} para os antioxidantes, medindo espectroscopicamente o desaparecimento do radical DPPH (λ=515 nm) utilizando diferentes concentrações de antioxidante.

Numa placa BD Falcon de 96 poços (8×12) de poliestireno, colocaram-se 250 µL da solução metanólica de DPPH (0,096 mM) e adicionaram-se 50 µL de uma solução metanólica de cada antioxidante (0,063 - 0,264 mol AO/ mol DPPH, concentração em cada poço). Determinou-se a absorvância a 515 nm por um período de 60 minutos, com intervalos de 5 minutos. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicado.

9.2. Avaliação da reatividade por voltametria cíclica.

Nas experiências de voltametria cíclica utilizou-se um potencióstato Hi-Tek, tipo DT 2101, e um gerador de ondas Hi-Tek tipo PPRI, conectado a um registador Philips, tipo PM 8043, e a uma célula de vidro de três elétrodos. O elétrodo de trabalho consistia num disco de carbono vítreo GmbH com 0,05 cm^2 de área, o elétrodo secundário uma espiral de platina e o elétrodo de referência uma piscina de mercúrio separada do elétrodo de trabalho por um capilar de Luggin.

Prepararam-se soluções stock de cada composto fenólico (10 mM) em etanol. As soluções de trabalho voltamétricas foram preparadas, na célula eletroquímica, diluindo 0,1 mL da solução stock inicial em 10 mL de eletrólito suporte, para obter uma concentração final de 0,1 mM. Preparou-se o eletrólito de suporte pH 7,3 diluindo 6,2 mL de hidrogenofosfato de dipotássio 0,2 M e 43,8 mL de dihidrogenofosfato de potássio

0,2 M a 100 mL. Preparou-se igualmente o eletrólito de suporte de pH 3,6 ajustando o pH de dihidrogenofosfato de potássio 0,1 M com ácido fosfórico. As emulsões foram preparadas diluindo 0,1 mL da solução stock em 10 mL de eletrólito suporte e adicionando 0,1 mL de uma solução Tween 80 ou Tween 20 de 0,6 g / mL. Colocou-se a solução durante 1 minuto num banho ultrassónico e depois adicionou-se à célula eletroquímica.

As condições experimentais utilizadas foram: velocidade de varrimento (V / s) = 0,1; potencial inicial (V) = -0,2; potencial de inversão (V) = 0,6; potencial final (V) = -0,2. No fim de cada experiência mediu-se a diferença do potencial do elétrodo de mercúrio, em relação a um elétrodo de referência (o elétrodo de Ag/AgCl). Entre as experiências, o elétrodo de trabalho foi repolido com pó de alumina (0,05 mm).

9.3. Teste da estufa de Schaal (“Schaal Oven Test”)

Realizou-se a avaliação antioxidante nos sistemas emulsionados utilizando um teste de aceleração oxidativa “Teste da estufa de Schaal“.

Prepararam-se os sistemas emulsionados em frascos previamente tratados com HCl 37 % para evitar a contaminação por metais.

Preparou-se cada emulsão/nanoemulsão em triplicado de acordo com o procedimento descrito na secção *6.2 e 6.3*. Adicionou-se cada antioxidante às emulsões/nanoemulsões numa concentração de 1,25 mM no óleo. Preparou-se também emulsões / nanoemulsões sem a adição de antioxidante (amostras controlo).

Colocaram-se as emulsões/nanoemulsões na estufa a 40 ºC para acelerar o processo de oxidação lipídica.

Periodicamente retiraram-se alíquotas de 12,5 µL ou 25 µL de cada amostra, determinando-se de seguida o conteúdo em dienos conjugados.

9.3.1. Determinação do Conteúdo em Dienos Conjugados

Os dienos conjugados que se formam durante o processo de oxidação podem ser determinados por espectrofotometria, pois apresentam uma forte banda de absorção a 233 nm.

Periodicamente, retiraram-se alíquotas (12,5µL ou 25 µL) de cada amostra sujeita ao teste de Schaal para balões volumétricos de 10 mL. Dissolveu-se cada amostra em etanol e analisou-se o conteúdo em dienos conjugados medindo a absorvância desta solução ao comprimento de onda de 233 nm.

Calculou-se a percentagem de dienos conjugados (% CD) usando a massa molecular relativa e a absortividade molar do hidroperóxido do ácido linoleico (280 g/mol, ε= 26000), segundo a *equação 53* :

$$\%\ CD = 1{,}0769\ \frac{Abs_{233\ nm}}{C_{\acute{o}leo\ peixe}\ \left(\frac{g}{L}\right)} \qquad \textbf{(53)}$$

Sendo:

$Abs_{233\ nm}$- a absorvância da solução;

$C_{\acute{o}leo\ de\ peixe}$ - Concentração do óleo na solução em g/ L;

9.3.2. Determinação do índice de peróxidos

A determinação do índice de peróxidos (IP), assenta no princípio de que os peróxidos, produtos primários da oxidação, reagem, em meio ácido, com iões iodeto, dando origem a iodo. A quantidade de iodo produzida por esta reação pode ser contabilizada por uma titulação com tiossulfato de sódio, na presença de amido [111]. A determinação do índice de peróxidos foi feita segundo a norma portuguesa NP EN ISO 3960:2004 - Determinação do índice de peróxidos.

Pesaram-se 0,200 g de óleo e adicionaram-se à amostra 5 mL de uma solução de ácido acético glacial/clorofórmio (3:2, v/v) agitando-se até a dissolução completa desta. Adicionou-se 0,5 mL de uma solução saturada de iodeto de potássio e permitiu-se que reagisse durante 1 min. No fim desse período adicionaram-se 5 mL de água destilada. Titulou-se a mistura com tiossulfato de sódio 0,01M, sob forte e constante agitação, até ao desaparecimento da cor forte amarela do iodo (amarelo), ponto no qual se adicionaram algumas gotas de cozimento de amido. A titulação continuou até ao desaparecimento da cor cinza azulada. O índice de peróxido, IP, é expresso em miliequivalentes por quilograma e calculado pela *equação 54*:

$$IP = \frac{1000 \times (V - V_0) \times C}{m} \quad (54)$$

Sendo:

V_0 – volume gasto, em mL, na titulação branco;

V – volume, em mL, da solução de tiossulfato de sódio usada na determinação;

C – a concentração, em M, da solução de tiossulfato de sódio usada na titulação;

m – a massa, em g, do óleo.

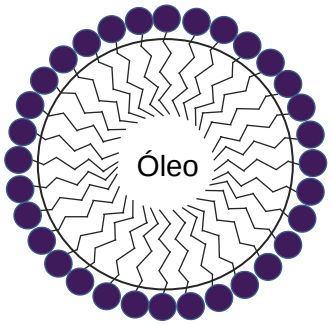
10. Análise estatística

Os resultados deste trabalho foram analisados estatisticamente por ANOVA (Analsys of Variance) com um nível de significância $p \leq 0,05$, usando o teste de Duncan.

A análise de regressão linear Stepwise (SLRA) foi aplicada aos dados para selecionar os preditores que melhor explicam a estabilidade. Para construir os modelos SLRA foi usado um $p \leq 0,05$ para o preditor entrar e $p > 0,1$ para o remover. O software utilizado foi o SPSS 25,0.

IV. Resultados e Discussão

Capítulo 1 – Caracterização Físico-Química dos sistemas emulsionados



Sistema emulsionado O/A

1. Emulsões O/A

1.1. Composição Química

Fase oleosa

Ao longo deste trabalho utilizou-se como fase oleosa o óleo de peixe e o azeite. Determinou-se a composição em ácidos gordos dos diferentes óleos, encontrando-se os resultados na *Tabela 6*.

	Óleo de peixe		**Azeite**	
Ácido gordo	Tempo retenção (min)	Quantidade (%)	Tempo retenção (min)	Quantidade (%)
Ácido Mirístico (C14:0)	11,43	3,3 ± 0,3	-----	-----
Ácido palmítico (C16:0)	13,59	15,7 ± 2,1	13,59	11,6 ± 0,2
Ácido palmitoleico (C16:1)	13,97	4,5 ± 0,1	-----	-----
Ácido esteárico (C18:0)	15,90	3,8 ± 1,1	15,96	2,7 ± 0,05
Ácido oleico (C18:1)	16,28	16,0 ± 0,7	16,41	76,2 ± 0,3
Ácido vacénico (C18:1n7)	16,36	4,9 ± 3,1	-----	-----
Ácido linolénico (C18:3)	18,70	7,2 ± 5,2	-----	-----
Ácido linoleico (C18:2)	-----	-----	17,00	9,5 ± 0,1
Ácido icosapentaenóico EPA (C20:5)	21,06	15,8 ± 7,1	-----	-----
Ácido docosahexaenóico DHA (C22:6)	23,81	28,8 ± 8,1	-----	-----

Tabela 6 – Composição em ácidos gordos do óleo de peixe e do azeite, dados obtido por cromatografia gasosa.

Verificou-se que os ácidos gordos maioritários polinsaturados do óleo de peixe são o ácido EPA e o DHA, com percentagens médias de aproximadamente 16% e 29%. Já o azeite é composto maioritariamente por ácido oleico (76%), apresentando cerca de 10% e 12% de ácido linoleico e palmítico, respetivamente.

Atendendo ao mecanismo de autoxidação, a estabilidade oxidativa dos PUFAs deveria ser inversamente proporcional ao seu número de hidrogénios bis-alílicos. No entanto, o estudo da oxidação de PUFAs altamente insaturados, como DHA (22:6, ω-3) e EPA (20:5, ω-3), muito comum em óleos de peixe, em sistemas micelares e

lipossomais, tem dado resultados inesperados. Em tais sistemas, a conformação destes ácidos gordos em presença de moléculas de água induz uma conformação espacial que leva a uma proteção dos hidrogénios alílicos sendo por isso um fator importante para a sua estabilidade. De fato, DHA ou o EPA, mostraram ser mais estáveis frente à oxidação do que o ácido linolénico (18: 3, ω-3) [259], e até do que o ácido linoleico, contrariamente ao que seria de esperar nestes sistemas. Portanto, a avaliação da atividade antioxidante de moléculas nos sistemas emulsionados neste estudo será efetuada sempre que possível utilizando óleo de peixe rico em ómega-3.

Fase aquosa

Utilizou-se como fase aquosa uma solução de tampão citrato, com uma concentração de 0,04 M, a pH=3,65. Utilizou-se o ácido cítrico devido ás suas propriedades como agente quelante, uma vez que forma complexos de coordenação metálica estáveis (tipicamente 1:1) que não catalisam a oxidação lipídica [260]. As contantes de quelação do ácido cítrico com os iões metálicos varia de 10^3 a 10^5 M^{-1}, sendo para o Fe(II) k=1600 M^{-1}. Estes valores são muito superiores aos descritos para as constantes de ligação dos polifenóis utilizados [261] com os iões metálicos que varia de 8 a 10^2 M^{-1}. Para o Fe(II), esta constante é de k=8 M^{-1}. Além disso, a concentração de ácido cítrico utilizada na preparação das emulsões é ~ 10 vezes superior à dos AOs. Portanto, as constantes de ligação do ácido cítrico são muito maiores para vestígios de metais quando comparadas com as dos AOs, ou seja, a concentração de complexos de iões citrato-metal 1:1 é pelo menos, 10^2 –10^3 vezes superior à dos complexos de AO- metal. Para Fe (II) e de acordo com as contantes de ligação, espera-se que a razão molar dos complexos citrato-ferro / AO-Fe seja cerca de 2000. [262].

Deste modo espera-se eliminar o possível efeito da presença de vestígios de metais no desenrolar da oxidação lipídica e na capacidade antioxidante das varias moléculas testadas.

Emulsionante

Ao longo deste trabalho, utilizaram-se emulsionantes não iónicos, Tween 80 e 20 (*Figura 57*). Estes emulsionantes são pouco sensíveis a mudanças de pH ou à adição de eletrólitos e permitem a obtenção de emulsões e nanoemulsões O/A. [263].

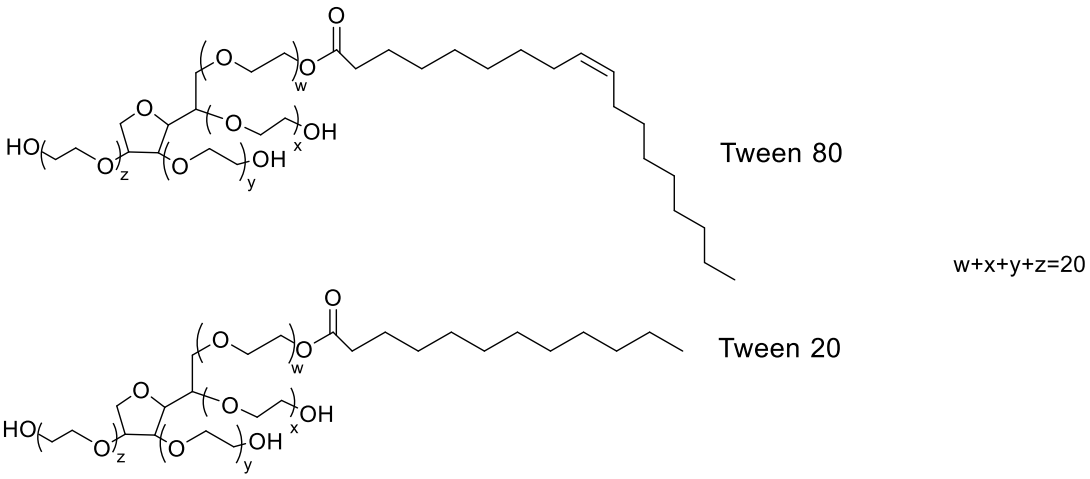


Figura 57 – Estrutura do Tween 80 e do Tween 20.

A utilização preferencial do emulsionante não iónico Tween 80 na preparação das emulsões/nanoemulsões O/A deveu-se o facto de apesar do alto valor de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB), este permite a formação de gotículas de tamanho muito pequeno, uma vez que a estrutura monoinsaturada do resíduo de ácido oleico possui um parâmetro de empacotamento superior ao das moléculas de Tween contendo ácidos gordos saturados (lineares) [264, 265].

A geometria molecular do emulsionante é classificada pelo parâmetro de empacotamento (p), que é a área da seção transversal do grupo da cauda em relação ao grupo da cabeça e é dada por:

$$p = \frac{a_T}{a_H} \quad \textbf{(}55\textbf{)}$$

Onde: a_T – área da cauda

a_H – área da cabeça

As diferenças no empacotamento do emulsionante na fronteiras óleo-água influenciam as características interfaciais, que provavelmente desempenham um papel importante na formação de gotículas pequenas. O Tween 20 (C12: 0), 40 (C16: 0) e 60 (C18: 0) possuem cadeias lineares saturadas, enquanto Tween 80 (C18: 1) possui uma cadeia insaturada. Assim, o Tween 80 apresenta ter um parâmetro de empacotamento (p) superior (devido à maior área de cabeça) do que o Tween 20, 40 ou 60 [264]. Assim

e de modo a obtermos nanoemulsões com tamanho de gota o menor possível, utilizou-se o emulsionante Tween 80.

1.2. Tamanho de gota, polidispersão e potencial zeta

O tamanho de gota e polidispersão das emulsões 1:9 e 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65/Tween 80) para a fração de emulsionante de Φ_I = 0,005, foram determinados por dispersão de luz dinâmica (DLS), T=25ºC. O instrumento calcula a distribuição do tamanho das gotas pela dependência angular da intensidade da luz dispersa pela emulsão usando a teoria de dispersão de Mie. Foi considerado o índice de refração do óleo de peixe de 1,59.

Na *Figura 58* mostra a intensidade relativa em função do tamanho médio de gota, obtido para as emulsões 1:9 e 4:6, para uma fração de emulsionante de Φ_I = 0,005.

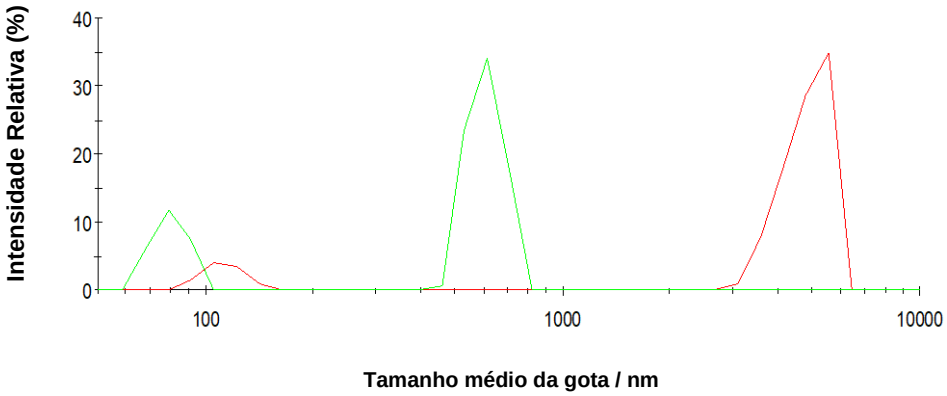


Figura 58 - Intensidade relativa em função do tamanho médio de gota, para emulsões 1:9 (verde) e emulsões 4:6 (vermelho), óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80.

O tamanho médio de gota aumentou, com o aumento da fase oleosa.

As emulsões mostram uma distribuição bimodal, mostrando dois picos, um mais estreito por volta dos 80 nm, e outro mais largo por volta dos 1000 nm para as emulsões 1:9 e por volta dos 80 nm e 5000 nm para as emulsões 4:6. A polidispersão é muito alta cerca de 0,91 para emulsões 1:9 e 1,33 para emulsões 4:6 , mostrando que as emulsões são polidispersas.

Determinou-se o potencial zeta, por DLS, para as emulsões 1:9 óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80, para cada fração de emulsionante utilizada, *Figura 59*.

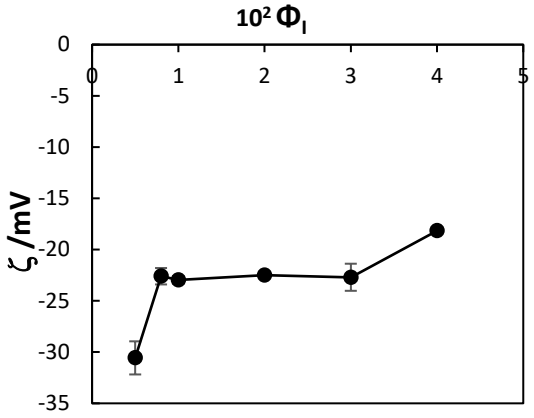


Figura 59 – Valores potencial Zeta **(mV)** em função da fração de emulsionante, para emulsões 1:9 óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80.

Através da *Figura 59*, observou-se que o potencial, aumentou com a fração de emulsionante, apresentando um valor entre -30 e -20, os valores absolutos foram inferiores a 30 mV, sugerindo que o principal mecanismo de estabilização é consequência da adsorção do emulsionante à interface óleo-água.

2. Nanoemulsão

2.1. Tamanho da gota, polidispersão e potencial zeta das nanoemulsões

2.1.1. Efeito do número de ciclos no tamanho de gota

De modo a serem preparadas nanoemulsões (1:9) a partir das emulsões (1:9) anteriormente preparadas com o óleo de peixe, analisou-se o número de ciclos, necessários de passagem através do homogeneizador de alta pressão para obter tamanhos de gota o mais baixo possível.

A *Figura 60* mostra a intensidade relativa (A) e o tamanho médio de gota (B) obtidos em função do número de ciclos, para a fração de emulsionante $\Phi_I = 0{,}0378$.

Depois de passar as emulsões através do homogeneizador de alta pressão, o tamanho médio de gota diminuiu notavelmente, com o aumento do número de ciclos, alcançando um valor constante ao fim de três ciclos, apresentando uma distribuição monomodal,

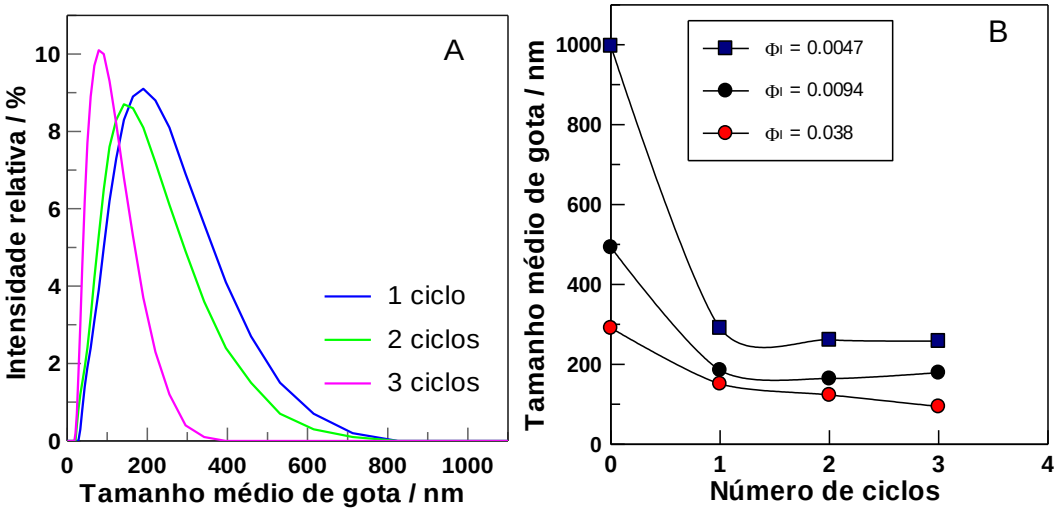


Figura 60 – (A) Intensidade relativa em função do tamanho médio de gota para os 3 ciclos; (B) Variação do tamanho médio de gota em função do número de ciclos para três frações de emulsionante Tween 80.

Assim prepararam-se, todas as nanoemulsões utilizando-se 3 ciclos de passagem, de modo obter tamanhos de gotículas o menor possível.

2.1.2. Efeito da concentração de emulsionante

2.1.2.1. Tamanho médio de gota

O tamanho médio de gota depende da quantidade de emulsionante empregue na preparação da nanoemulsão. A *Figura 61*(A) mostra a variação do tamanho médio das gotas em função da fração de emulsionante utilizada. O tamanho médio de gota diminuiu com o aumento da concentração de emulsionante de ~ 300 nm a 150 nm aumentando a fração de emulsionante de 0,005 a 0,04. Isto pode ser devido ao facto de os emulsionantes serem adsorvidos na interface óleo-água, aumentando a área interfacial enquanto reduzem a tensão interfacial, levando a tamanhos de gotas menores. Por outro lado, estando presente mais emulsionante para cobrir qualquer nova superfície, de gotas formadas durante a homogeneização, a superfície das gotículas será coberta mais rapidamente pelo emulsionante [23, 266, 267].

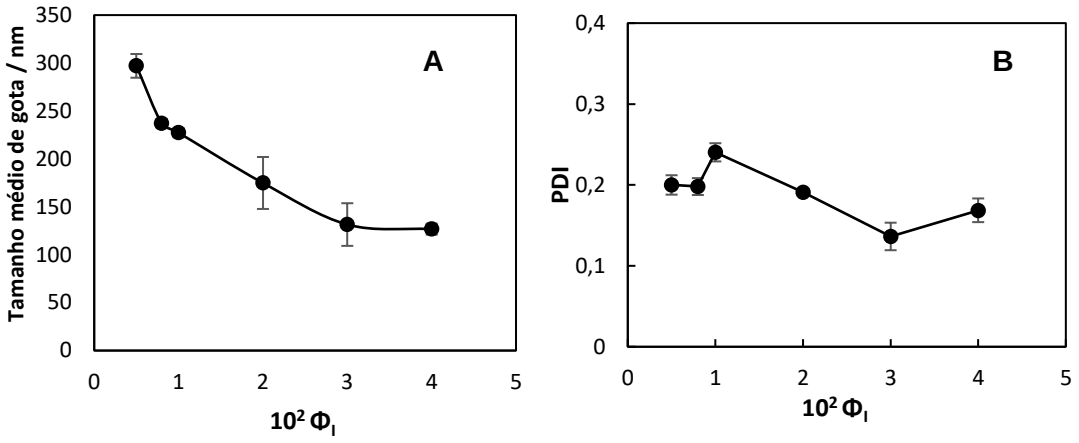


Figura 61 – (A) Tamanho médio da gota em função da fração de emulsionante, (B) valores da polidispersão (PDI) em função da fração de emulsionante, Φ_l, para nanoemulsões 1:9 óleo de peixe tampão citrato 0,04M, pH=3,65/ Tween 80.
.

Os valores de PDI, fornecem informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos. Amostras com valores de PDI iguais ou inferiores a 0,3, como as obtidas para as nanoemulsões preparadas (*Figura 61B*), são consideradas monodispersas [42, 268, 269].

2.1.2.2. Potencial Zeta

O potencial zeta é um parâmetro normalmente utilizado para a avaliação da estabilidade das nanoemulsões, fornecendo informações sobre a carga das gotas, especialmente quando emulsionantes não-iónicos são utilizados na preparação das nanoemulsões [20, 270]. Valores absolutos elevados de potencial zeta correspondem a dispersões estáveis cujo o principal mecanismo de estabilização é devido à repulsão eletrostática entre as gotas, entretanto valores mais baixos de potencial zeta são indicativos de estabilização estérica [271]. Determinou-se os valores de potencial zeta por DLS, os valores obtidos para as nanoemulsões são baixos, tal como esperado para nanoemulsões estabilizadas com emulsionantes não-iónicos, como o Tween 80. Dependendo da concentração de emulsionante, os valores de potencial zeta variam entre -18,2 a -13,5 mV. Em qualquer caso, os valores absolutos foram inferiores a 30 mV, sugerindo que o principal mecanismo de estabilização é consequência da adsorção do emulsionante à interface óleo-água. Curiosamente, o potencial zeta para as emulsões óleo em água com uma razão de 1: 9 mostrou um valor inferior (-22,6 mV) do que o encontrado para nanoemulsões (-15,70 mV) com a mesma razão de água e óleo

e a mesma concentração emulsionante (Φ_I=0,008), sugerindo que há uma diminuição do potencial zeta ao aumentar o tamanho da gota (*Tabela 5* e *Figura 62*).

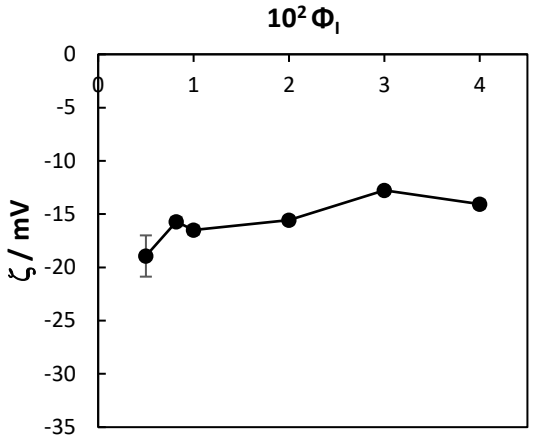


Figura 62 – Valores potencial Zeta **(mV)** em função da fração de emulsionante, para nanoemulsões 1:9 óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80.

2.2. Morfologia das nanoemulsões

Analisou-se a morfologia das gotas das nanoemulsões preparadas por microscópia eletrónica de varrimento de alta resolução, com microanálise por Raios X, com sistema para observação de amostras a baixa temperatura (Crio-SEM).

Na *Figura 63* encontram-se as imagens obtidas por Crio-SEM, para as frações de emulsionante de 0,005, 0,01 e 0,02.

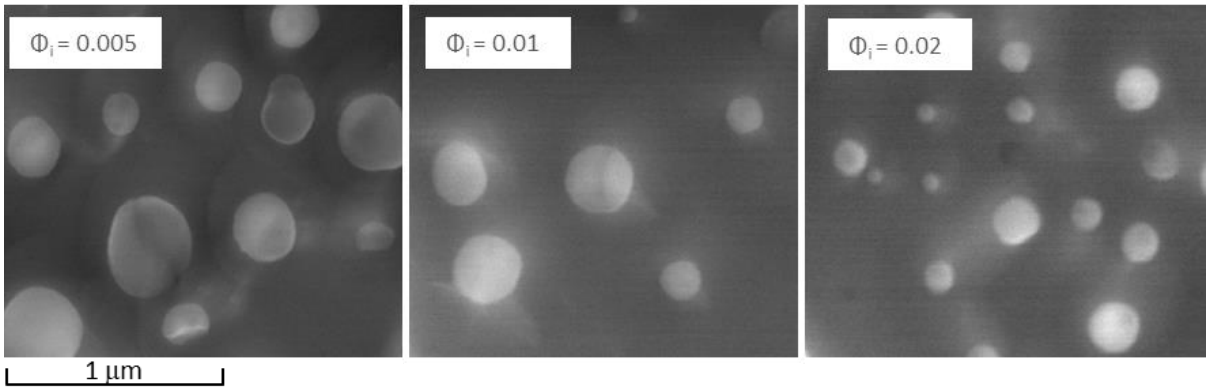


Figura 63 – Imagens de Cryo-SEM de nanoemulsões 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato), Φ_I =0,005 , Φ_I =0,01, e Φ_I =0,02.

Podemos verificar através da *Figura 63* que as gotas são esféricas, com um tamanho médio de 297 nm para frações de emulsionante 0,005, de 227 nm para frações

de emulsionante de 0,01 e de 175 nm para a fração de emulsionante de 0,02, estes dados estão de acordo com os obtidos por DLS.

2.3. Estabilidade física: Efeito do tempo de armazenamento

2.3.1. Variação do tamanho de gota médio e polidispersão ao longo do tempo - DLS

De modo avaliar a estabilidade das nanoemulsões preparadas, examinou-se a influência do tempo de armazenamento no tamanho das gotículas e no índice de polidispersão a T = 25 ° C, na ausência de luz.

A *Figura 64* mostra a variação dos tamanhos médios das gotículas com o tempo para diferentes frações de emulsionante utilizadas na preparação das nanoemulsões. O tamanho das gotas aumentou com o tempo até um valor constante ao fim de 3-4 dias, para todas as concentrações de emulsionante. O índice de polidispersão, PDI, aumentou ligeiramente durante os primeiros 2-3 dias, atingindo igualmente um valor constante ao fim desse tempo, o valor final continuou menor do que 0,3, indicando que o tempo de armazenamento (envelhecimento) não afetou significativamente a distribuição do tamanho médio das gotículas. No geral, os resultados indicam que as nanoemulsões são bastante estáveis com o envelhecimento, pelo menos durante 16 dias. De referir que por observação a olho nu, as nanoemulsões preparadas mantiveram-se estáveis quando mantidas a 4ºC por mais de 6 meses.

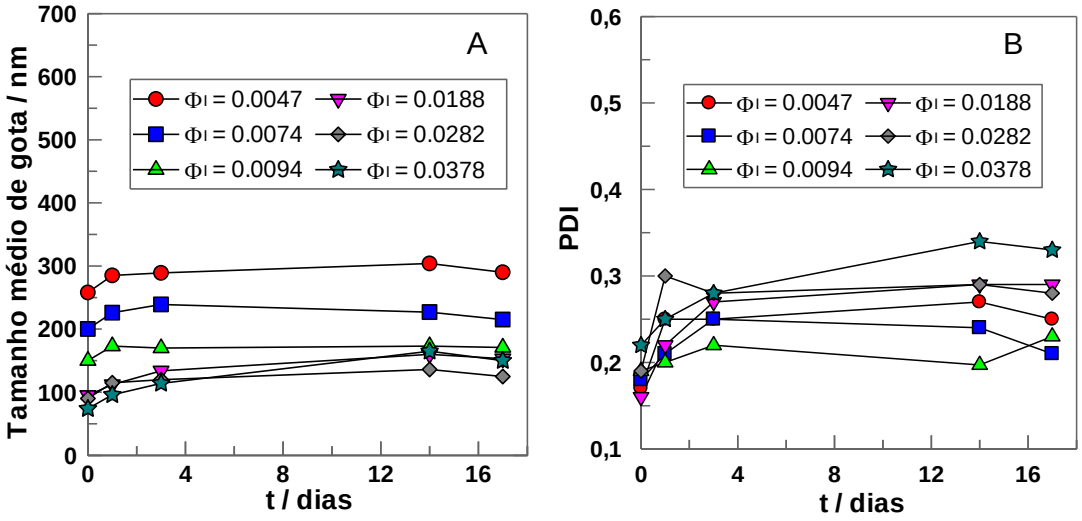


Figura 64 – Variação do tamanho médio de gota (A) e do índice de polidispersão (B) das nanoemulsões 1:9 óleo de peixe/tampão citrato, estabilizadas com diferentes frações de emulsionante Tween 80.

2.3.2. Método de dispersão de luz múltipla (Turbiscan)

O Índice de Estabilidade Turbiscan (TSI) é utilizado como medida da estabilidade física das nanoemulsões. Valores maiores de TSI indicam maior instabilidade física das nanoemulsões.

A *Figura 65* mostra que as nanoemulsões preparadas com maiores frações de emulsionante apresentam um maior valor de TSI e, portanto, maior instabilidade, enquanto que as nanoemulsões com frações de emulsionante de Φ_I = 0,0047 a Φ_I = 0,0094 apresentaram os menores valores de TSI e, portanto, mais estabilidade.

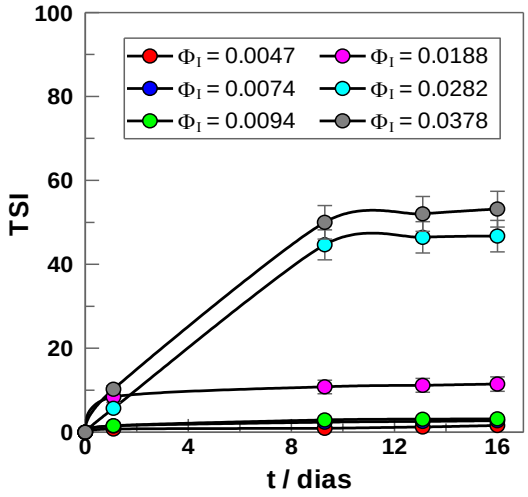


Figura 65 – Índice de estabilidade (TSI) em função do tempo, para várias frações de emulsionante, T=30ºC.

A *Figura 66* mostra os resultados obtidos para as várias medições de dispersão de luz efetuadas ao longo do tempo nas nanoemulsões de óleo de peixe 1: 9 (O/A) preparadas com Φ_I = 0,0047 e com Φ_I = 0,0378 a T = 30 ° C. A *Figura 66(A*) mostra a variação da luz retrodifundida ou refletida (ΔBS) em função da altura da célula de medição e do tempo. Nas nanoemulsões preparadas com Φ_I = 0,0047, não foram observadas variações no valor de ΔBS na zona intermédia da célula, o que indica que não ocorreram variações no tamanho da gotícula nesta zona. Estes resultados sugerem que nenhum processo de coalescência ou floculação ocorreu durante os 17 dias de armazenamento. No entanto, verificou-se uma diminuição em ΔBS na área inferior da célula de medição (parte esquerda do gráfico) e um aumento na zona superior (parte direita do gráfico), revelando o início de um processo de formação de creme devido provavelmente á migração de gotículas maiores da zona mais baixa para a zona mais alta da célula, provocada pela diferença de densidades entre o óleo e a água.

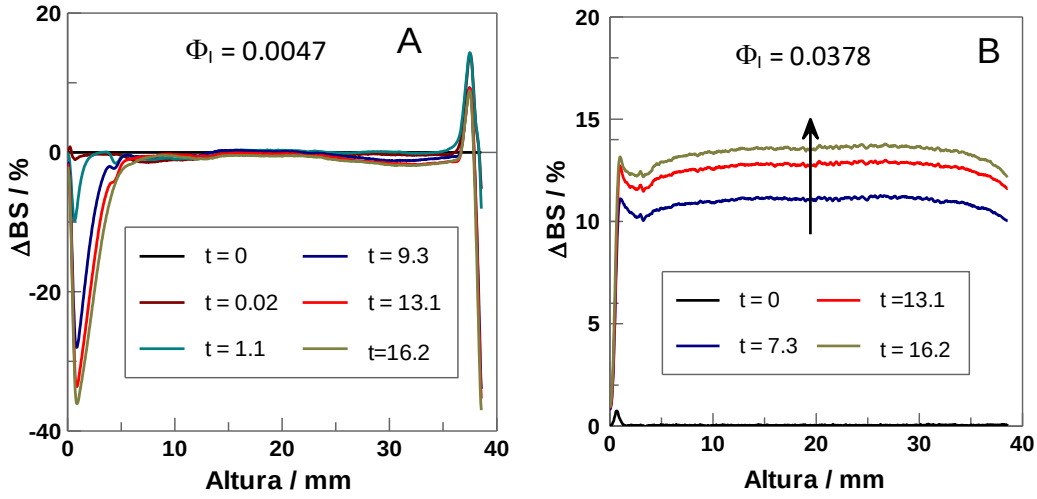


Figura 66 – Perfis da luz retrodifundida ou refletida (ΔBS) em função da altura da amostra (mm), para duas frações de emulsionante, Φ_l=0,0047 (A) e Φ_l=0,0378 (B).

A *Figura 66(B)* mostra a variação de ΔBS com a altura da célula de medição para nanoemulsões de óleo de peixe 1: 9 (O/A) preparadas com Φ_l = 0,0378. Observou-se um aumento de ΔBS nas zona intermédia da célula de medição, o que é característico de um aumento do tamanho das gotas. O facto de a luz retrodifundida aumentar na zona intermédia sugere a presença de ocorrência de floculação e coalescência [49].

2.4. Estudos teóricos

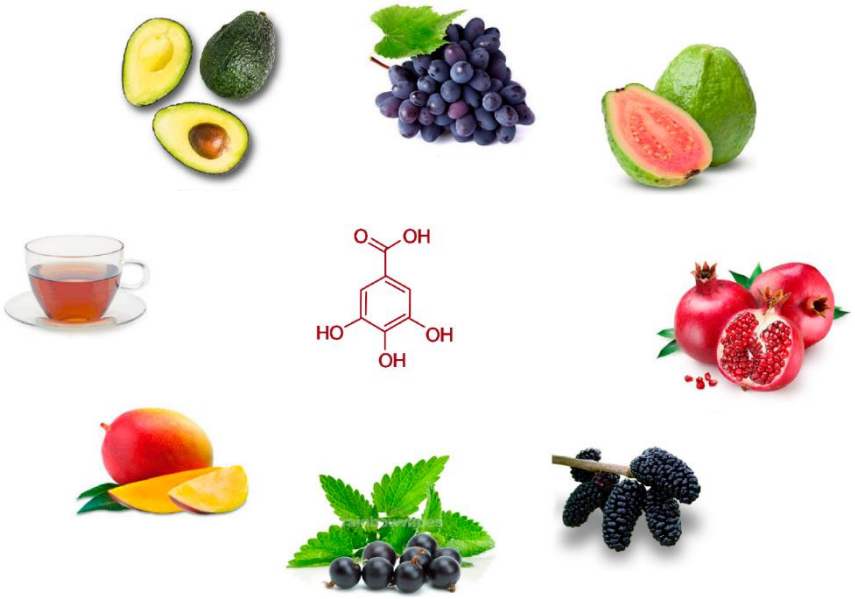
Para obter mais informações sobre as características físicas das nanoemulsões e analisar a presença de micelas de Tween 80, realizamos uma série de cálculos teóricos para ter uma ideia do número de gotas no sistema, Ng, a área interfacial total de gotículas, Sg, a massa total de emulsionante adsorvido na interface das gotículas (assumindo que a interface é saturada) e a massa de emulsionante remanescente na fase aquosa após a saturação. Os cálculos para as nanoemulsões mostradas na *Tabela 7* baseiam-se em 10 g de óleo/água de 1: 9 (v/v) para três concentrações de emulsionante (0,005, 0,01 e 0,02). Os resultados sugerem que para uma menor concentração de emulsionante utilizado, pode não existir emulsionante suficiente para saturar completamente as interfaces. Consequentemente, não há micelas presentes nas nanoemulsões contendo apenas Φ_l = 0,005. Por outro lado, a quantidade de emulsionante usada para estabilizar as nanoemulsões contendo Φ_l = 0,01 e, ainda em maior medida, as nanoemulsões contendo Φ_l = 0,02 é muito maior do que as necessárias para recobrir a superfície das gotas (*Tabela 7*), sugerindo não só a

presença de micelas Tween 80, mas também uma melhor cobertura das gotículas. Esta melhor cobertura pode proteger as gotículas lipídicas da espécie pró-oxidante dissolvidas na fase aquosa, aumentando a estabilidade do sistema. As micelas de emulsionante não-iónico podem-se aproximar das gotas devido à ausência de repulsão elétrica, como mostrado pelo baixo potencial zeta. Emulsionantes e moléculas de óleo trocam muito rapidamente, a troca de emulsionantes entre micelas e a solução aquosa ocorre em torno de 10^{-6} segundos, e a vida média de uma micela é de cerca de 10^{-3} segundos [272]. Assim, ambas as micelas e gotas de nanoemulsão podem adquirir excesso de emulsionante por adsorção do emulsionante na interface óleo-água a partir de micelas que coalescem ou se dissociam nas proximidades das gotículas, permitindo que as moléculas de emulsionante sejam adsorvidas [273-275].

Tabela 7 – Características das emulsões e nanoemulsões preparadas com óleo de peixe. d = diâmetro de gota; V_g = πxd3 / 6, volume de uma gota; S_g = πxd2, superfície da gota; $N_g = V_{total, óleo} / V_{total}$, número total de gotas, ($V_{total, óleo}$, é o volume total de óleo por 10 g de emulsão); $S_{total} = 6xVt_{total,óleo} / d$, superfície de todas as gotas; $m_{T80, gota} = S_{total} \times \Gamma_\infty$, massa de emulsionante necessária para saturação de 100 g de emulsão (estimada usando uma cobertura interfacial na saturação de $\Gamma_\infty = 2x10^{-6}$ mol m^{-2} [91, 276], $m_{T80, excesso} = m_{T80} - m_{T80, gota}$, excesso (g) de Tween 80 que podem permanecer na fase aquosa.

	Nanoemulsões			**Emulsões**	
Φ_o	1,0	1,0	1,0	1,0	4,0
10^2 Φ_l	0,5	1,0	2,0	0,5	0,5
ζ-potential (mV)	-18,1	-14,2	-13,5	-22,6	nd
10^6 d (m)	0,297	0,227	0,175	1,28	6,46
10^{12} S_g (m^2)	0,28	0,16	0,10	5,0	131
10^{20} V_g (m^3)	1,37	0,61	0,28	105	141
10^{-12} N_g	73	163	357	9,5	0,28
S_{total} (m^2)	20,2	26,4	34,3	4,8	3,7
10^2 $m_{T80Disponível}$ / m^2 de superficie (g)	0,25	0,38	0,58	1,05	1,00
10^2 $m_{T80, gota}$ (g)	0,53	0,69	0,90	0,12	0,10
10^2 $m_{T80, excesso}$ (g)	-0,03	0,31	1,10	0,38	0,40

Capítulo 2 – Ácido Gálico e derivados



Para ser possível correlacionar a distribuição do ácido gálico e dos seus derivados com a atividade antioxidante, realizou-se experiências para determinar em primeiro lugar a capacidade antirradicalar destes, de modo a verificar que a sua reatividade não era alterada pela introdução de cadeias de tamanhos distintos na molécula (*Figura 67*) e, posteriormente estudou-se a sua eficácia antioxidante em emulsões e nanoemulsões modelo contendo como fase oleosa óleo de peixe.

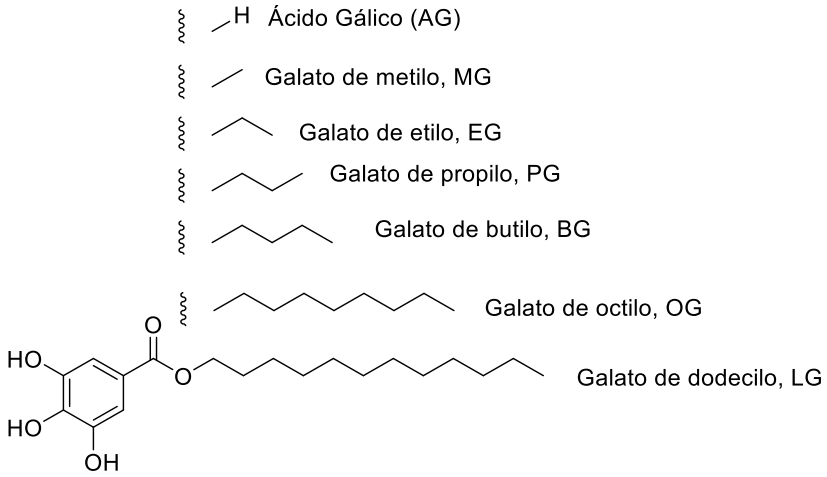


Figura 67 - Estrutura química do ácido gálico e derivados.

Assim, avaliou-se a reatividade dos compostos em meios homogéneos frente ao radical DPPH$^{\bullet}$ e por voltametria cíclica.

1. Reatividade do ácido gálico e seus derivados

1.1. Reatividade do ácido gálico e derivados frente ao radical DPPH$^{\bullet}$

O método de DPPH$^{\bullet}$ é um método colorimétrico simples que se baseia na diminuição da absorvância do radical DPPH$^{\bullet}$ (que apresenta uma cor púrpura) a 515 nm, devido à ocorrência da reação deste com o antioxidante. Na *Figura 68 (A)* está representado um exemplo típico da variação de absorvância obtida para o desaparecimento do radical DPPH$^{\bullet}$ em função do tempo, na presença de diferentes concentrações de galato de butilo. A atividade antirradicalar define-se a partir do parâmetro EC_{50}, que representa a concentração mínima necessária para o antioxidante reagir com 50% dos radicais de DPPH$^{\bullet}$ inicias.

Para determinar este parâmetro representou-se graficamente para um determinado tempo, a variação da percentagem de DPPH• em função da relação mol AO/mol DPPH•, *Figura 68 (B).*

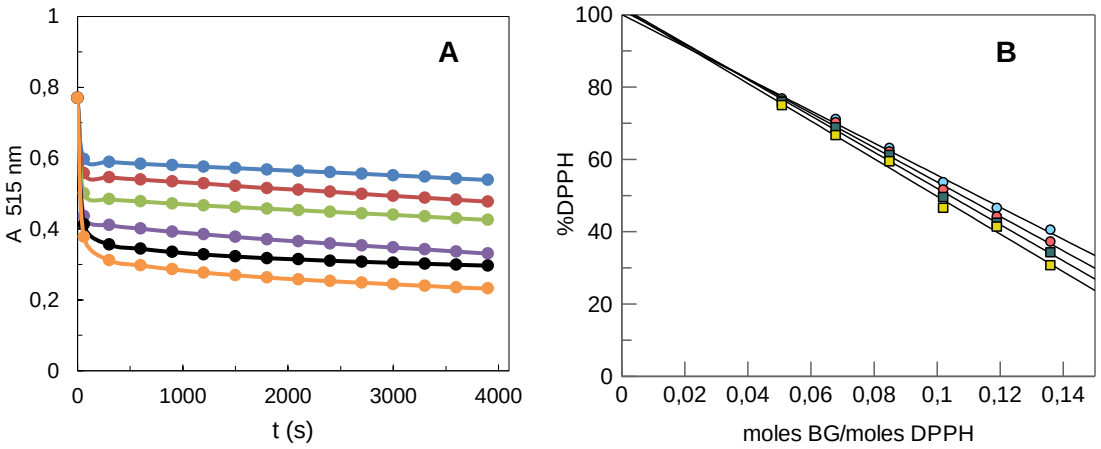


Figura 68 - (A) Variação da absorvância do radical DPPH• (λ=515 nm) na presença de diferentes concentrações de galato de butilo -●- 0,051 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,068 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,085 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,10 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,12 mol de AO/mol DPPH•, -●- 0,14 mol de AO/mol DPPH•, T=25ºC. (B) Representação da variação da percentagem de DPPH• com a concentração de galato de butilo, expressa em mol AO/mol DPPH•, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear, -●- 5 minutos, -●- 15 minutos, -●- 30 minutos, -●- 60 minutos.

Os valores de EC_{50} obtidos para o ácido gálico e para os seus derivados encontram-se na *Tabela 8*.

Uma vez que estes valores indicam a relação mol AO/mol DPPH• necessária para reduzir a concentração de radicais DPPH para metade, aqueles antioxidantes que apresentam um valor de EC_{50} menor, são os que apresentam uma maior atividade antirradicalar.

Tabela 8 - Valores de EC_{50} obtidos para diferentes tempos de reação para o ácido gálico e seus derivados.

t / minutos	**5**	**15**	**30**	**60**
Antioxidante	**EC_{50} ± σ**	**EC_{50} ± σ**	**EC_{50} ± σ**	**EC_{50} ± σ**
AG	0,1024±0,0025	0,0946±0,0026	0,0923±0,0019	0,0911±0,0021
MG	0,1078±0,0017	0,1022±0,0011	0,0994±0,0010	0,0982±0,0014
EG	0,1175±0,0045	0,1128±0,0139	0,1110±0,0019	0,1086±0,0015
PG	0,1117±0,0031	0,1069±0,0024	0,1037±0,0019	0,1101±0,0009
BG	0,1122±0,0056	0,1073±0,0027	0,1038±0,0013	0,1002±0,0015
OG	0,1009±0,0046	0,0930±0,0006	0,0908±0,0007	0,0893±0,0007
LG	0,0933±0,0001	0,0896±0,0008	0,0879±0,0004	0,0870±0,0004

EC_{50} expresso em mol de antioxidante/ mol de DPPH•
Com um nível de significância P <0,05

Com os resultados obtidos verifica-se que, em solução metanólica, não existem diferenças estatisticamente significativas no valor de EC_{50} para o ácido gálico e os seus derivados. Conclui-se assim, que o tamanho da cadeia hidrocarbonada não altera a reatividade dos compostos, o que seria esperado uma vez que a estrutura fenólica é mantida em todos os compostos.

1.2. Determinação do primeiro potencial anódico - Voltametria Cíclica

Os antioxidantes primários são agentes redutores, pelo que reagem com as espécies oxidantes pela doação de eletrões. Desta maneira, o poder redutor de um antioxidante, avaliado pela voltametria cíclica, normalmente correlaciona com a eficácia antioxidante destes. O poder redutor dos compostos é dado em função do potencial do primeiro pico anódico (*Epa*).

Na *Tabela 9*, encontram-se os resultados do potencial do primeiro pico anódico (*Epa*).

Tabela 9 - Valores do primeiro potencial anódico, determinados por voltametria cíclica, para o ácido gálico e derivados.

	pH = 7,3	**pH = 3,6**	**pH = 3,6 + Tween 80**
Antioxidante	***Epa (V)**	***Epa (V)**	***Epa (V)**
AG	0,253	0,348	----
MG	0,247	0,350	----
EG	0,240	0,361	----
PG	0,253	0,356	----
BG	0,263	0,369	----
OG	0,248	0,353	0,367
LG	0,260	0,360	0,370

**Epa*, potencial anódico *vs* Ag/AgCl.

Compostos com potenciais anódicos mais baixos são mais facilmente oxidados e geralmente apresentam melhores atividades antioxidantes, de acordo com o descrito por *Mannino el al [277]*. Os resultados mostram que não há diferenças significativas no valor potencial anódico para os vários diferentes galatos com diferenças menores que 9%. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos para os valores de EC_{50}, uma vez que também não foi observada diferenças de reatividade entre os vários galatos e o radical $DPPH^{\bullet}$. A presença de Tween 80, também não alterou o valor do primeiro potencial anódico encontrado, com diferença inferior a 1%. Podemos então

concluir que os valores obtidos para o primeiro potencial anódico não são alterados pelo comprimento da cadeia alquílica dos ésteres, nem pela presença de Tween 80.

2. Distribuição do ácido gálico e seus derivados em sistemas binários

2.1. Constantes de partição P_A^O , em sistemas binários óleo/água

A constante de partição, P_A^O, de qualquer composto bioativo entre dois líquidos imiscíveis, neste caso água (A) e óleo (O) é um parâmetro físico-químico de grande interesse, pois fornece uma medida termodinâmica do equilíbrio hidrofóbico-hidrofílico da molécula e das suas interações com o solvente, afetando diretamente a sua distribuição. Nos sistemas biológicos, as constantes de partição ajudam a entender a biodisponibilidade, a farmacodinâmica e a farmacocinética dos antioxidantes [278, 279].

Apesar do uso generalizado dos antioxidantes e óleos na nutrição humana, os valores das constantes de partição, P_A^O, encontrados na literatura entre óleos e água são muito escassos. O seu conhecimento pode ser muito útil, já que o seu valor é, numericamente, igual ao quociente das constantes de partição entre as regiões interfacial e oleosa e entre as regiões aquosa e interfacial, simplificando muito a determinação experimental das constantes de partição em sistemas emulsionados e, portanto, a distribuição dos antioxidantes.

Por outro lado, o conhecimento destas constantes para um conjunto representativo de antioxidantes pode tornar possível determinar se as referidas constantes de partição podem ser previstas a partir daquelas obtidas em sistemas octanol-água, que hoje em dia podem ser obtidos com bastante precisão, por cálculos computacionais, dada a sua alta relevância nas áreas da biologia e farmácia. Alguns dos antioxidantes utilizados neste trabalho podem ser ionizados sob as condições de acidez do alimento (pH 3-7), o que pode modificar substancialmente a sua distribuição.

Resumidamente, a transferência de um soluto de uma região aquosa (A) para uma orgânica (O) pode ser descrita em termos da mudança na energia livre de Gibbs, $\Delta G^{A\rightarrow 0}$, associada a processo de transferência, fornecendo uma medida quantitativa da hidrofobicidade em relação as duas regiões [209]. A temperatura e pressão constantes, $\Delta G^{A\rightarrow 0}$ é dado pela diferença dos potenciais químicos μi do composto i que se transfere,

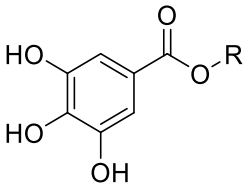
$\Delta G^{A\to 0}$=$\mu i^0 - \mu i^A$. Em equilíbrio $\Delta G^{A\to 0}$= 0 e os potenciais químicos em cada fase igualam-se. O valor de μi depende das atividades do soluto e, quando a sua concentração é suficientemente baixa, pode-se considerar que seu coeficiente de atividade é próximo à unidade, com o qual as concentrações podem ser usadas em vez de atividades. Nestas circunstâncias, podemos obter a seguinte equação:

$$\Delta G^{A\to 0} = -RTlnP_A^O \quad \textbf{(56)}$$

que relaciona as mudanças em $\Delta G^{A\to 0}$ com o coeficiente de partição do componente i de uma região para a outra [280-282].

Os resultados da partição binária óleo de peixe/água para o ácido gálico e seus esteres encontram-se na *Tabela 10*.

Tabela 10 – Valores das constantes de partição de uma mistura binária óleo de peixe/água, T=25ºC, para o ácido gálico e seus derivados.

Antioxidantes		%AO$_A$	%AOo	P_A^O
Estrutura	-R			
	-H (AG)	98,5 ± 0,1	1,5 ± 0,1	0,05 ± 0,03
	- CH_3 (MG)	90,6 ± 0,3	9,4 ± 0,3	0,156 ± 0,001
	- CH_2 CH_3 (EG)	82,1 ± 0,5	17.9 ± 0,5	0,33 ± 0,01
	-$(CH_2)_2CH_3$ (PG)	65,5 ± 0,4	34,5 ± 0,4	0,792 ± 0,002
	-$(CH_2)_3CH_3$ (BG)	40,4 ± 0,2	59,6 ± 0,2	2,21 ± 0,10
	-$(CH_2)_7CH_3$ (OG)	≃ 0	≃ 100	>>>2,21
	-$(CH_2)_{11}CH_3$ (LG)	≃ 0	≃ 100	>>>2,21

Para o galato de octilo (OG) e para o galato de dodecilo (LG) não foi possível a determinação da constante de partição P_A^O uma vez que a absorvância do óleo de peixe é muito superior à banda de absorção do antioxidante e, portanto, esta última é mascarada. Através da medição espetrofotométrica da quantidade de antioxidante na região aquosa das misturas contendo estes AOs verificou-se que esta quantidade não era mesurável concluindo-se que os antioxidantes se encontravam apenas na região oleosa.

Como esperado, a solubilidade do ácido gálico é bastante alta na fase aquosa (98,5%), solubilidade essa que tende a decrescer já para o galato de metilo(MG) (90,6%). Pelos valores presentes na *Tabela 10* verifica-se que, quanto menor for a cadeia carbonada (AG e MG) maior a afinidade do AO para a região aquosa e maior a percentagem de AO nesta mesma região. Já para os antioxidantes que apresentam uma cadeia alquílica maior, ou seja, os que são mais lipofílicos, apresentam uma maior afinidade para a região oleosa e encontram-se em maior percentagem nesta mesma região. No caso dos antioxidantes com uma cadeia carbonada intermédia, como é o caso do galato de propilo e galato de butilo, verifica-se uma distribuição do antioxidante por ambas as regiões.

Encontrou-se um valor para o PG (P_A^O= 0,79) em emulsões contendo óleo de peixe semelhante ao encontrado em misturas contendo azeite e óleo de milho, P_A^O= 0,73 e P_A^O= 0,83, respetivamente [283]. A natureza da região oleosa parece não afetar o valor da constante de partição binária P_A^O deste AO.

Os resultados obtidos sugerem que em emulsões o AG e o MG se devem distribuir entre a região aquosa e a interfacial, o PG e o BG entre as três regiões e o OG e o LG entre a região oleosa e a interfacial. Portanto, os antioxidantes selecionados constituem uma série de compostos com o mesmo grupo reativo, mas com uma hidrofobicidade distinta. Tal permite avaliar o efeito da hidrofobicidade do AO na distribuição e perceber em que extensão isto afeta a sua eficácia antioxidante.

3. Distribuição do ácido gálico e seus derivados em emulsões

3.1. Determinação das constantes de partição do ácido gálico e do galato de metilo em emulsões de óleo de peixe/tampão citrato (O/A)

Nesta determinação, utilizou-se o método cinético da pseudofase e recorrendo ao método de derivatização, estudou-se o efeito da fração de emulsionante utilizada em cada uma das emulsões, no valor da constante de velocidade observada (k_{obs}) para a reação entre o catião de arenodiazónio e o ácido gálico (AG) e o galato de metilo (MG), em emulsões 4:6 (v/v, O/A). Para isso, utilizou-se frações de emulsionante que variaram entre Φ_I = 0,005 e Φ_I = 0,042. Observou-se que nestas experiências os pares de dados absorvância-tempo, se ajustaram a uma equação integrada de primeira ordem, sendo

possível a partir dela, obter o valor de k_{obs}. Na *Figura 69* encontram-se apresentadas a variação típica da absorvância do corante em função do tempo, bem como a representação de ln (A_t - A_{inf}) em função do tempo, para o ácido gálico (AG) e para o galato de metilo (MG), respetivamente.

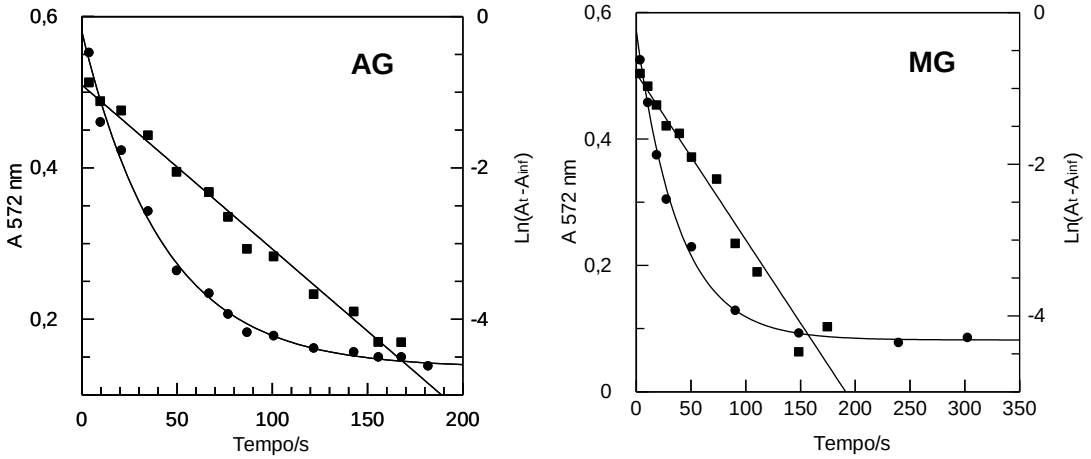


Figura 69 -Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln [A_t-A_∞] vs tempo para o GA e para o MG. (Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), Φ_I = 0,005, [16-ArN_2^+] = 2,86x10^{-4} M, [AO] = 2,98x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25,7 ºC.

Uma vez que o ácido gálico e o galato de metilo apresentam uma elevada solubilidade na região aquosa e se distribuem muito perto de 100% nesta região da emulsão, analisaram-se os resultados com base no modelo simplificado da pseudofase, ajuntando os dados (k_{obs}, Φ_I) às e*quações 48* e *49* deduzidas na *secção I, (Figura 70).*

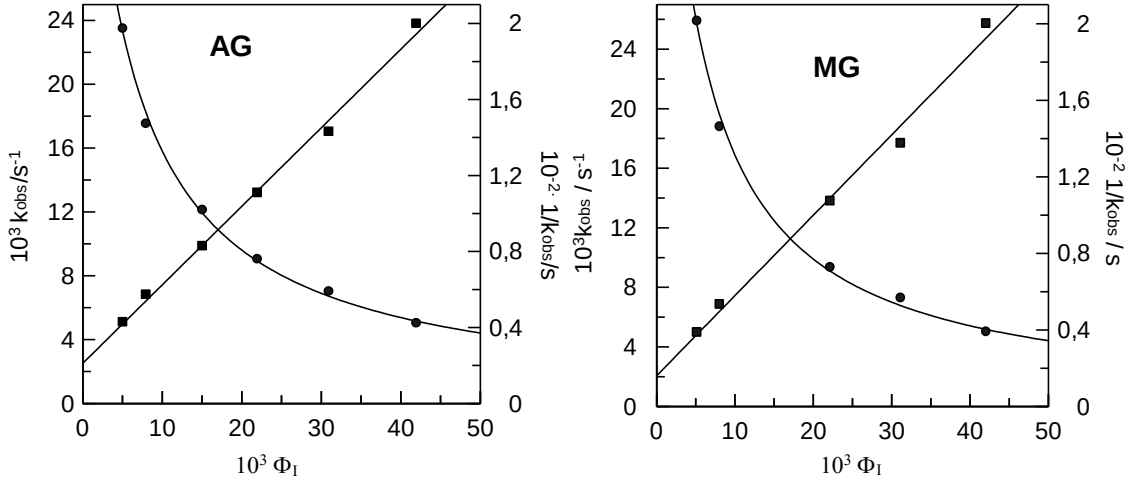


Figura 70 - Representação de k_{obs} e 1/k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às equações *48* e *49*, para o AG e MG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), [16-ArN_2^+] = 2,86x10^{-4} M, [AO] = 2,98x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25,7 ºC.

Observando a *Figura 70*, verifica-se que ocorre uma diminuição do valor de k_{obs} à medida que o valor de Φ_I aumenta num fator de 6 vezes. Esta relação era esperada pela aplicação do cálculo do valor de k_{obs} pela *equação 49* deduzida na *secção I*.

Da representação linear de $1/k_{obs}$ vs Φ_I e a partir dos valores do declive e da ordenada na origem, obtiveram-se os parâmetros *a* e *b* através do ajuste à *equação 49* deduzida na *secção I*, onde $a = k_I[AO_I]$ e $b = P_A^I/\Phi_A$, (*Tabela 11*).

Tabela 11- Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da *Figura 70* à *equação 49*.

Parâmetro	AG	MG
10^2 a	0,025 ± 0,010	0,024 ± 0,002
b	182 ± 17	239 ± 39

Utilizando os valores de *a* e *b*, calcularam-se os valores de k_I e P_A^I, para o AG e MG (*Tabela 12*).

Tabela 12- Valores de $P_A{}^I$ e k_I obtidos para o AG e MG a partir do ajuste dos dados da *Figura 70* à *equação 49*.

Composto	k_I ($M^{-1}s^{-1}$)	P_A^I
AG	0,082 ± 0,003	118 ± 19
BG	0,078 ± 0,005	158 ± 60

Verificou-se que a percentagem de galato de metilo (MG) na região interfacial é ligeiramente superior à de ácido gálico (AG). Esta constatação resulta da obtenção de uma constante de partição (P_A^I= 158) cujo valor é mais elevado do que o obtido para o ácido gálico (P_A^I= 118) sugerindo que a percentagem de MG na região aquosa é menor do que a de AG. Comparando o valor obtido para o AG com os valores obtidos em estudos já realizados em emulsões preparadas com óleo de milho (P_A^I= 131) ou azeite (P_A^I=101) verifica-se que neste caso a natureza da região oleosa não interferiu significativamente no valor da constante de partição P_A^I [283].

Os valores de k_I obtidos para ambos os compostos não são necessários para determinar a distribuição dos AOs. No entanto, são importantes porque proporcionam pistas acerca do mecanismo de reação permitindo determinar parâmetros de energia

termodinâmicos para a transferência dos AOs da região aquosa para a região interfacial [221].

Verificou-se que o valor de k_I obtido para o ácido gálico é também semelhante ao obtido em estudos anteriores [283].

3.1.1. Distribuição do ácido gálico e do galato de metilo

Aplicando as *equações 51* e *52* do modelo cinético da pseudofase simplificado (MCPS) deduzidas na *secção I*, e obtidos os valores de P_A^I, calculou-se a percentagem de ácido gálico (AG) e de galato de metilo (MG) na região aquosa e na interfacial, para cada um dos valores de fração de emulsionante (Φ_I), *Figura 71*.

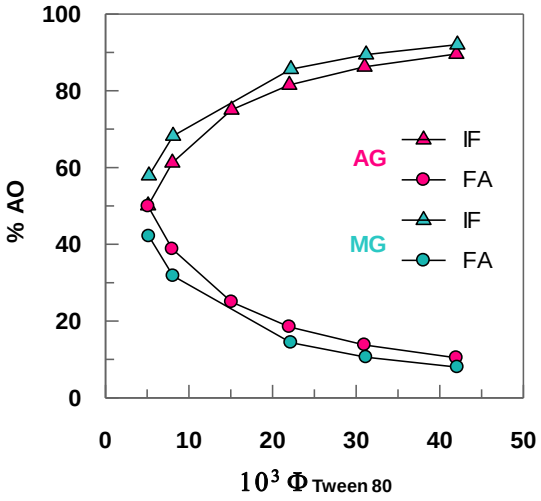


Figura 71 - Variação da percentagem de AG e MG na região aquosa (FA) e na região interfacial (IF) da emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M , pH=3,65), em função da fração de emulsionante Tween 80.

O ácido gálico (AG) e o seu derivado, galato de metilo (MG), apresentam um comportamento idêntico no que diz respeito à sua distribuição nas regiões aquosa e interfacial da emulsão. Pela análise da *Figura 71*, verifica-se que para a fração de emulsionante menor, Φ_I = 0,005, a percentagem de ácido gálico que se encontra na região interfacial é aproximadamente 50%, aumentando para cerca de 90% à medida que se aumenta a fração de emulsionante até Φ_I = 0,042. A percentagem de galato de metilo que se encontra na região interfacial é de aproximadamente 58% e, aumentando a fração de emulsionante, a percentagem deste derivado na região interfacial aumenta para cerca de 92% diminuindo por isso a diferença na percentagem dos AOs presentes na interface à medida que se aumenta o volume de emulsionante.

A partir da determinação da constante de partição binária destes dois antioxidantes, esperava-se que o galato de metilo se distribuísse em maior percentagem na região interfacial do que o ácido gálico o que pode ser comprovado pela análise da *Figura 71*.

3.2. Determinação das constantes de partição do galato de etilo e do galato de butilo em emulsões de óleo de peixe em tampão citrato (O/A)

Analisou-se do mesmo modo que em *3.1* para o galato de etilo e butilo, o efeito da fração de emulsionante sobre o valor de k_{obs} da reação entre o sal de arenodiazónio e o galato de etilo (EG) e o galato de butilo (BG) em emulsões 4:6 óleo de peixe/tampão citrato (0,04 M, pH = 3,65, T = 25 ºC) para frações de emulsionante (Tween 80), compreendidas entre 0,005 e 0,042. Observou-se que, nestas experiências, os pares de dados absorvância-tempo se ajustaram a uma equação integrada de primeira ordem, sendo possível, obter o valor de k_{obs}. Na *Figura 72* encontram-se apresentadas a variação típica da absorvância do corante em função do tempo, bem como a representação de ln (A_t – A_{inf}) em função do tempo, para o EG e para o BG, respetivamente.

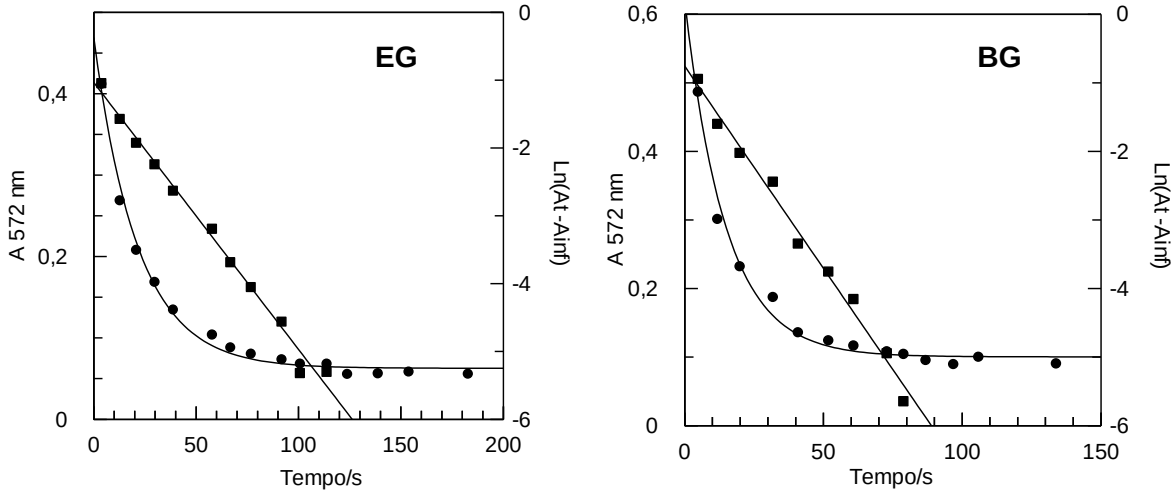


Figura 72 – Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln [A_t-A_{inf}] vs tempo para o EG E O PG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), Φ = 0,005, [16-ArN_2^+] = 2,82x10^{-4} M, [AO] = 3,05x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25,8 ºC.

Como podemos prever pelo valor de P_A^O(*Tabela 10*) , estes antioxidantes deverão distribuir-se pelas três regiões da emulsão (aquosa, orgânica e interfacial),

sendo portanto necessárias duas constantes de partição para descrever a distribuição, P_A^I e P_O^I, utilizando-se assim, o modelo cinético completo da pseudofase (MCP).

Na *Figura 73* está representada a variação de k_{obs} com a fração de emulsionante, assim como os ajustes exponencial e linear às *equações 31* e *32* do MCP deduzidas na *secção I*.

Através do gráfico da *Figura 73* para cada antioxidante pode-se verificar uma diminuição de k_{obs} à medida que o valor de Φ_I presente na emulsão aumenta, num fator de aproximadamente 5 vezes.

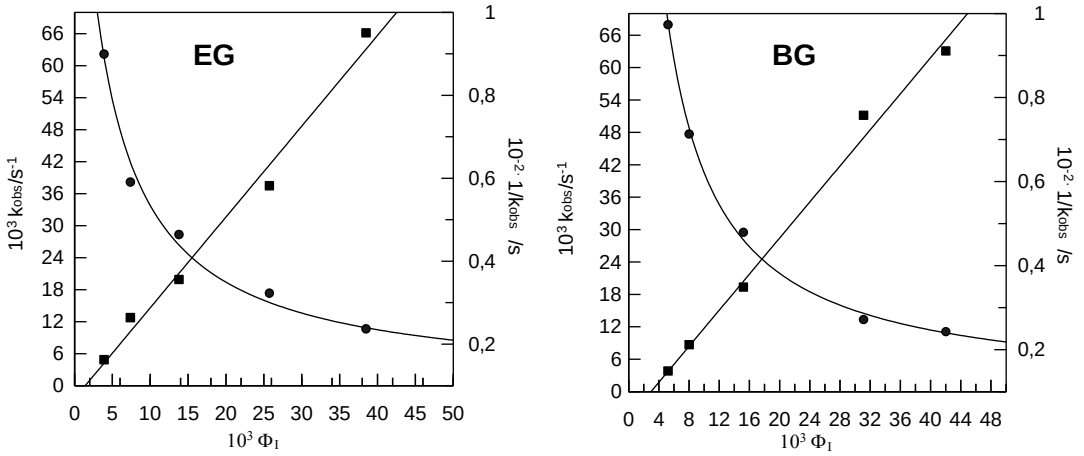


Figura 73 - Representação de k_{obs} e $1/k_{obs}$ vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 31* e *32*, para o PG e para o BG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), [16-ArN_2^+] = 2,82x10^{-4} M, [AO] = 3,05x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25,0 ºC.

Da representação linear de $1/k_{obs}$ vs Φ_I (*Figura 73*) e a partir dos valores do declive e da ordenada na origem, obtiveram-se os parâmetros *a* e *b* através do ajuste a *equação 32* deduzidas na *secção I*, (*Tabela 13)*.

Tabela 13 - Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados das *Figura 73* à *equação 32*.

Parâmetro	**EG**	**BG**
10^2 a	12,9 ± 2,3	18,6 ± 2,9
b	285 ± 83	376 ± 81

Com o valor de P_A^O e com a variação da k_{obs} em função da fração de emulsionante (Φ_I) para um sistema emulsionado com uma determinada razão óleo/água, podem ser

obtidas as constantes de partição P_O^I e P_A^I, resolvendo um sistema de duas equações a duas incógnitas:

$$\begin{cases} b = \frac{P_A^I P_O^I (1+\Phi_A/\Phi_O)}{P_A^I + \Phi_A/\Phi_O P_O^I} - 1 \\ P_A^O = \frac{P_A^I}{P_O^I} \end{cases}$$

Os valores P_O^I e P_A^I obtidos para a emulsão 4:6 (óleo/água) encontram-se na *Tabela 14.*

Tabela 14 - Valores de P_A^I, P_O^I, P_A^O e k_I, obtidos a partir da determinação espetrofotométrica de P_A^O e de vários ensaios (k_{obs}, Φ_I), para o EG e BG.

Composto	k_I ($M^{-1}s^{-1}$)	P_A^I	P_O^I	P_A^O
EG	0,152 ± 0,114	233 ± 13	706 ± 15	0,330 ± 0,008
BG	0,162 ± 0,019	559 ± 27	253 ± 56	2,2 ± 0,1

Tanto os valores de P_A^I como os valores de P_O^I são elevados o que indica a tendência do galato de etilo (EG) e do galato de butilo (BG) se incorporarem na região interfacial das emulsões. Além disso, estes valores elevados permite afirmar que o processo de transferência destes AOs para a região interfacial é espontâneo ($\Delta G = -RTlnK$). Verificou-se que o valor de P_A^I para o EG (P_A^I = 233) é mais baixo do que para o BG (P_A^I = 559) o que se explica pelo efeito do aumento da hidrofobicidade do AO. Os valores de P_O^I diminuem ao aumentar a hidrofobicidade indicando assim um aumento da solubilidade do BG no óleo, quando comparado com o EG.

Obtiveram-se resultados similares para o EG em emulsões preparadas com azeite (P_A^I = 328 e P_O^I = 450) no entanto os valores obtidos para o óleo de peixe aparentam ser o dobro dos obtidos para o óleo de milho [283]. Esta diferença deve-se provavelmente ao facto de a natureza/composição do azeite/óleo afetar as constantes de partição. Para além disso o emulsionante utilizado não foi o mesmo. Assim não só a polaridade dos azeites/óleos comparados pode ser diferente bem como o próprio azeite pode ter componentes minoritários que atuam como emulsionantes e alteram assim a natureza da interface. No entanto, o valor de k_I obtido para o EG e BG é semelhante ao

obtido em emulsões de óleo de milho (k_I = 0,140 $M^{-1}s^{-1}$) e de azeite (k_I = 0,142 $M^{-1}s^{-1}$) [283].

3.2.1. Distribuição do galato de etilo e do galato de butilo

Aplicando as *equações 36, 37* e *38* do modelo cinético da pseudofase completo (MCP), deduzidas na *secção I,* e conhecendo os valores de P_A^I e P_O^I, obtém-se a percentagem de galato de etilo (EG) e de galato de butilo (BG) nas três regiões da emulsão (aquosa, oleosa e interfacial), para cada um dos valores de fração de emulsionante (Φ_I), *Figura 74*.

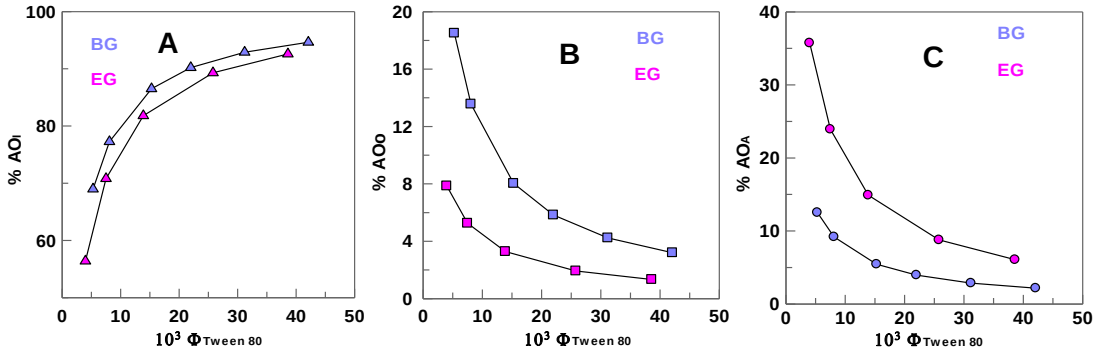


Figura 74 – Variação da percentagem do galato de etilo e galato de butilo na região interfacial (A), na região oleosa (B) e na região aquosa (C) da emulsão 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M pH=3,65, em função da fração de emulsionante Tween 80.

Atendendo à distribuição obtida para a fração de emulsionante menor (Φ_I = 0,005) verificou-se que a percentagem de galato de etilo (EG) que se encontra na região interfacial é aproximadamente igual a 58%, aumentando para perto dos 90% conforme se vai aumentando a fração de emulsionante até se atingir Φ_I = 0,042. A percentagem de galato de butilo (BG) que se encontra na região interfacial a Φ_I = 0,005 é de aproximadamente 69% aumentando para aproximadamente 95% quando a fração de emulsionante é incrementada. Assim, à medida que a concentração de ambos os antioxidantes aumentou na região interfacial notou-se uma diminuição da sua concentração nas regiões oleosa e aquosa.

3.3. Determinação das constantes de partição do galato de octilo e do galato de dodecilo em emulsões óleo de peixe/tampão citrato (O/A)

Mais uma vez, recorrendo ao método da derivatização estudou-se o efeito exercido pela fração de emulsionante sobre o valor de k_{obs} da reação entre o sal de arenodiazónio e os galatos de octilo (OG) e dodecilo (LG), em emulsões 4:6 óleo de peixe/tampão citrato (0,04 M, pH = 3,65, T = 25 ºC) para frações de emulsionante (Tween 80) compreendidas entre 0,005 e 0,042. Tal como para os compostos anteriores, observou-se que nestas experiências os pares de dados absorvância-tempo se ajustaram a uma equação integrada de ordem 1, sendo possível, determinar o valor de k_{obs}.

Na *Figura 75* encontram-se apresentados dois exemplos de uma variação típica da absorvância do corante em função do tempo, bem como a representação de ln ($A_t - A_{inf}$) em função do tempo, para o OG e para o LG, respetivamente.

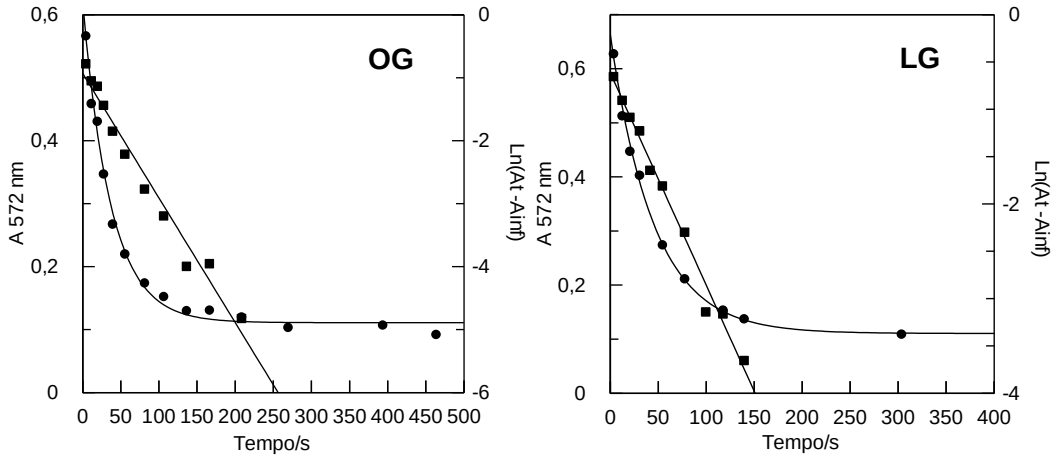


Figura 75 - Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln [A_t-A_{inf}] vs tempo para o OG e o LG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), Φ = 0,015, [16-ArN_2^+] = 2,84x10^{-4} M, [AO] = 3,07x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25,3 ºC.

Para ambos os antioxidantes a determinação da constante de partição binária P_A^O não se realizou uma vez que a absorvância do óleo de peixe é muito superior à banda de absorção do antioxidante sendo esta última mascarada. Através da medição espetrofotométrica da região aquosa, não foi possível detetar qualquer OG ou LG dissolvidos podendo-se concluir que cerca de 100% do AO encontrava-se na região oleosa e por isso aplicou-se o modelo cinético da pseudofase simplificado (MCPS) para analisar os dados experimentais.

Na *Figura 76* estão representadas as variações de k_{obs} em função da fração de emulsionante bem como os ajustes exponenciais e lineares às *equações 41* e *42* do modelo cinético da pseudofase simplificado deduzidas na *secção I*. Através da sua análise pode-se verificar uma diminuição aproximadamente 5 vezes do valor de k_{obs} à medida que o valor da fração de emulsionante, Φ_I, aumentava.

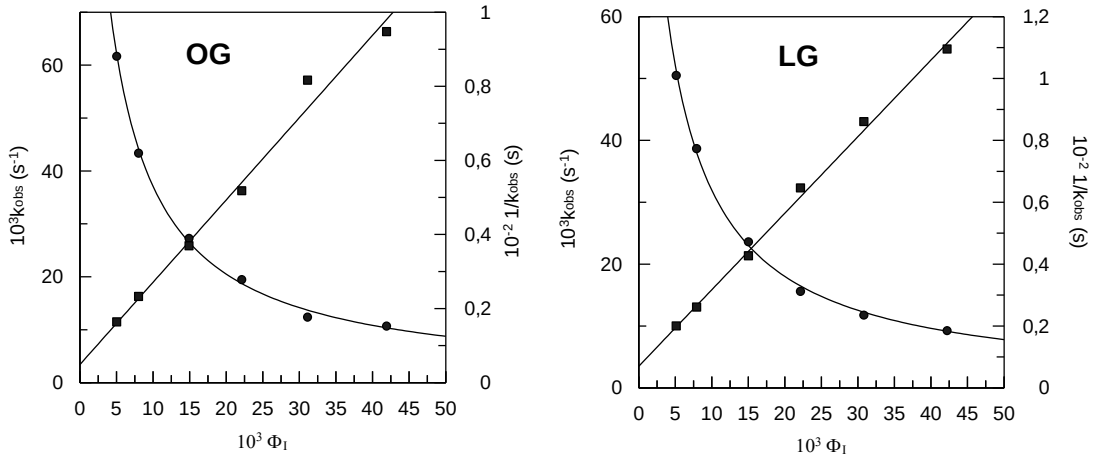


Figura 76 - Representação de k_{obs} e $1/k_{obs}$ vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 41* e *42* para o OG e para o LG. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), [16-ArN_2^+] = 2,84x10^{-4} M, [AO] = 3,05x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25,0ºC

Da representação linear de $1/k_{obs}$ vs Φ_I (*Figura 76*), obtiveram-se os valores dos parâmetros *a* e *b* através do ajuste à *equação 42* deduzidas na *secção I* a partir dos valores do declive e da ordenada na origem para ambos os compostos (*Tabela 15*).

Tabela 15 - Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados das *Figura 76* à *equação 42*.

Parâmetro	OG	LG
10^2 a	0,458 ± 0,017	0,413 ± 0,015
b	424 ± 59	342 ± 41

Utilizando o valor de *a* e de *b* calculou-se o valor de k_I e de P_O^I para o OG e o LG, apresentados na *Tabela 16*.

Tabela 16 - Valores de P_O^I e k_I obtidos para o OG e LG a partir do ajuste dos dados da *Figura 76* à *equação 42*.

Composto	k_I ($M^{-1}s^{-1}$)	P_O^I
OG	0,148 ± 0,009	183 ± 26
LG	0,133±0,005	142 ± 37

De acordo com o valor de P_O^I, o LG apresenta uma maior afinidade para a região oleosa e como tal encontra-se em maior quantidade nesta região, o que origina um valor de P_O^I menor do que o obtido para o OG. Obtiveram-se valores de P_O^I superiores aos anteriormente obtidos para o galato de octilo em emulsões com óleo de milho (P_O^I= 27) e para o galato de dodecilo em emulsões com azeite (P_O^I= 17) e com óleo de milho (P_O^I= 17) [283]. No entanto, como referido anteriormente, esta diferença de valores terá a ver com diferente natureza do óleo e do emulsionante utilizado nas duas experiências.

Relativamente aos valores de k_I obtidos para o óleo de peixe, estes são bastante menores do que aqueles obtidos para óleo de milho e azeite, onde se obteve para o OG obteve-se um valor de k_I = 0,35 $M^{-1}s^{-1}$ para o óleo de milho e para o LG um valor de k_I = 0,57 $M^{-1}s^{-1}$ e k_I = 0,59 $M^{-1}s^{-1}$ para óleo de milho e azeite, respetivamente [283]. O valor de k_I depende do meio, daí as diferenças verificadas entre as diversas experiências.

3.3.1. Distribuição do galato de octilo e do galato de dodecilo

Conhecido o valor de P_O^I e aplicando as *equações 46* e *47* do modelo cinético da pseudofase simplificado (MCPS) deduzidas na *secção I*, obtém-se a percentagem de galato de octilo (OG) e galato de dodecilo (LG) presente nas regiões oleosa e interfacial da emulsão, para cada fração de emulsionante *(Figura 77)*.

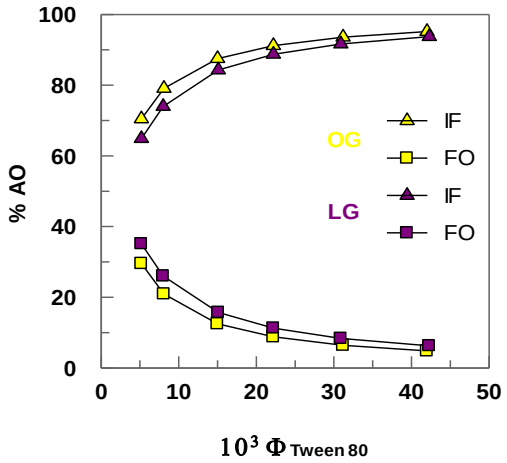


Figura 77 - Variação da percentagem de OG e LG na região oleosa (FO) e na região interfacial (IF) da emulsão 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M pH=3,65, em função da fração de emulsionante Tween 80.

Analisando a *Figura 77* verifica-se que o OG e o LG apresentam um comportamento idêntico relativo à sua distribuição nas regiões interfacial e oleosa da emulsão. Para a menor fração de emulsionante utilizada (Φ_I = 0,005), a percentagem de galato de octilo (OG) que se encontra na região interfacial é de aproximadamente

61%, aumentando a fração de emulsionante para 0,042, a percentagem do OG na região interfacial aumenta para cerca de 93%. No que diz respeito ao galato de dodecilo (LG) essas percentagens são de 65% e 94%, respetivamente, para uma fração de emulsionante de 0,005 e 0,042. Mais uma vez verificou-se uma diminuição da diferença na percentagem distribuída na região interfacial dos AOs com o aumento da fração de emulsionante.

3.4. Análise comparativa da distribuição do ácido gálico e dos seus derivados em emulsões

Na *Tabela 17* encontram-se os valores das contantes de partição, P_A^I, P_O^I e os valores de k_I, obtidos para as emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato).

Tabela 17 - Sumário dos valores das constantes de partição P_A^I , P_O^I e k_I, obtidas para o ácido gálico e seus derivados .

	AG	**MG**	**EG**	**BG**	**OG**	**LG**
P_A^I	118 ± 19	158 ± 60	233 ± 13	559 ± 27	---	---
P_O^I	---	---	707 ± 15	253 ± 56	183 ± 26	142 ± 37
$10^2\ k_I$ ($M^{-1}s^{-1}$)	8,2 ± 0,3	14,8 ± 0,5	15,2 ± 1,8	16,2 ± 1,9	14,8 ± 0,9	13,3 ± 0,5

Utilizando os resultados anteriormente apresentados é possível determinar a percentagem do ácido gálico e dos seus derivados em cada uma das regiões (oleosa, aquosa e interfacial) numa emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65), em função da fração de emulsionante (*Figura 78*).

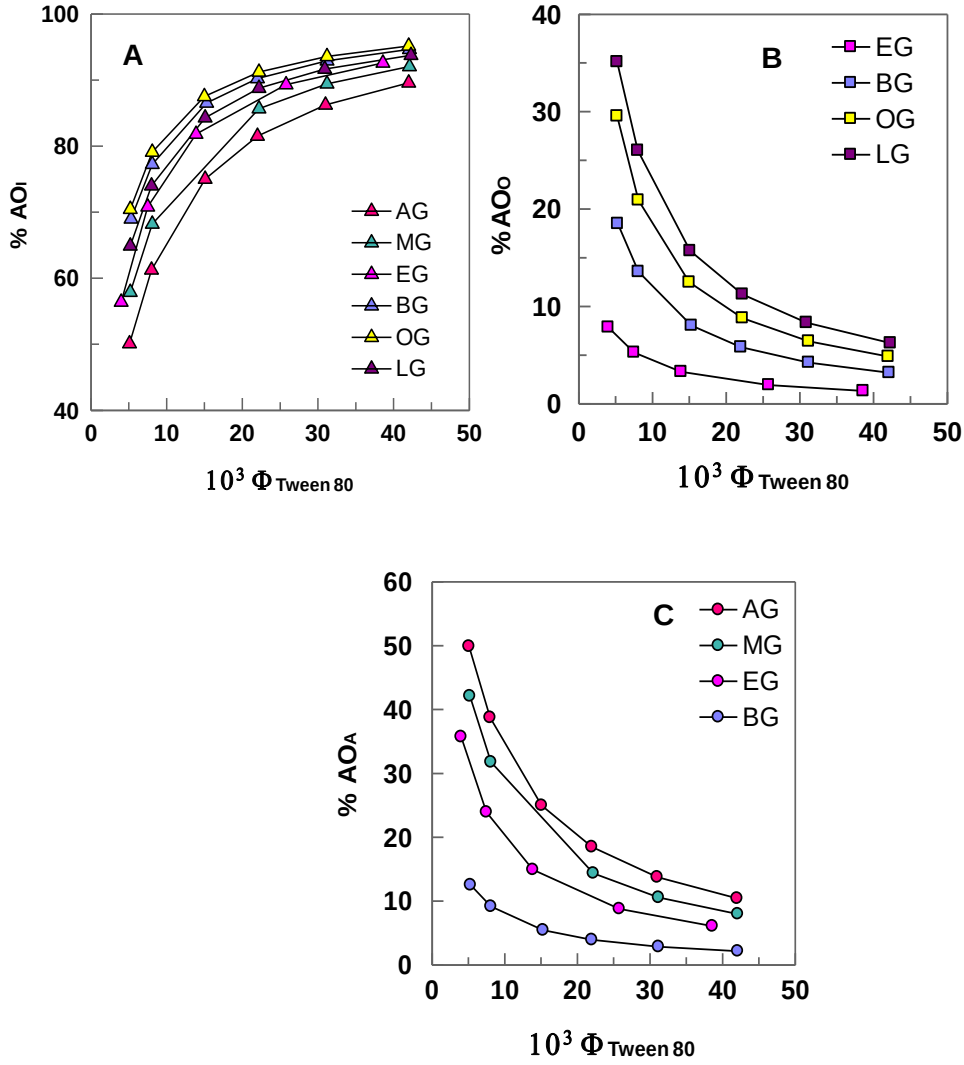


Figura 78 - Variação da percentagem do ádigo gálico e seus derivados na região interfacial (A), na região oleosa (B) e na região aquosa (C) da emulsão 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M pH=3,65, em função da fração de emulsionante Tween 80.

À medida que ocorre um aumento da hidrofobicidade dos antioxidantes verifica-se que os valores das constantes de partição, P_A^O, incrementam o seu valor desde 0,05 até um valor significativamente superior 2,21. Esta constante para o AG apresenta um valor bastante reduzido ($P_A^O = 0{,}05 \pm 0{,}03$) devido à elevada solubilidade destes em água.

Os valores das constantes P_A^I e P_O^I são elevados para todos os derivados variando em função do antioxidante. O valor de P_A^I aumenta à medida que aumenta a hidrofobicidade dos AOs e uma relação inversa é verificada no que respeita aos valores de P_O^I.

Analisando-se os resultados para uma fração de emulsionante de 0,005, verifica-se que 50% do ácido gálico (GA) se distribui na região aquosa sendo o antioxidante que

tem maior afinidade com esta região. O derivado de cadeia mais curta estudado, o galato de metilo (MG), apresenta um comportamento idêntico ao ácido gálico. No entanto, a percentagem deste derivado presente na região interfacial é ligeiramente superior. O antioxidante que se distribui em maior percentagem na região interfacial e que por isso, se espere que apresente uma melhor capacidade antioxidante, é o galato de octilo (OG) com uma percentagem de 70%. Este antioxidante, bem como o galato de dodecilo (LG) distribuem-se apenas entre a região interfacial e a oleosa. Os antioxidante de cadeia intermédia, EG e o BG, encontram-se distribuídos nas três regiões da emulsão. O facto de a percentagem de OG ~ BG ~ LG > EG > MG> AG mostrou que não existe correlação entre a hidrofobicidade do antioxidante e a percentagem de AO presente na região interfacial.

Já na região aquosa a percentagem de BG < EG < MG < GA permite verificar que, diminuindo a hidrofobicidade do AO, a sua percentagem aumenta. Assim, verifica-se a existência de uma correlação inversa entre estes dois parâmetros. Na região oleosa, a percentagem de AO correlaciona-se diretamente com a hidrofobicidade. Um aumento dessa hidrofobicidade promove o aumento da percentagem de AO segundo a relação EG < BG < OG < LG.

A percentagem de AO presente na região interfacial da emulsão aumenta quando a fração de emulsionante Tween 80 aumenta para 0,042, verificando-se desta forma uma influência significativa da fração de emulsionante sobre a percentagem de AO presente em cada uma das regiões da emulsão. De notar que, com o aumento da fração de emulsionante, a diferença de percentagem de AO existente na interface entre os vários AOs diminui consideravelmente em especial para os compostos mais lipofílicos. Assim, a diferença de percentagem na interface para a fração de 0,5% de emulsionante para os compostos GA e OG é de cerca de 20%, diminuindo para cerca de 5% nas emulsões contendo 4,2% de emulsionante. Pela observação destes dados será esperada uma menor diferença na eficácia antioxidante dos compostos em emulsões contendo maiores percentagens de emulsionante.

Através da *Figura 79* podemos observar que a percentagem de AO na região interfacial em função do número de carbonos da cadeia alquílica aumenta do AG (~ 50%) para o OG (~ 70%), diminuindo para o LG (~ 65). Podemos então concluir que a percentagem de AO na região interfacial não se correlaciona diretamente com a hidrofobicidade dos compostos, uma vez que ao modificarmos a hidrofobicidade estamos a alterar a sua solubilidade dos antioxidantes nas três regiões.

Os valores de k_I são praticamente independentes da hidrofobicidade do antioxidante. A diferença nos valores de k_I entre o AG e os galatos é provavelmente uma consequência da mudança estrutural que o grupo carboxílico (que é parcialmente ionizado), para um grupo éster, que não pode ser ionizado. De notar que o valor de k_I depende tanto da natureza do antioxidante quanto das propriedades do meio de reação. Mas, como todos os antioxidantes têm o mesmo grupo reacional, mas diferentes cadeias de hidrocarbonetos, o valor de k_I sugere que a zona reativa de antioxidantes está localizada na região interfacial, que é onde o grupo $-N_2^+$ da sonda química é empregue. Uma vez que só se modifica o tamanho da cadeia alquílica, confirma-se que o mecanismo de reação é idêntico para todos os antioxidantes uma vez que os valores obtidos para a constante k_I são bastante similares para os vários galatos em emulsões 4:6 óleo de peixe/tampão citrato.

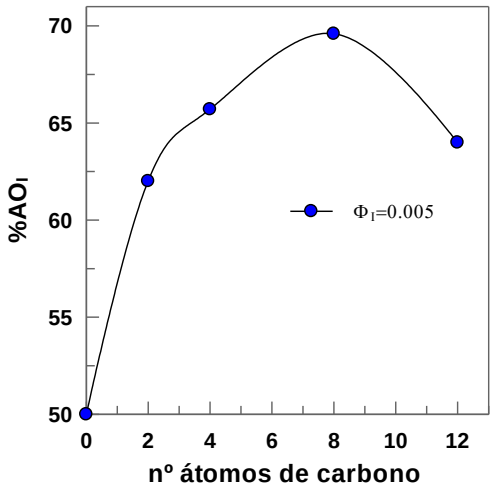


Figura 79 – Variação da percentagem de AO na região interfacial em função número de átomos de carbono da cadeia alquílica. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato), fração de emulsionante Tween 80, Φ_I = 0,005.

3.5. Concentrações efetivas do ácido gálico e seus derivados nas regiões oleosa, aquosa e interfacial das emulsões O/A

Como verificamos pela distribuição dos AOs (*Figura 78*) a percentagem de AO na região interfacial aumenta à medida que Φ_I aumenta até que praticamente todo o AO encontra-se dissolvido na interface e, como consequência, a sua percentagem diminui nas regiões oleosas e aquosas. Contudo, os volumes das regiões aquosa, oleosa e interfacial das emulsões poderão ser diferentes. Assim, a concentração efetiva do AO em cada região é modificada pela modificação das frações de emulsionante, da fase oleosa e da fase aquosa. Deste modo, a partir dos dados de distribuição, determinou-

se as concentrações efetivas de AO em cada região de emulsões 4:6 óleo de peixe/tampão citrato utilizando-se as *equações 57, 58 e 59*, e o valor das percentagens dos antioxidantes em cada região e da concentração estequiométrica:

$$[AO_I] = \frac{[AO_T] \times \%AO_I}{\emptyset_I} \quad (57)$$

$$[AO_O] = \frac{[AO_T] \times \%AO_O}{\emptyset_O} \quad (58)$$

$$[AO_A] = \frac{[AO_T] \times \%AO_A}{\emptyset_A} \quad (59)$$

Na *Figura 80*, encontra-se a variação das concentrações efetivas em cada região da emulsão 4:6 óleo de peixe/tampão citrato.

Os resultados mostram que, para uma mesma razão O/A, as concentrações efetivas dos AOs numa dada região diminuem com o aumento da Φ_I porque estas concentrações dependem da % AO nessa região e do valor da fração de emulsionante, Φ_I. Para uma determinada emulsão, os valores de Φ_A e Φ_O são constantes, mas tanto % AO_A como a % AO_O diminuem com o aumento Φ_I, (*Figura 78)* e como consequência as concentrações diminuem em ambas as regiões, (*Figura 80*). A variação da concentração dos AOs na região interfacial são um pouco mais complexas. A contribuição dos parâmetros % AO_I e Φ_I para a concentração efetiva na região interfacial é oposta, pois, por um lado, a % AO_I aumenta com o aumento Φ_I, atingindo um valor constante, mas ao mesmo tempo existe um aumento do volume da região interfacial. Por exemplo, um aumento na Φ_I de 0,005 - 0,04, existe um aumento no volume interfacial de 8 vezes, enquanto a percentagem de AO na referida região aumenta apenas por um fator de 2 vezes. Como consequência, as concentrações dos AOs na região interfacial diminuem apesar da percentagem de AO aumentar na referida região e tornam-se semelhante (≈10mM) para todo os AO para fração de emulsionante Φ_I=0,04 (*Figura 80*).

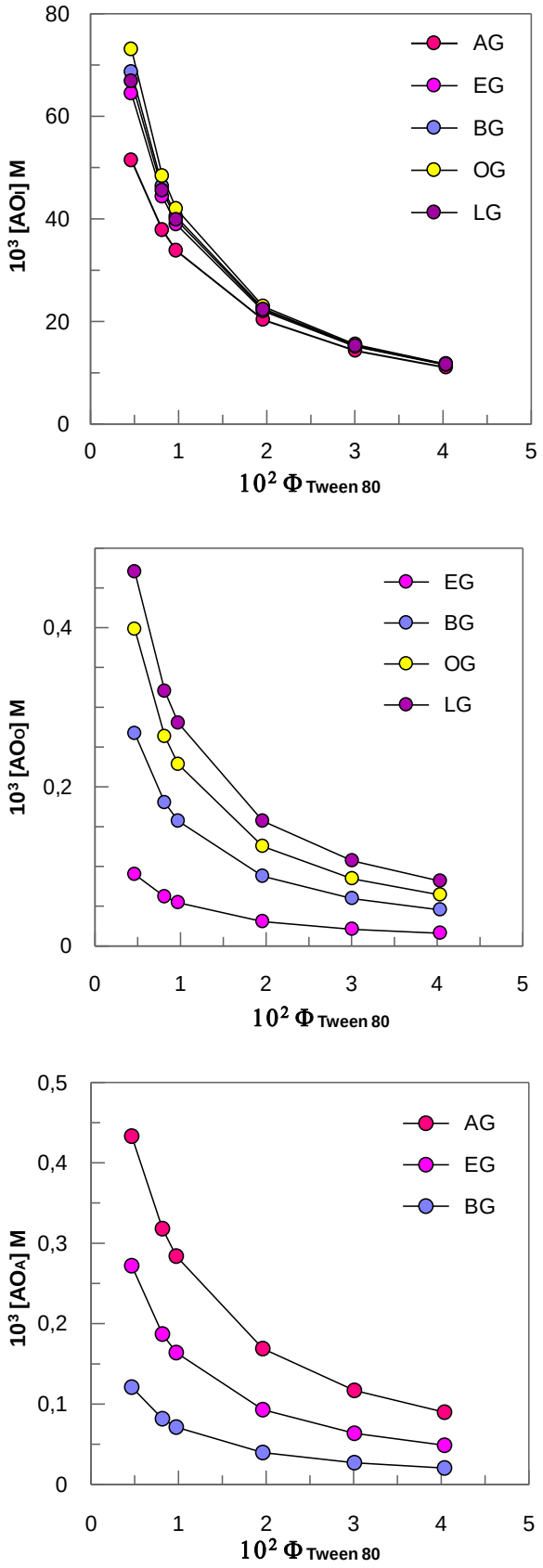


Figura 80 – Variação da concentração efetiva nas 3 regiões da emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato), em função da fração de emulsionante, [AO_T] = 0,5 m M.

Por outro lado, de acordo com a *Figura 80*, verificamos que para qualquer valor de fração de emulsionante, Φ_I, a concentração efetiva na região interfacial é muito superior, num fator de cerca de 22 - 145 vezes, à concentração estequiométrica, enquanto a concentração efetiva na água e no óleo pode ser inclusivamente menor, dependendo do AO considerado. Por exemplo, em qualquer Φ_I, a concentração efetiva do AG na região aquosa é 1,2 a 5,5 vezes menor do que a estequiométrica. A concentração efetiva na região oleosa dos AOs mais hidrofóbicos (C8 e C12) é 1,3 - 6 vezes menor do que a estequiométrica.

Portanto, para qualquer $[AO_T]$, a concentração efetiva dos AOs nas regiões aquosa, oleosa e interfacial de um determinado sistema emulsionado depende da percentagem de AO nessa região e Φ_I. Na região interfacial ambos os parâmetros contribuem em direções opostas, porque um aumento em Φ_I significa um aumento da percentagem de AO_I mas também no volume, sendo o aumento em volume maior que em % AO, enquanto nas regiões do óleo e água a percentagem de AO diminui com o aumento da Φ_I. Em todos os casos, há uma diluição efetiva dos AOs nas três regiões da emulsão ao aumentar Φ_I.

Analisou-se com mais detalhe os efeitos da fração de emulsionante e da razão O/A nas concentrações dos AOs na região interfacial, *Figura 81 (A) e (B)*, usando a *equação 57* para o cálculo da concentração efetiva na região interfacial.

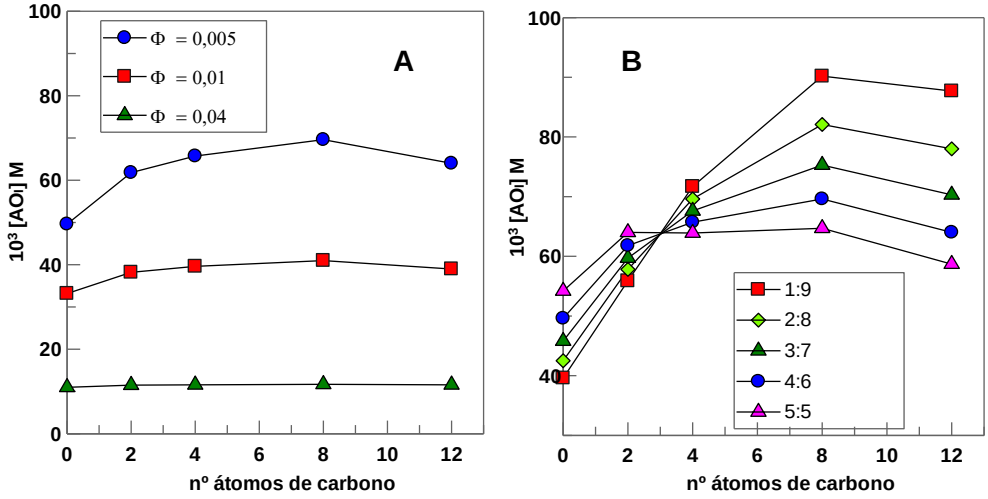


Figura 81 - Concentração efetiva de AO na região interfacial para o AG e seus derivados, emulsão 4:6 O/A em função do número de átomos de carbono, para três frações de emulsionante (A), e o efeito da relação O/A na interfase para a fração de emulsionante Φ_I=0,005 (B), $[AO_T]$ = 0,5 mM.

A *Figura 81 (A)* mostra que para uma relação O/A constante, as diferenças na concentração de AO na região interfacial em função do comprimento da cadeia alquílica

são muito mais importantes para frações de emulsionante mais baixas do que para frações de emulsionante mais altas, dado que para frações de emulsionante mais altas, todos os AO se encontram numa percentagem elevada na região interfacial (~ 80% *Figura 78*), mas para frações de emulsionante, Φ_I, baixas a percentagem de AOs incorporados na região interfacial é muito menor, sendo as diferenças na concentração dos diferentes antioxidantes maiores do que em altos valores de Φ_I.

Por outro lado, a *Figura 81 (B)* mostra o efeito muito complexo que a relação óleo/água tem na concentração dos AOs na região interfacial. A um valor constante de Φ_I = 0,005 (a menor fração de emulsionante), a alteração observada na concentração de AO na região interfacial depende da hidrofobicidade do AO, de modo que a molaridade interfacial dos AOs hidrofílicos aumenta com a crescente razão O/A, mas o oposto é observado para os AOs mais hidrofóbicos. Por exemplo, o [AG_I] aumenta de cerca de 40 mM para ~ 54 mM, mas (LG_I) diminui de ~ 88 mM (O/A = 1: 9) para ~ 59 mM (O/A = em emulsões 1:9 (O/A) e 5:5 (O/A) respetivamente .

Estes resultados mostram que a alteração da relação O/A usada para preparar as emulsões pode modular significativamente as concentrações dos AOs na região interfacial e pode até mesmo modificar a ordem relativa da percentagem dos antioxidantes na região interfacial: um aumento na relação O/A favorece a incorporação dos AOs hidrofílicos na região interfacial das emulsões, mas diminui a incorporação de AOs hidrofóbicos.

4. Distribuição do ácido gálico e seus derivados em nanoemulsões

Uma das hipóteses em que se baseia a aplicação do modelo cinético da pseudofase para a determinação da distribuição de antioxidantes é que sua aplicação é independente do tamanho das gotas do sistema emulsionado.

A experiência do nosso grupo de investigação no estudo da reatividade química em sistemas coloidais e juntamente com a evidência apresentada por outros investigadores, faz-nos acreditar que tal hipótese está correta por duas razões principais:

1) O bom ajuste dos dados experimentais às equações derivadas do modelo da pseudofase, que pressupõe que o tamanho da gota não afeta os resultados da distribuição;

2) A cinética química indica que as velocidades das reações químicas que ocorrem em solução dependem das concentrações dos reagentes e não da superfície da reação.

A área de transferência afeta a velocidade das reações apenas no caso em que ocorre transferência de reagentes entre fases (reações em sistemas heterogéneos). Esta situação de transferência de reagentes não é aplicável às reações de oxidação lipídica ou reações de inibição por parte dos antioxidantes em emulsões. De facto, em emulsões, vários domínios podem ser distinguidos nos quais a reação pode ocorrer. Mas esses domínios não podem ser considerados como verdadeiras fases, uma vez que seus limites não são claramente definidos como em sistemas binários heterogêneos. No entanto, estes domínios ou regiões têm propriedades ou características diferentes e podem ser referidos como uma "pseudofase" ou região, pelo que em sistemas emulsionados, pode ser feita uma distinção entre as regiões aquosa, oleosa e interfacial.

A fim de demonstrar experimentalmente a hipótese de que a distribuição e a eficácia dos antioxidantes não dependem do tamanho das gotas que compõem o sistema emulsionado, mas apenas da concentração dos reagentes na região interfacial destes sistemas, estudou-se a distribuição e a eficiência antioxidante dos galatos em nanoemulsões compostas de óleo de peixe, tampão citrato e Tween 80. Realizou-se a experiência em condições idênticas às utilizadas anteriormente para os mesmos compostos em emulsões, tendo sido a única diferença o tamanho das gotas que compõem o sistema emulsionado. Além disso, também avaliamos o efeito da razão água/óleo utilizada na produção de emulsões sobre a eficiência antioxidante dos galatos.

4.1. Determinação das constantes de partição do ácido gálico e seus derivados em nanoemulsões

Determinou-se a distribuição dos antioxidantes nas nanoemulsões de acordo com o modelo cinético da pesudofase, descrito na *secção I*.

Na *Figura 82* está representado um exemplo de uma variação típica da absorvância do corante em função do tempo, bem como a representação de $\ln(A_t - A_{inf})$ em função do tempo, para o EG e OG. Em todos os casos, os pares de dados absorvância-tempo obtidos ajustaram-se perfeitamente à equação integrada de ordem 1, sendo assim possível obter a constante de velocidade observada, k_{obs}.

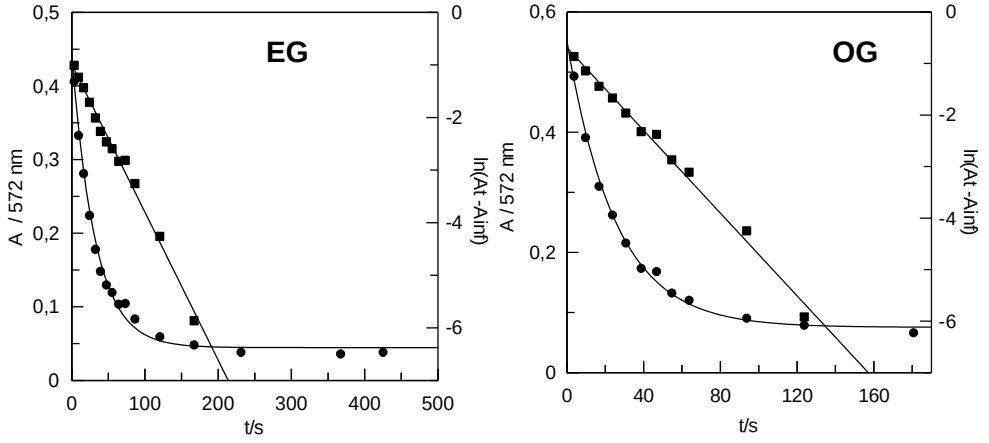


Figura 82 - Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln [A_t-A_{inf}] vs tempo, para o EG e para o OG. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65/ Tween 80), Φ_I=0,0097, [16-ArN_2^+] = 2,83× $10^{-4}M$, [AO] = 2,0× $10^{-3}M$, [NED] =0,019 M e *T*= 25ºC.

As *Figuras 83 - 85* mostram as variações de k_{obs} com Φ_I obtidas para os diferentes galatos. Em todos os casos, observou-se uma diminuição da k_{obs}, num fator que varia entre 3-7 vezes quando a Φ_I aumenta de 0,005 a 0,04.

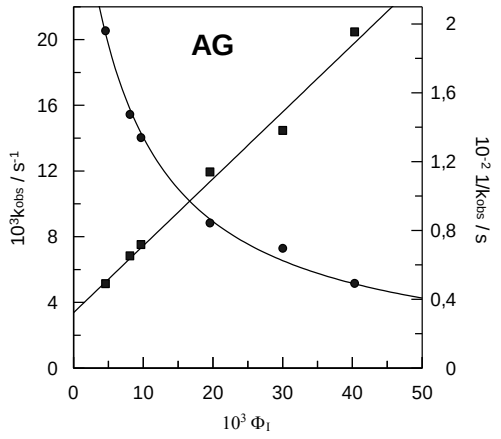


Figura 83 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 48* e *49* para o AG. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,82× $10^{-4}M$, [AO] =2,0× $10^{-3}M$, [NED] =0,019 M e *T*= 25ºC.

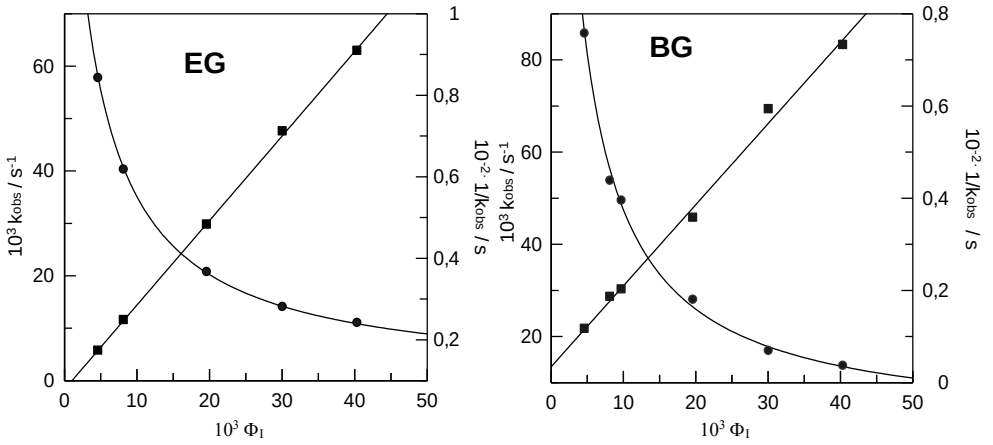


Figura 84 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 31* e 32, para EG e BG Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN$_2^+$] =1,42× $10^{-4}M$, [AO] =2,0× $\mathbf{10}^{-3}M$, [NED] =0,019 M e *T*= 25ºC.

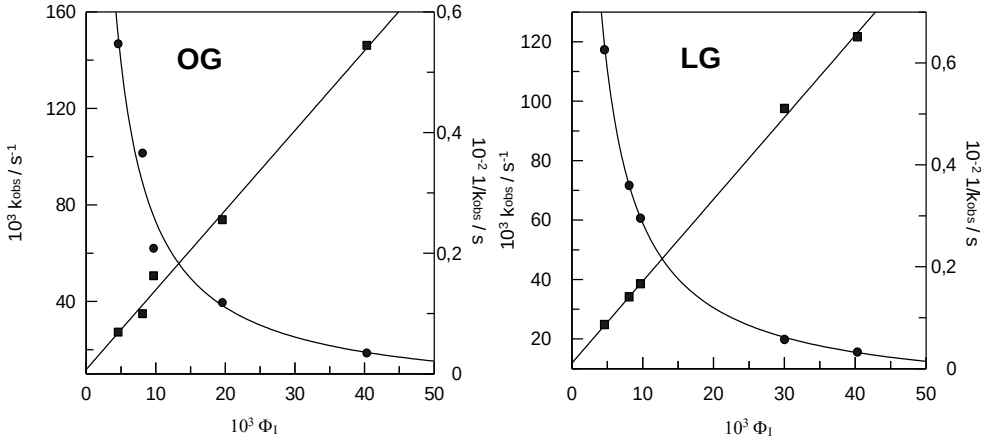


Figura 85 - Representação de k_{obs} e 1/k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 42* para o OG e para o LG. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), [16-ArN$_2^+$] = 2,84x10^{-4} M, [AO] = 3,05x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25,0ºC.

Determinou-se as constantes de partição entre as regiões aquosa-interfacial, P_A^I e óleo-interfacial, P_O^I, ajustando-se as variações de k_{obs} com a fração de emulsionante, Φ_I, de acordo com as equações derivadas do modelo cinético da pseudofase, *secção I*.

Como verificado anteriormente pelo valor da constante de partição binária (*Tabela 10*), espera-se que o AG se distribua apenas entre a região aquosa e interfacial, tendo sido utilizado o modelo simplificado para determinar a sua constante de partição P_A^I. Já os galatos EG e BG deverão distribuir-se pelas 3 regiões da nanoemulsão, pelo que foi utilizado o modelo completo, para determinar as constantes de partição P_A^I e P_O^I. Os antioxidantes mais hidrofóbicos, como OG e LG, espera-se que estejam distribuídos

preferencialmente pelas regiões do óleo e interfacial, determinando-se a sua constante de partição através do modelo simplificado. Na *Tabela 18* encontram-se os valores das contantes de partição, P_A^O, P_A^I, P_O^I e os valores de k_I calculados.

Tabela 18 - Sumário dos valores das constantes de partição e da velocidade na região interfacial, para o ácido gálico e seus derivados .

	GA	**EG**	**BG**	**OG**	**LG**
$\boldsymbol{P_A^I}$	109 ± 19	248 ± 21	578 ± 35	---	---
$\boldsymbol{P_O^I}$	---	750 ± 27	262 ± 21	190 ± 39	152 ± 24
$\boldsymbol{10^2\ k_I}$ **($M^{-1}s^{-1}$)**	13,6 ± 0,7	24,1 ± 3,7	30,1 ± 0,3	39,6 ± 3,1	31,4 ± 0,7

Os resultados da *Tabela 18* mostram que é possível avaliar as contribuições relativas dos efeitos do meio e da concentração nas constantes de velocidade observadas. Verificou-se que os bons ajustes obtidos dos dados experimentais para as equações que são previstas pela aplicação do modelo de pseudofase para cada situação indicam que as hipóteses nas quais ele é baseado (ver *secção I*) são válidas e, portanto, que o modelo de pseudofase fornece uma metodologia e uma base teórica adequada para determinar as constantes de partição de antioxidantes também em sistemas nanoemulsionados. O modelo da pseudofase é válido nas circunstâncias atuais porque todos os componentes do sistema estão em equilíbrio dinâmico, isto é, o transporte de matéria entre as diferentes regiões da nanoemulsão não é limitante.

Como verificado para as emulsões 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, uma vez que só se modifica o tamanho da cadeia alquílica, confirma-se que o mecanismo de reação para todos os ésteres do AG é idêntico para todos os antioxidantes uma vez que os valores obtidos para a constante k_I são bastante similares para os vários derivados. A diferença nos valores de k_I entre o AG e os galatos é provavelmente uma consequência da mudança estrutural que o grupo carboxílico (que é parcialmente ionizado), para um ao grupo éster, que não pode ser ionizado.

Os valores das constantes de partição P_A^I e P_O^I refletem os efeitos da concentração na k_{obs}. Em todos os casos, os valores de P_A^I e P_O^I obtidos, *Tabela 18*, são maiores que a unidade, o que indica que a energia livre de Gibbs para a transferência deles entre a região aquosa e oleosa para a interfacial é negativa. Isto é, todos os galatos mostram uma tendência natural para se localizarem principalmente na região

interfacial das nanoemulsões. Os valores de P_A^I aumentaram com o aumento da hidrofobicidade dos antioxidantes, o que implica que a sua solubilidade na água diminui. Pelo contrário, os valores de P_O^I diminuíram com o aumento do número de átomos de carbono na cadeia alquílica, o que reflete um aumento da solubilidade no óleo. A diferença destas duas contribuições reflete a percentagem de antioxidantes em cada região.

Determinou-se a percentagem de AO nas nanoemulsões, a partir das constantes de partição, a partir das *equações 36, 37 e 38* para EG e BG, das *equações 46 e 47* para OG e LG, e das *equações 51 e 52* para o AG. Na *Figura 86* apresenta-se a percentagem do ácido gálico e dos seus derivados em cada uma das regiões (oleosa, aquosa e interfacial) numa nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato (0,04 M, pH = 3,65), para várias frações de emulsionante.

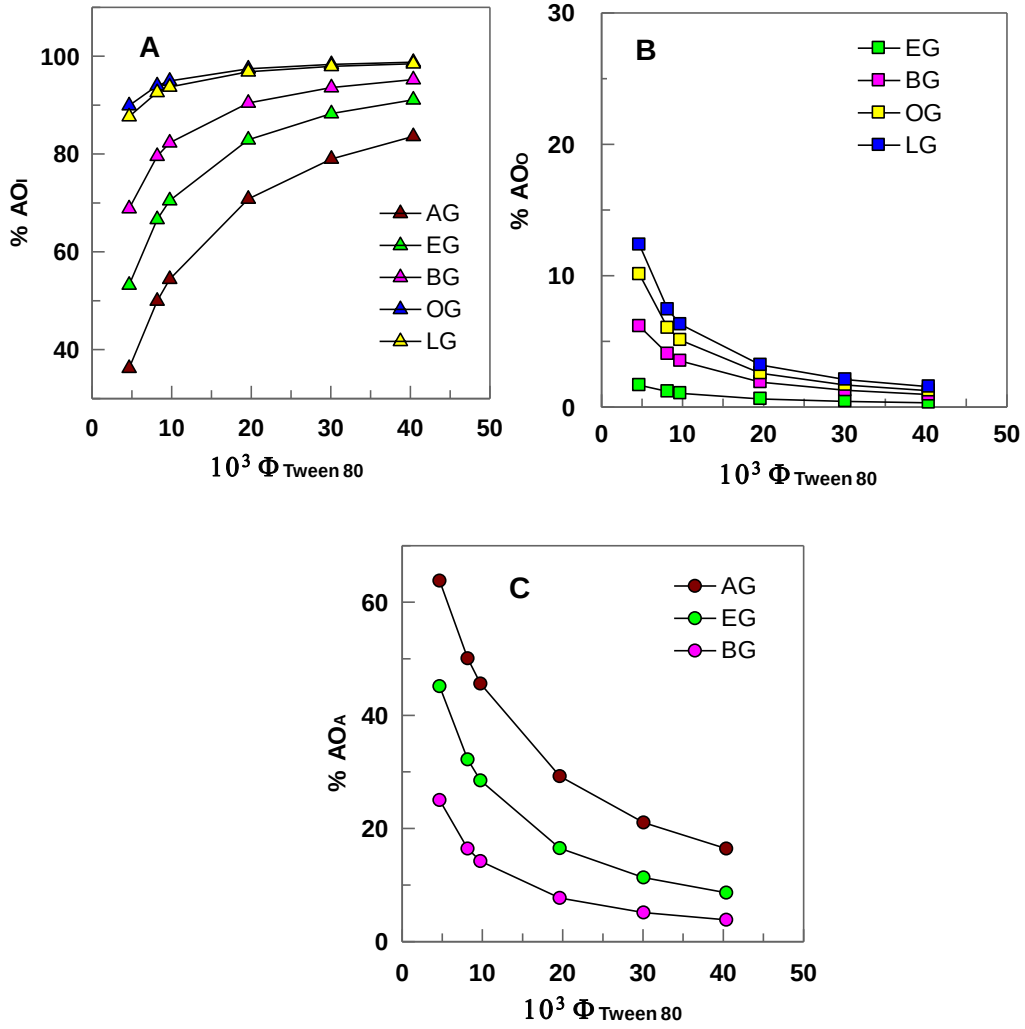


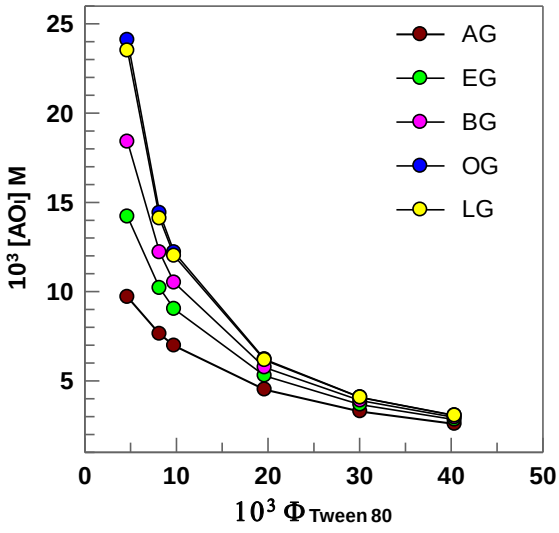
Figura 86 - Variação da percentagem do ácido gálico e dos seus derivados na região interfacial (A), na região oleosa (B) e na região aquosa (C), numa nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65), com a fração de emulsionante Tween 80.

Analisando-se os resultados para uma fração de emulsionante de 0,005, verifica-se que 40% do ácido gálico (AG) se distribui na região aquosa sendo o antioxidante que tem maior afinidade com esta região. O antioxidante que se distribui em maior percentagem na região interfacial é o galato de octilo (OG) com uma percentagem de 90%.

A percentagem de AO presente na nanoemulsão na região interfacial aumenta quando a fração de emulsionante Tween 80 aumenta para 0,042, verificando-se desta forma uma influência significativa da fração de emulsionante sobre a percentagem de AO presente em cada uma das regiões da nanoemulsão. De notar que com o aumento da fração de emulsionante a diferença de percentagem existente na região interfacial dos vários AOs diminui consideravelmente em especial para os compostos mais lipofílicos.

4.1. Concentrações efetivas do ácido gálico e derivados nas regiões oleosa, aquosa e interfacial das nanoemulsões

Determinou-se a concentração efetiva dos AOs em cada região da nanoemulsão 1:9 (O/A), a partir das percentagens dos AOs presente em cada região (*Figura 86*) e utilizando as *equações 57*, *58* e *59*, *Figura 87*.



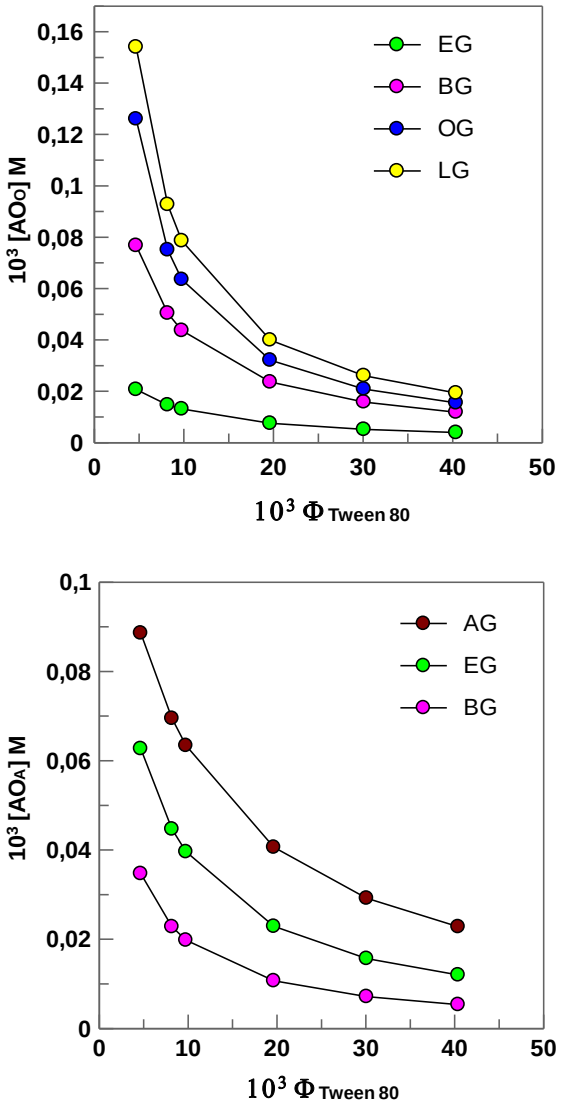


Figura 87 - Variação da concentração efetiva nas 3 regiões da nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato), com a fração de emulsionante Tween 80, [AO$_T$] = 0,125 m M.

Pela observação das concentrações de AO na região interfacial (*Figura 87*), verificou-se que para qualquer valor de Φ_I, a concentração efetiva dos AOs na região interfacial é muito maior, num fator de 20-190 vezes, do que a estequiométrica ([AO$_T$] = 1, 25×10^{-4} M). Por outro lado, para qualquer Φ_I, a concentração efetiva de AG na região aquosa é 1,4 a 23 vezes menor do que a estequiométrica. A concentração efetiva na região oleosa é menor 1,6 a 10,5 vezes do que a estequiométrica no caso do EG e do BG. Verifica-se também que com o aumento da fração de emulsionante a concentração de AO em cada uma das regiões diminui.

Uma comparação preliminar entre os resultados na *Figura 86* com os da *Figura 87* mostra que, como nas emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato), uma diminuição

da % AO_A e % AOo leva a uma diminuição na concentração efetiva dos AOs nessas regiões. No entanto, um aumento da % AO_I não implica um aumento na concentração do AOs na região interfacial (AO_I), mas sim uma diminuição. As razões para este comportamento já foram discutidas na *seção 3.4 das emulsões*, onde se conclui que o aumento da % AO_I não compensa a diluição associada ao aumento do volume da região interfacial, Φ_I. Assim, verificou-se que a concentração efetiva dos AOs na região interfacial é maior para a fração de emulsionante de 0,005, ocorrendo uma diluição significativa dos AOs nesta região, com o aumento da fração de emulsionante. Verificou-se igualmente que a diferença de concentração dos AOs na região interfacial é mais acentuada para a fração de emulsionante menor, diminuindo esta diferença á medida que a fração de emulsionante aumenta (*Figura 87 e 88(A)*).

Na *Figura 88*, observa-se a variação da concentração efetiva dos AO na região interfacial em função do tamanho da cadeia alquílica dos AOs para três concentrações de emulsionante (A), e o efeito da razão O/A em função do número de átomos de carbono para a fração de emulsionante de 0,005 (B).

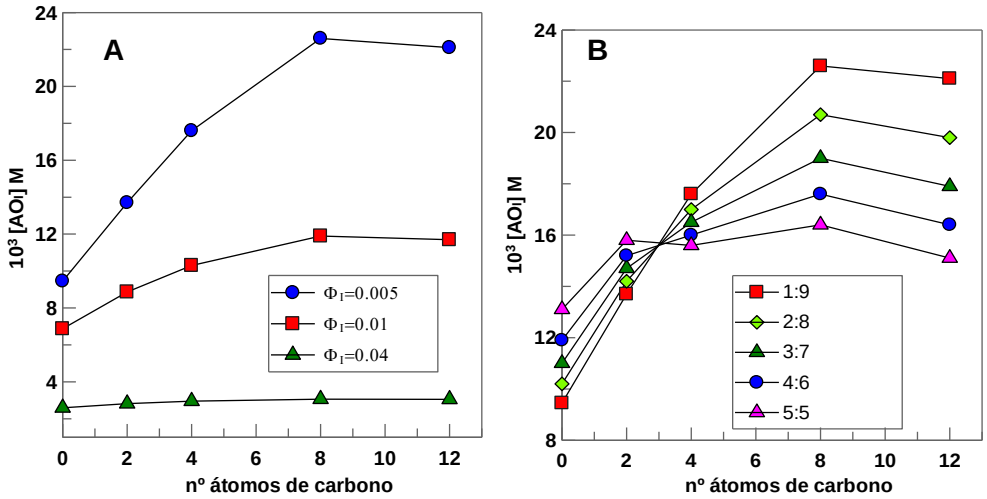


Figura 88 - Concentração efetiva de AO na região interfacial para o AG e derivados, nanoemulsão 1:9 O/A em função do número de átomos de carbono, para três frações de emulsionante (A), e o efeito da relação O/A na região interfacial para a fração de emulsionante Φ_I =0,005 (B), [AO_T] = 0,125 M.

Os resultados mostram que a variação da concentração de AO na região interfacial em função do número de átomos de carbono na cadeia alquílica é mais percetível para frações de emulsionante mais baixas (Φ_I = 0,005) do que para frações de emulsionante mais altas (Φ_I = 0,04), onde é praticamente constante. Isto é consequência da incorporação de AOs na região interfacial, à medida que aumenta a

fração de emulsionante, uma vez que para frações de emulsionante mais altas, uma grande percentagem de todos os AOs está localizada nessa região.

A *Figura 88 (B*), mostra o efeito complexo que a relação óleo/água usada na preparação das nanoemulsões tem na concentração dos AOs na região interfacial. A um valor constante de Φ_I = 0,005 (a fração de emulsionante mais baixa), a alteração observada na concentração de AO na região interfacial depende da hidrofobicidade do AO, de modo que a concentração interfacial dos AOs hidrofílicos aumenta com o aumento da razão O/A, mas a concentração dos AO mais hidrofóbicos diminui. Por exemplo, para uma concentração estequiométrica $[AO_T]$ = 0,125 mM, a $[AG_I]$ aumenta de ~ 9,5 mM para $[AG_I]$ ~ 13,6 mM , mas a concentração efetiva para o LG $[LG_I]$ diminuiu de ~ 22,0 mM para ~ 15,0 mM, quando se altera a relação O/A de 1:9 para 5:5. Para os galatos de hidrofobicidade intermediária (EG e BG), mudanças na relação O/A levam a pequenas mudanças na concentração de AO na região interfacial (~ 16,0 mM).

5. Análise comparativa da distribuição dos antioxidantes em emulsões e nanoemulsões

Analisando em conjunto os resultados obtidos para as emulsões e nanoemulsões com óleo de peixe, é possível analisar se o tamanho da gota do sistema emulsionado tem ou não um efeito significativo sobre a distribuição dos antioxidantes.

Uma análise comparativa da distribuição , a partir das constantes de partição no sistema emulsionado, verificou-se que estas constantes determinadas utilizando nanoemulsões ou emulsões apresentam diferenças inferiores a 6% (*Tabela 19*).

Tabela 19 - Constantes de partição para o ácido gálico e seus derivados numa emulsão e numa nanoemulsão.

		AG	EG	BG	OG	LG
Nanoemulsão	P_A^I	109 ± 19	248 ± 21	578 ± 35	---	---
	P_O^I	---	750 ± 27	262 ± 21	190 ± 39	152 ± 24
	$10^2\ k_I$ ($M^{-1}s^{-1}$)	13,6 ± 0,7	24,1 ± 3,7	30,1 ± 0,3	39,6 ± 3,1	31,4 ± 0,7
Emulsão	P_A^I	118 ± 19	233 ± 13	559 ± 27	---	---
	P_O^I	---	707 ± 15	253 ± 56	183 ± 26	142 ± 37
	$10^2\ k_I$ ($M^{-1}s^{-1}$)	8,2 ± 0,003	15,2 ± 1,8	16,2 ± 1,9	14,8 ± 0,9	13,3 ± 0,5

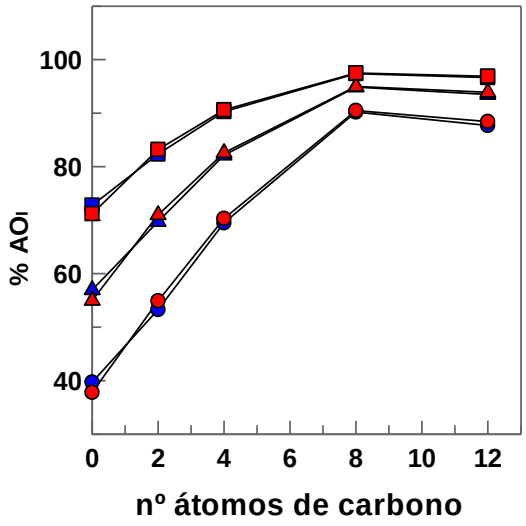


Figura 89 - Distribuição comparativa do ácido gálico e seus derivados em emulsões 1:9 e nanoemulsões 1:9 (v/v óleo de peixe/tampão citrato), para várias frações de emulsionante Tween 80: Nanoemulsões: -●- Φ_I =0,005; -▲- Φ_I =0,01; -■- Φ_I =0,02: Emulsões: -●- Φ_I =0,005; -▲- Φ_I =0,01; -■- Φ_I =0,02.

Determinando a percentagem de AO presente na região interfacial, em cada um dos sistemas emulsionados, emulsão e nanoemulsão, verificamos que a percentagem é semelhante, aumentando até um número de 8 carbonos OG (C8) e diminuindo ligeiramente para o LG (C12) (*Figura 89*).

Uma vez que a velocidade da reação depende das concentrações dos reagentes no local da reação (região interfacial), a eficiência antioxidante deve depender da concentração nesta região do AO e, portanto, supomos que deve haver uma relação direta entre a concentração de AO na região interfacial e a sua eficiência. Além disso, uma vez que a distribuição de cada composto não foi afetada pelo tamanho da gota, espera-se uma eficácia relativa de atividade antioxidante seja semelhante, em emulsões e nanoemusões de óleo de peixe - em- água.

6. Avaliação da atividade antioxidante em sistemas emulsionados

6.1. Atividade antioxidante do ácido gálico e seus derivados em emulsões

Devido ao elevado número de amostras necessárias para efetuar a avaliação da atividade antioxidante dos compostos, surgiu a necessidade de proceder á avaliação do grau de oxidação lipídica destes recorrendo a um método simples e rápido. Assim, determinou-se o grau de oxidação lipídica dos sistemas emulsionados através da determinação em dienos conjugados.

No entanto, de modo a verificar se a determinação do conteúdo em dienos conjugados das amostras era diretamente proporcional ao índice de peróxidos, foi efetuado um estudo preliminar de estabilidade com óleo de peixe na ausência de AO, *Figura 90*.

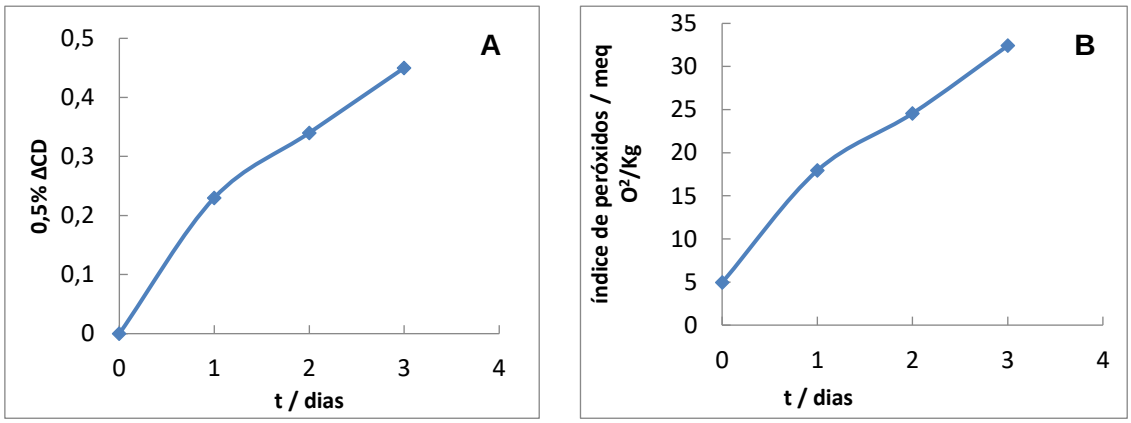


Figura 90 – Avaliação do nível de oxidação de emulsões 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, ao longo do tempo monitorizadas, pelo aumento do conteúdo em dienos conjugados (A) e índice de peróxidos (B).

Verificou-se que o conteúdo em dienos conjugados das amostras correlacionava-se com o índice de peróxidos. Assim , utilizou-se o conteúdo em dienos conjugados para avaliar o nível de oxidação das amostras e o tempo necessário para cada amostra atingir o conteúdo em dienos conjugados de 0.5% como parâmetro indicativo da capacidade antioxidante de cada composto.

Começou-se por estudar a atividade antioxidante do ácido gálico e dos seus derivados em emulsões constituídas por óleo de peixe e tampão citrato (0,04 M, pH = 3,65), com 1% de Tween 80 e contendo 0,24 mM de cada um dos antioxidantes. Submeteram-se as emulsões a um teste de aceleração oxidativa a uma temperatura de 50 ºC.

Verificou-se que para uma temperatura de 50 ºC e para uma concentração de antioxidante na emulsão de 0,24 mM, nenhum AO mostrou efeito antioxidante. Pelo contrário, observaram-se efeitos pró-oxidantes para todos os AOs.

Deste modo aumentou-se a concentração de antioxidante nas emulsões de modo a serem observados efeitos antioxidantes. Assim, repetiu-se a experiência inicial para uma concentração de antioxidante adicionado às emulsões de 0,5 mM e para uma temperatura de estufa de 40 ºC. A concentração de 0,5 mM, encontra-se dentro dos limites permitidos pela Legislação Portuguesa [284, 285]. Determinou-se o grau de oxidação lipídica das amostras ao longo do tempo através da determinação do conteúdo de dienos conjugados. A *Figura 91* representa o tempo necessário para o conteúdo de dienos conjugados alcançar o valor de 0,5% nas emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato) com 1% de Tween 80.

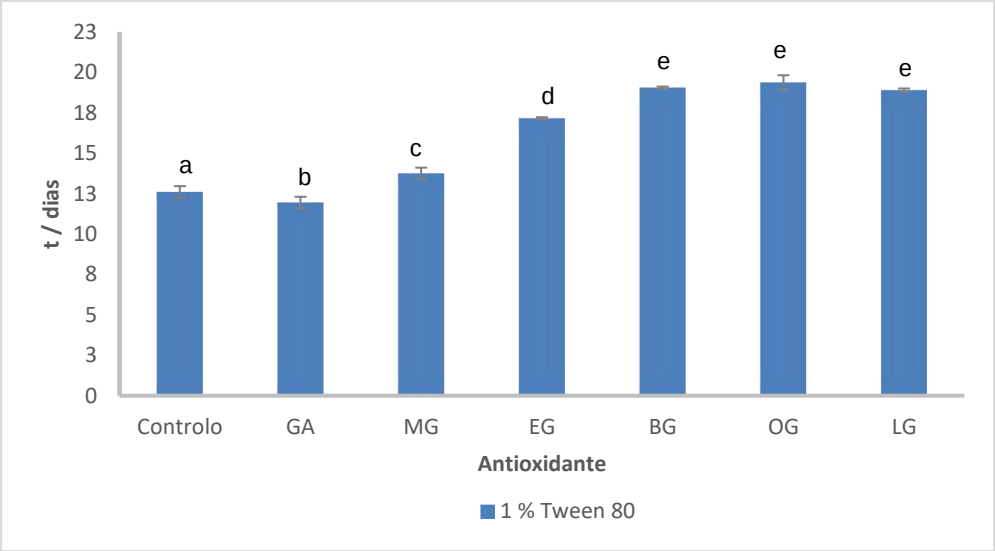


Figura 91 – Tempo (dias) para que as emulsões contendo 1% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5%. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 /Tween 80), [AO_T] = 0,5 mM, T = 40 ºC.

De acordo com o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a atingir o valor de 0,5%, para a percentagem de emulsionante de 1%, a ordem da atividade

antioxidante obtida foi OG ~ BG ~ LG > EG > MG > GA, contrariando o "Paradoxo Polar" que prevê que antioxidantes menos polares sejam mais eficazes em meios mais polares como é o caso de sistemas emulsionados do tipo O/A. De facto, e apesar da crescente hidrofobicidade, não foi possível observar diferenças na eficácia antioxidante dos galatos de butilo e octilo e laurilo. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por *Medina et. al* [286] para uma série de ésteres do ácido gálico em emulsões de óleo de peixe/água, onde se verificou igualmente uma atividade antioxidante semelhante para os derivados BG e LG.

A atividade antioxidante numa emulsão depende da partição dos antioxidantes entre as diferentes regiões que a constituem, da estabilidade dos antioxidantes e muito particularmente dos fenómenos que ocorrem ao nível da região interfacial. Desta forma, a concentração de antioxidante na região interfacial terá um papel importante no que respeita à estabilidade oxidativa das emulsões, uma vez, que as reações de oxidação parecem ocorrer preferencialmente nesta região. Assim, os antioxidantes que se encontram em maior percentagem na região interfacial, para uma mesma quantidade de emulsionante, parecem exercer uma melhor atividade antioxidante, *Figura 92*.

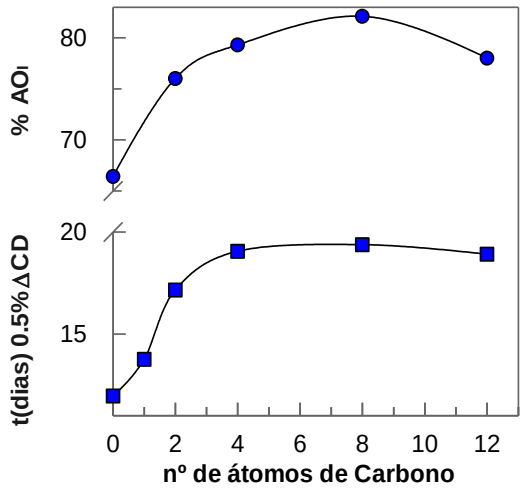


Figura 92 – Correlação da percentagem de AO na região interfacial e da eficiência AO, em função do aumento da cadeia alquílica, para uma emulsão 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, contendo 1% de Tween 80.

Na *Figura 93* está representado o efeito da fração de emulsionante sobre a estabilidade oxidativa das emulsões. Os resultados mostram que a fração de emulsionante exerce uma influência significativa sobre a estabilidade oxidativa sendo que, para um mesmo antioxidante, as emulsões com menor fração de emulsionante são as mais estáveis.

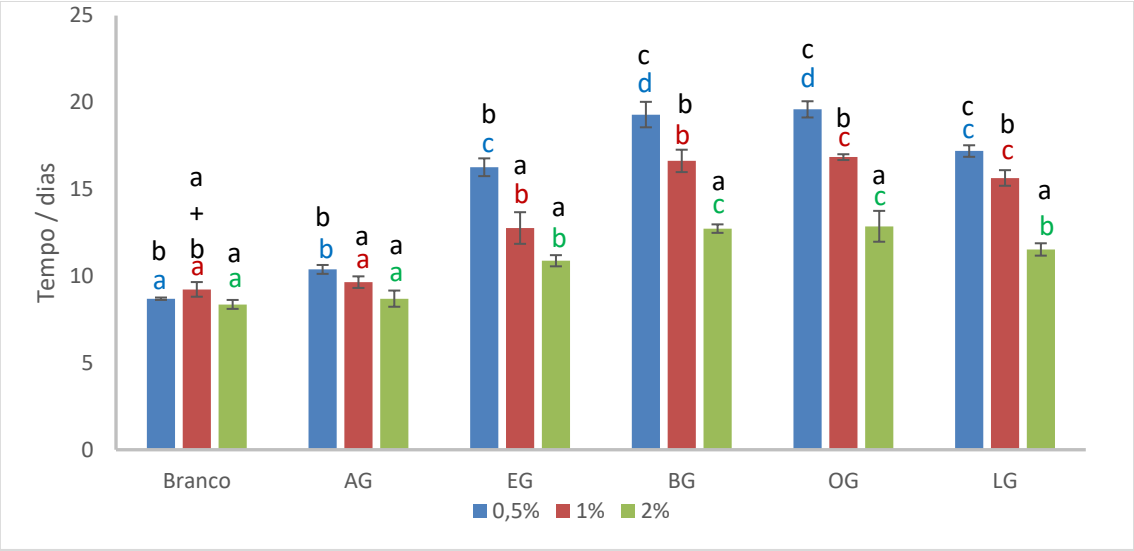


Figura 93 - Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0,5%, 1% e 2% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5%. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes; letras coloridas – compostos diferentes, percentagem de Tween 80 igual; letras pretas – compostos iguais, percentagem de Tween 80 diferente). Condições experimentais: emulsões 4:6 (Óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 /Tween 80), [AO_T] = 0,5 mM, T = 40 ºC.

De notar que variando a percentagem de Tween 80 no controlo não se verificou uma diferença estatisticamente significativa na estabilidade oxidativa. Segundo a distribuição dos antioxidantes nas emulsões, com o aumento da fração de emulsionante, a percentagem de antioxidante na região interfacial também aumenta. Contudo, ocorre simultaneamente uma diluição do antioxidante na região interfacial que não é suficiente para contrabalançar o acréscimo da quantidade de AO nessa região *Figura 94*.

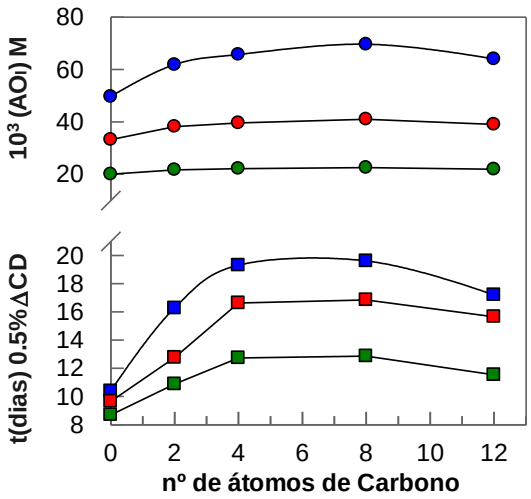


Figura 94 - Variação do tempo em dias para alcançar 0.5% dienos conjugados e concentração efetiva de AO na região interfacial de emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato) em função do número de átomos de carbono, para as frações de emulsionante de Tween 80: -●- Φ_I =0,005; -■- Φ_I =0,005; -●- Φ_I =0,01, -■- Φ_I =0,01 e -●- Φ_I =0,02; -■- Φ_I =0,02, [AO_T] = 0,5 mM.

Verificou-se que os antioxidantes BG e OG apresentaram uma maior eficácia antioxidante, não se tendo observado diferenças estatisticamente significativas na eficácia antioxidante entre eles para uma mesma percentagem de Tween 80. O LG para uma fração de emulsionante, Φ_l = 0,005 apresentou uma menor capacidade AO que o BG e OG. O aumento da atividade antioxidante de compostos contendo o mesmo grupo reativo com o aumento da hidrofobicidade até um determinado ponto a partir do qual depois diminui denomina-se efeito cut off. Assim, verificou-se que para uma mesma fração de emulsionante, a ordem de atividade dos AOs correlacionou-se com a concentração de AO na região interfacial (*Figura 94*).

Por outro lado, podemos concluir que a pequena percentagem distribuída na região aquosa parece influenciar negativamente a estabilidade oxidativa em emulsões, ou seja, para uma percentagem semelhante de AO na região interfacial, as emulsões contendo uma maior percentagem de AO na fase aquosa são mais instáveis.

6.2. Atividade antioxidante do ácido gálico e seus derivados em nanoemulsões

Estudou-se a atividade antioxidante do ácido gálico e dos seus derivados em nanoemulsões formadas por óleo de peixe e tampão citrato (0,04 M, pH= 3,65), com 0,5 %, 1% e 2% de Tween 80 e contendo 0,125 mM de cada um dos antioxidantes. Para tal, submeteram-se as emulsões a um teste de aceleração oxidativa a uma temperatura de 40 ºC (teste da estufa de Schaal). Estas experiências foram realizadas em triplicado.

Efetuou-se a determinação do grau de oxidação lipídica através da determinação do conteúdo em dienos conjugados.

A *Figura 95* mostra um exemplo típico da cinética de oxidação lipídica obtida, medindo o tempo necessário para se obter um incremento na produção de dienos conjugados de 0.5 %.

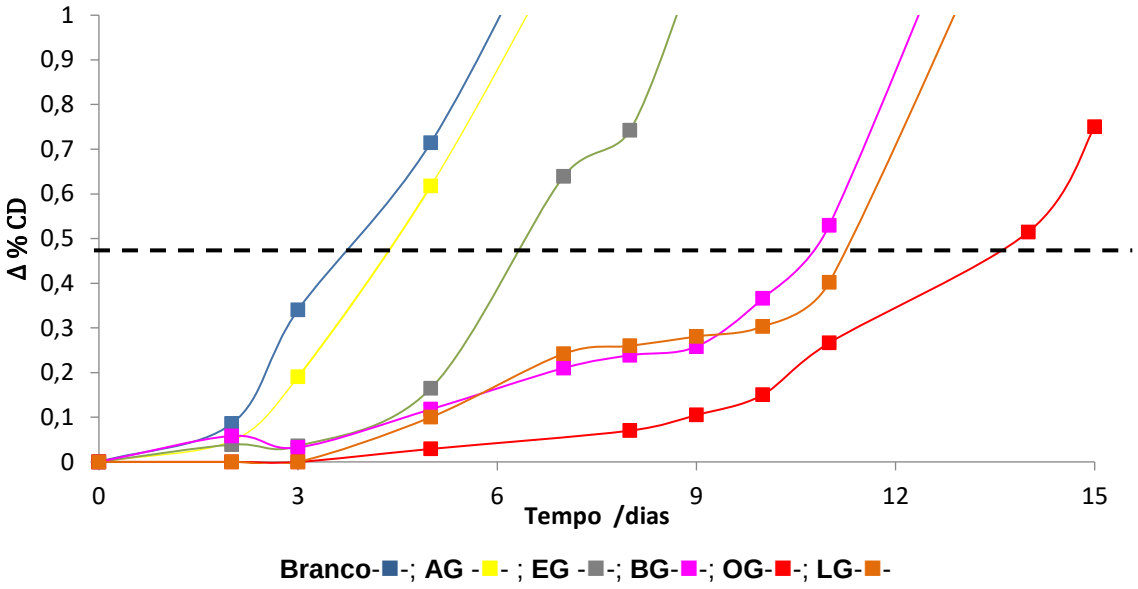


Figura 95 – Efeito do AG e dos galatos na oxidação das nanoemulsões 1:9 óleo de peixe/tampão citrato, a T = 40ºC, para a fração de emulsionante 0,005 monitorizada pelo aumento da percentagem em dienos conjugados.

A *Figura 96* representa o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a alcançar o valor de 0,5% nas nanoemulsões contendo 0,5%, 1% e 2%, de emulsionante.

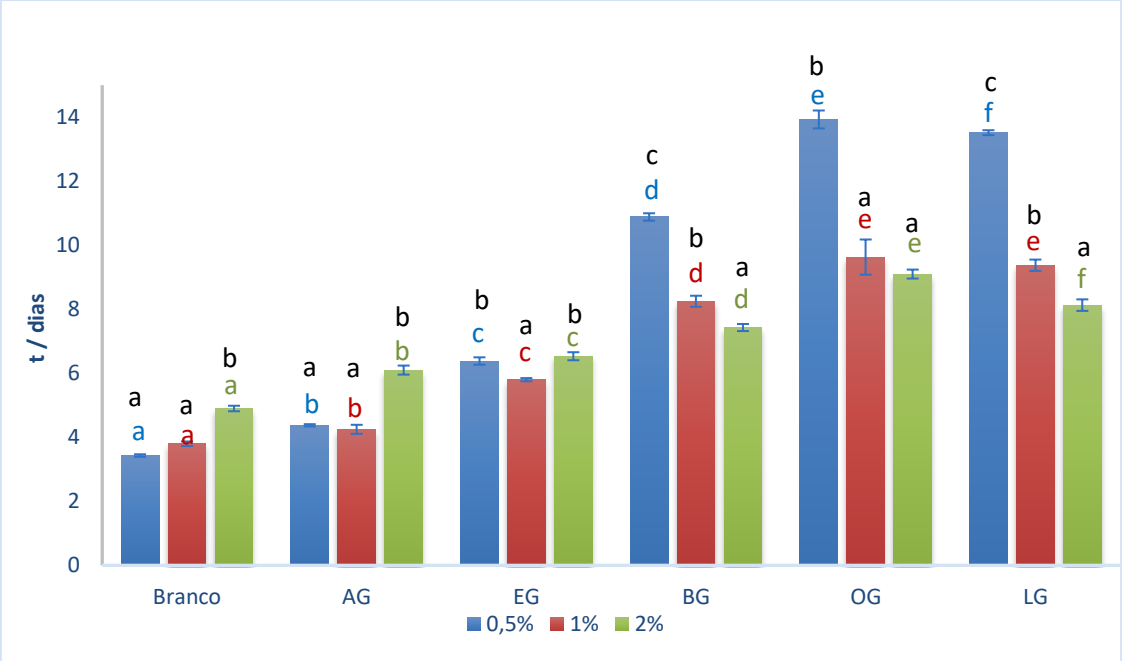


Figura 96 - Tempo (dias) para que as nanoemulsões contendo 0,5%, 1% e 2% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes: ; letras coloridas – compostos diferentes, percentagem de Tween 80 igual; letras pretas – compostos iguais, percentagem de Tween 80 diferente). Condições experimentais: nanoemulsões 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,65/ Tween 80) e [AO_T] = 0,125 mM.

De acordo com o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a atingir o valor de 0,5 %, para a percentagem de emulsionante de 0,5 %, e 2% a ordem de atividade antioxidante foi: OG> LG > BG > EG > AG > controlo. Nas nanoemulsões contendo 1% de emulsionante, a ordem de eficácia antioxidante foi bastante semelhante à obtida anteriormente exceto para o OG que não mostrou ser mais eficiente que o LG.

O paradoxo polar prevê que os antioxidantes menos polares sejam mais eficazes em meios emulsionados do tipo O/A. A ordem de eficácia obtida não obedece ao paradoxo polar na medida em que o antioxidante mais hidrofóbico, o LG, não apresenta maior eficácia que o galato de octilo nos sistemas nanoemulsionados utilizados. Assim, em nanoemulsões óleo de peixe/tampão citrato, a eficácia dos antioxidantes aumenta até ao OG, verificando-se assim o efeito cut off.

A atividade antioxidante numa nanoemulsão depende da partição e distribuição dos antioxidantes entre as diferentes regiões que a constituem, da estabilidade dos antioxidantes e, muito particularmente dos fenómenos interfásicos ao nível da região interfacial. Desta forma, a concentração de antioxidante nesta região terá um papel importante no que respeita à estabilidade oxidativa. Uma vez que todos os derivados do ácido gálico mostraram uma atividade antirradicalar bastante semelhante, as diferenças observadas só podem advir da diferente distribuição dos vários antioxidantes nas nanoemulsões. Assim, os antioxidantes que se encontram em maior percentagem na região interfacial, para uma mesma quantidade de emulsionante, exerceram uma atividade antioxidante melhor (*Figura 97*).

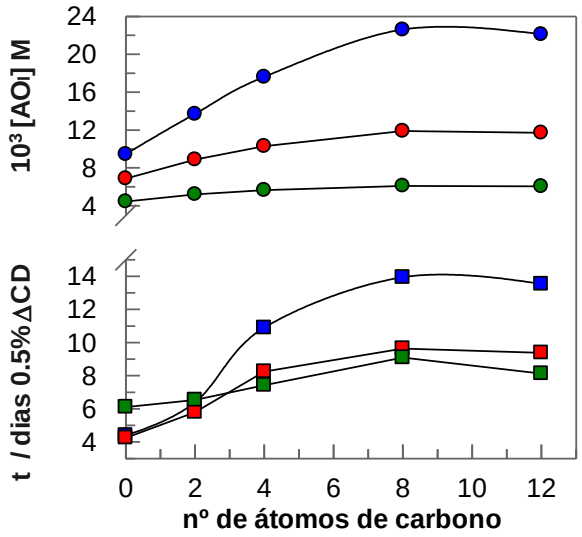


Figura 97 - Variação do tempo em dias para alcançar 0.5% dienos conjugados e concentração efetiva de AO na região interfacial de nanoemulsões 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato) em função do número de átomos de carbono, para as frações de emulsionante de Tween 80 : -●- Φ_I =0,005; -■- Φ_I =0,005; -●- Φ_I =0,01, -■- Φ_I =0,01 e -●- Φ_I =0,02; -■- Φ_I =0,02, [AO_T] = 0,125 mM.

Contrariamente ao esperado inicialmente, o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a alcançar o valor de 0,5 % diminuiu com o aumento da percentagem de emulsionante para os antioxidantes mais lipofílicos BG, OG e LG. Embora ocorra um aumento da quantidade do antioxidante na região interfacial, com o aumento da quantidade de emulsionante ocorre igualmente uma diluição do antioxidante que se encontra na interface. O resultado da atividade antioxidante dependerá assim, do balanço entre o aumento da quantidade do antioxidante na região interfacial e da diluição que ocorre.

De fato, verifica-se que para os compostos em que há um maior aumento da percentagem de antioxidante na interface com o aumento da quantidade de emulsionante, como é o caso do ácido gálico e o galato de etilo, o efeito da diluição na atividade antioxidante é menos sentido do que para os compostos, cuja quantidade na interface não é tao afetada pelo aumento da quantidade de emulsionante. Nos casos, em que a percentagem de AO é já bastante alta para as concentrações mais baixas de emulsionante, o efeito da diluição é mais acentuado (*Figura 97*).

7. Análise comparativa da eficácia antioxidante em emulsões e nanoemulsões

Verificou-se que a ordem de atividade antioxidante quer em emulsões quer em nanoemulsões foi bastante semelhante, e que em ambos os casos correlacionavam positivamente com a concentração do AO na região interfacial (*Figura 94 e 97*). No entanto, uma vez que não se efetuaram os ensaios em emulsões e nanoemulsões ao mesmo tempo, e a estabilidade dos sistemas emulsionados dependem fortemente da composição em ácidos gordos do óleo utilizado e das condições experimentais, efetuou-se um ensaio de estabilidade em que se testaram ao mesmo tempo, e sob as mesmas condições, o ácido gálico e vários galatos em emulsões 1:9 e 4:6 e em nanoemulsões 1:9 de óleo de peixe/tampão citrato, contento 0,5% de emulsionante Tween 80.

Na ausência de AO, observou-se que os três sistemas emulsionados apresentavam estabilidades oxidativas muito diferentes, *Figura 98*.

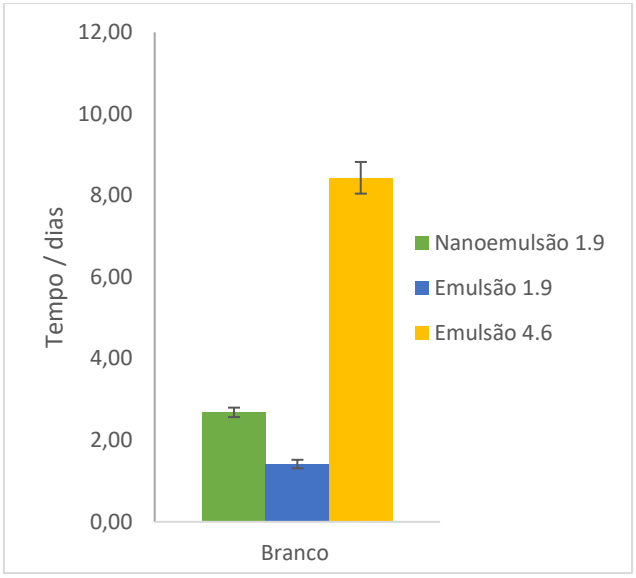


Figura 98 – Tempo em dias para os brancos de vários sistemas emulsionados, atingirem um valor em dienos conjugados de 0.5%, [AO_T] = 0,125mM.

A emulsão 4:6 O/A apresentou-se á partida com a maior estabilidade oxidativa, com cerca de quatro vezes mais estabilidade que os sistemas emulsionados 1:9 O/A. De acordo, com os valores apresentados na *Tabela 7, Capitulo1*, o maior diâmetro de gota e por conseguinte uma menor área de região interfacial poderiam explicar este resultado. No entanto, verificou-se que no caso dos sistemas emulsionados 1:9, as nanoemulsões contendo gotas de muito menor diâmetro, e, portanto, maior superfície de região interfacial apresentaram maior estabilidade oxidativa comparativamente as emulsões com diâmetros de gota de cerca de quatro vezes superior.

Do mesmo modo, quando comparadas as várias nanoemulsões 1:9 O/A preparadas com 0,5%, 1% e 2% de emulsionante, na ausência de AO (Brancos, *Figura 96*), verificou-se que as nanoemulsões contendo 2% de emulsionante, com diâmetro de gota menor e maior superfície de região interfacial, apresentaram também uma maior estabilidade oxidativa.

De acordo, com a *Tabela 7* a emulsão contendo 0,5% de emulsionante poderia não ter a superfície completamente saturada/recoberta com emulsionante. Por outro lado, as emulsões com 1% e 2%, continham emulsionante mais do que o necessário para esta saturação/ recobrimento pelo que esperaríamos um melhor o empacotamento do emulsionante, em especial para a emulsão contendo 2% de emulsionante. Este melhor empacotamento poderá exercer algum impedimento estérico a pró-oxidantes vindos da região aquosa. Por outro lado, os radicais lipídicos quando se formam tendem

a deslocar-se até à região interfacial uma vez que deixam de ter tanta afinidade para a região oleosa e, havendo mais emulsionante, a concentração nesta região destes radicais será menor devido à diluição. Estes resultados confirmam que as reações de autoxidação não dependem da área de superfície, mas apenas da concentração dos reagentes na região interfacial [287-289].

A maior estabilidade das nanoemulsões, relativamente as emulsões com a mesma composição poderá dever-se á maior instabilidade física das emulsões comparativamente as nanoemulsões. De facto, as nanoemulsões apresentaram-se todas visualmente estáveis mesmo ao fim de 6 meses a 4ºC. Já as emulsões com a mesma composição apresentavam a formação de creme, embora sem a separação das fases mesmo ao fim de quatro semanas a 4ºC. A separação de fases só foi observada quando as amostras já se encontravam oxidadas, provavelmente devido á destruição oxidativa dos emulsionantes. Assim, durante o teste de estabilidade os radicais formados da autoxidação tanto do óleo de peixe como dos emulsionantes, existentes na região interfacial de uma gota entrarão mais facilmente em contacto com outras gotas, acelerando o processo oxidativo. Embora os dois sistemas emulsionados tivessem a mesma composição, a mudança do tamanho da gota não só altera as características da região interfacial como também altera a estabilidade física, pelo que não é possível separar a influência do tamanho de gota da estabilidade física do sistema emulsionado e por conseguinte avaliar a contribuição de cada efeito para a estabilidade oxidativa dos sistemas emulsionados.

Uma vez, que os vários sistemas emulsionados tinham a partida estabilidades diferentes, e de modo a poder comparar a eficiência dos antioxidantes nestes sistemas emulsionados utilizou-se o parâmetro de “aumento relativo de estabilidade”, dado por:

$$Aumento\ relativo\ da\ estabilidade = \left(\frac{t_{(\Delta CD=0,5\%)}AO - t_{(\Delta CD=0,5\%)}Branco}{t_{(\Delta CD=0,5\%)}Branco}\right) \quad (60)$$

Em que:

$t_{(\Delta CD=0,5\%)}AO$ = tempo em dias para o AO atingir o valor em dienos conjugados de 0,5%;

$t_{(\Delta CD=0,5\%)}Branco$ = tempo em dias para o Branco atingir o valor em dienos conjugados de 0,5%.

Para todos os sistemas emulsionados, encontrou-se a mesma ordem de atividade antioxidante para os vários galatos (*Figura 99*).

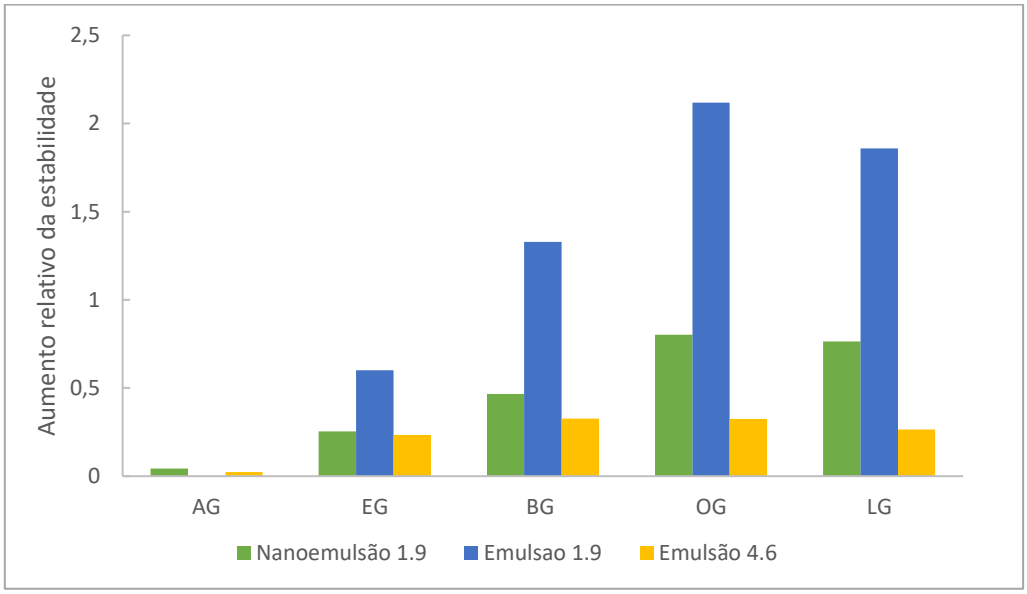


Figura 99 – Aumento relativo da estabilidade para o ácido gálico e seus derivados nos diferentes sistemas emulsionados, emulsão 1:9 e 4:6 e nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65 / Tween 80), [AO_T] = 0,125 mM.

De referir que, no entanto, a capacidade antioxidante destes compostos foi mais importante para o sistema que á partida era mais instável em termos oxidativos, ou seja, as emulsões 1:9 foram aquelas que beneficiaram mais em termos de estabilidade oxidativa com a presença dos galatos, tendo a estabilidade destas amostras aumentando cerca de 2/3 a 2 vezes dependendo do galato utilizado.

Como seria de esperar as diferença entre a atividade antioxidante dos galatos, no caso das emulsões 4:6 O/A foram mais pequenas, tendo havido uma diminuição da atividade antioxidante do OG e do LG relativamente á atividade do BG. Para estes compostos mais lipofílicos, havendo um aumento da fração de óleo no sistema emulsionado, ocorre a deslocação dos compostos mais lipofílicos da região interfacial para a região oleosa, de acordo com os P_O^I apresentados, havendo assim uma diminuição da concentração de AO na interface.

Mais uma vez, verificou-se a existência de uma correlação positiva entre a concentração de AO na região interfacial e a estabilidade para qualquer dos três sistemas emulsionados estudados (*Figura 100*), correlação que é independente do tamanho de gota.

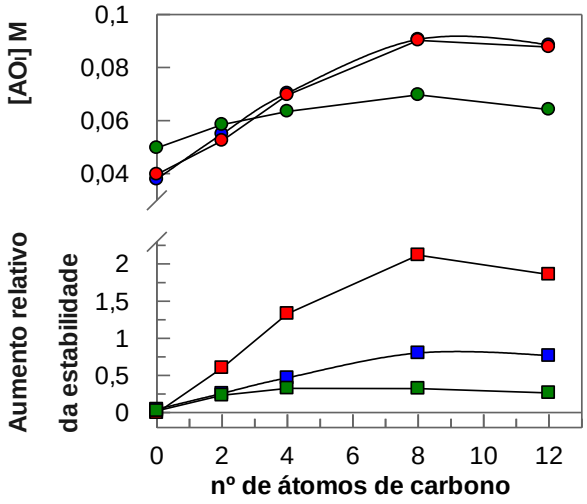


Figura 100 – Variação da percentagem de inibição e da concentração efetiva na região interfacial dos diferentes sistemas emulsionados (emulsão 4:6 e 1:9 e nanoemulsão 1:9 de óleo de peixe/tampão citrato) em função do aumento da cadeia alquílica, para a fração de emulsionante de Φ_I =0,005: -●-; -■- nanoemulsão 1:9 ; -●-, -■- emulsão 1:9 e -●- -■- emulsão 4:6 de óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M / pH=3.65, [AO_T] = 0,125 mM.

Capítulo 3 – Hidroxitirosol e derivados



O hidroxitirosol (HT) é um composto fenólico presente no azeite, que se destaca pelas suas propriedades antioxidantes e efeitos benéficos para a saúde [58, 171-174]. Devido ao seu carácter fortemente hidrofílico o HT apresenta uma baixa capacidade antioxidante em sistemas emulsionados devido à sua alta solubilidade na região aquosa. Deste modo, pretende-se sintetizar derivados hidrofóbicos, de modo a aumentar a utilidade deste composto como antioxidante. Assim, procedeu-se à síntese de ésteres do HT por esterificação deste com ácidos gordos. À exceção do acetato de hidroxitirosilo, nenhum destes derivados é ainda permitido como aditivo embora estes ésteres sejam obtidos a partir do HT e ácidos gordos, moléculas encontradas naturalmente na alimentação. Assim, prevê-se para estes ésteres uma toxicidade inferior aquela que é encontrada para os galatos, atualmente já utilizados na indústria alimentar. Deste modo, são bons candidatos para futuramente poderem ser utilizados como aditivos alimentares, pelo que é importante obter informação sobre a sua eficácia antioxidante em sistemas emulsionados. Por outro lado, neste estudo, a utilização destes ésteres permitiu igualmente verificar se as conclusões obtidas para a família dos galatos se mantém.

1. Síntese dos derivados do Hidroxitirosol

Sintetizaram-se os ésteres de hidroxitirosol de cadeia alquílica curta (C1-C8) a partir da esterificação do HT com ácidos gordos de cadeia linear de diferentes tamanhos (C2-C8). Os ésteres do HT de cadeia alquílica longa (C12-C16) foram sintetizados a partir por transesterificação dos ésteres metílicos dos ácidos gordos (C12-C16) obtidos comercialmente com HT, *Figura 101*.

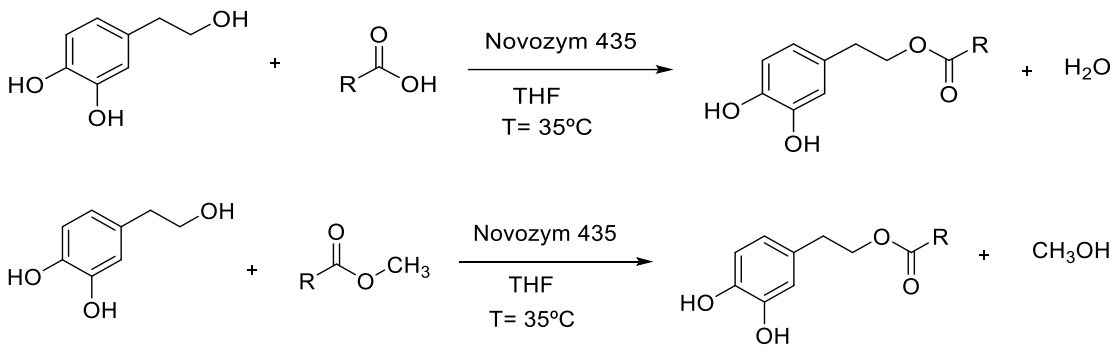


Figura 101 - Síntese de derivados do Hidroxitirosol.

Os rendimentos obtidos pelas sínteses encontram-se na *Tabela 20*.

Tabela 20 : Resultados experimentais das massas e rendimentos obtidos nas sínteses dos derivados do hidroxitirosol.

Antioxidante	R	Tempo / dias	m_{obtida}/g	Rendimento (%)
HT1	H	2	0,570	30
HT3	CH_2CH_3	3	0,872	64
HT4	$CH_2CH_2CH_3$	2	0,537	74
HT6	$CH_2CH_2(CH_2)_2CH_3$	3	1,356	75
HT8	$CH_2CH_2(CH_2)_4CH_3$	2	1,549	85
HT10	$CH_2CH_2(CH_2)_6CH_3$	3	1,131	54
HT12	$CH_2CH_2(CH_2)_8CH_3$	3	0,921	41
HT14	$CH_2CH_2(CH_2)_{10}CH_3$	4	0,656	53
HT16	$CH_2CH_2(CH_2)_{12}CH_3$	4	0,591	45

Sintetizaram-se e purificaram-se os ésteres de HT de cadeia curta com sucesso, com rendimentos após a purificação dos 65-85% exceto para o HT1 que teve um rendimento de cerca de metade. Esta situação deveu-se ao facto deste composto ser mais hidrofílico, acabando por ficar também na fase aquosa durante as extrações líquido-líquido efetuadas para a sua purificação.

Relativamente aos rendimentos obtidos para os derivados de cadeia longa, estes foram um pouco mais baixos, situando-se entre os 40 e 54%. Verificou-se que a purificação por extração líquido-líquido era dificultada pelo facto de os sais destes compostos apresentarem propriedades tensioativas consideráveis. Assim, aquando da extração dos derivados da mistura reacional com solução aquosa saturada de bicarbonato de sódio, formavam-se emulsões de difícil separação bem como espuma abundante, o que justifica os rendimentos mais baixos obtidos para estes compostos.

De modo, a ser possível correlacionar a distribuição do hidroxitirosol e dos seus derivados com a atividade antioxidante, realizaram-se experiências para avaliar se a capacidade antirradicalar destes não era alterada pela introdução de cadeias alquílicas na molécula (*Figura 102*).

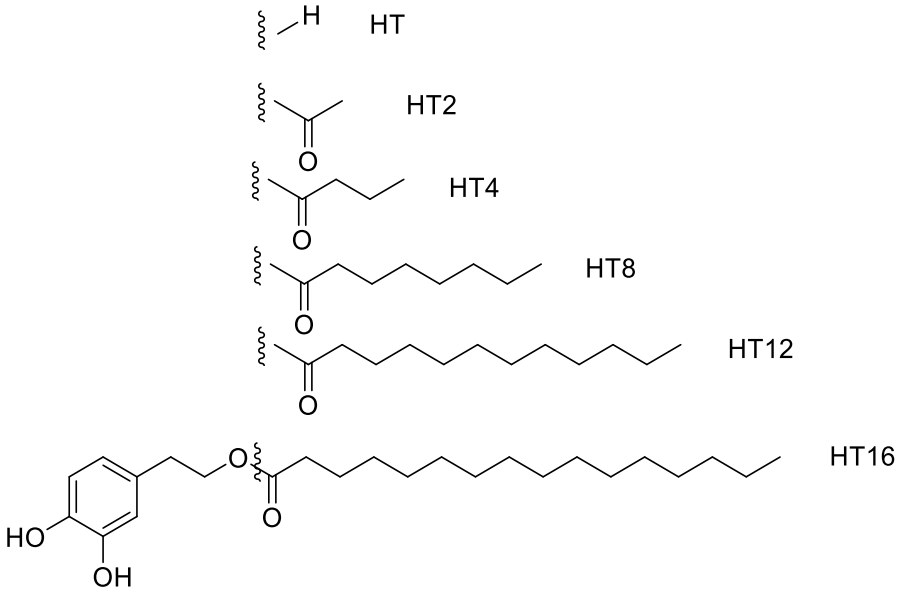


Figura 102 - Estrutura química do hidroxitirosol e derivados.

2. Reatividade do hidroxitirosol e seus derivados

2.1. Reatividade do hidroxitirosol e seus derivados frente ao radical DPPH•

Na *Figura 103 (A)* está representado um exemplo típico da variação de absorvância obtida para o desaparecimento do radical DPPH• em função do tempo, na presença de diferentes concentrações do HT3. A atividade antirradicalar define-se a partir do parâmetro EC_{50}, que representa a concentração mínima necessária para o antioxidante captar 50% dos radicais de DPPH• inicias. Para determinar este parâmetro representou-se graficamente para um determinado tempo, a variação da percentagem de DPPH• em função da relação mol AO/mol DPPH•, representado na *Figura 103 (B).*

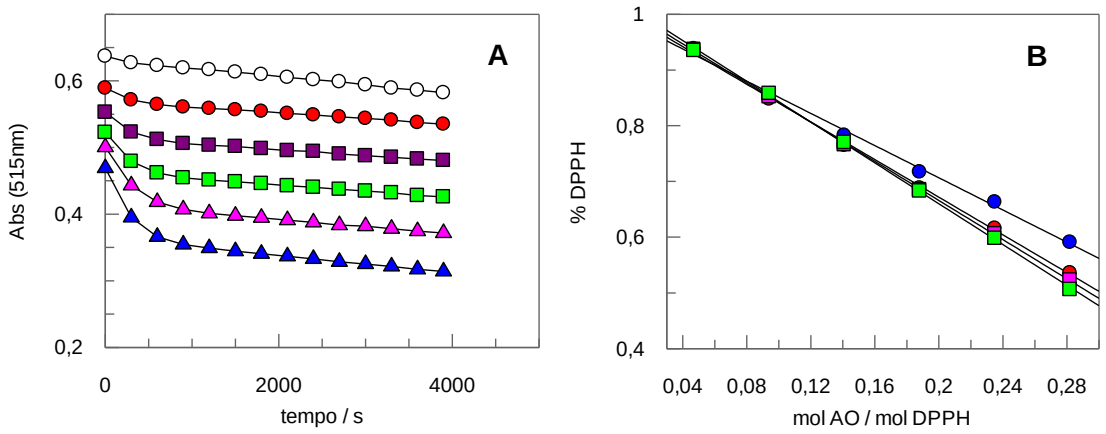


Figura 103 - (A) Variação da absorvância do radical DPPH$^{\bullet}$ (λ = 515 nm) na presença de diferentes concentrações do propilo de hidroxitirosol -○- 0,0470 mol de AO / mol DPPH$^{\bullet}$, -●- 0,0940 mol de AO / mol DPPH$^{\bullet}$, -■-0,1410 mol de AO / mol DPPH$^{\bullet}$, -■- 0,1880 mol de AO / mol DPPH$^{\bullet}$, -▲-0,2350 mol de AO / mol DPPH$^{\bullet}$, -▲- 0,2820 mol de AO / mol DPPH$^{\bullet}$, T=25ºC. (B) Representação da variação da percentagem de DPPH$^{\bullet}$ com a concentração do propilo de hidroxitirosol, expressa em mol AO/mol DPPH$^{\bullet}$, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear. (-●- 5 min, -●- 15 min, -■- 30 min, -■- 60 min).

Os valores de EC_{50} obtidos para o hidroxitirosol e seus derivados encontram-se descritos na *Tabela 21*. Uma vez que os valores de EC_{50} representam a relação mol AO / mol DPPH necessária para reduzir em metade a concentração inicial de DPPH$^{\bullet}$, os antioxidantes que apresentem um valor de EC_{50} menor vão ser os que terão uma maior atividade antirradicalar.

Tabela 21 – Valores de EC_{50} obtidos para diferentes tempos de reação com um nível de significância de P < 0,05, para o HT e seus derivados.

Antioxidante	**EC_{50}**			
t/min	**5**	**15**	**30**	**60**
HT	0,323 ± 0,005	0,287 ±0,004	0,279 ± 0,004	0,258 ± 0,004
HT1	0,338 ± 0,005	0,296 ± 0,003	0,288 ± 0,003	0,277 ± 0,003
HT2	0,354 ± 0,009	0,309 ± 0,007	0,298 ± 0,005	0,281 ± 0,004
HT3	0,345 ± 0,004	0,299 ± 0,002	0,289 ± 0,005	0,280 ±0,003
HT4	0,348 ± 0,004	0,283 ± 0,003	0,272 ± 0,004	0,259 ± 0,005
HT6	0,300 ± 0,003	0,272 ± 0,003	0,263 ± 0,004	0,247 ± 0,003
HT8	0,295 ± 0,005	0,265 ± 0,005	0,256 ± 0,007	0,239 ± 0,003
HT10	0,326 ± 0,005	0,292 ± 0,005	0,286 ± 0,007	0,280 ± 0,004
HT12	0,345 ± 0,005	0,319 ± 0,004	0,309 ± 0,011	0,294 ± 0,006
HT14	0,347 ± 0,006	0,310 ± 0,009	0,300 ± 0,007	0,284 ± 0,011
HT16	0,331 ± 0,011	0,305 ± 0,006	0,302 ± 0,011	0,298 ± 0,007

EC_{50} expresso em mol de antioxidante/ mol de DPPH•
Com um nível de significância *P* <0,05

A partir dos resultados obtidos em solução metanólica e ao fim de 5 minutos de reação não foram observadas diferenças significativas na atividade antirradicalar do hidroxitirosol e seus derivados face ao radical DPPH$^{\bullet}$, pelo que se concluiu que a introdução da cadeia alquílica não altera significativamente a reatividade destas moléculas.

Verificou-se que as curvas Abs vs tempo são caraterizada por um rápido desaparecimento inicial da absorção do radical de DPPH$^{\bullet}$, seguida posteriormente de um lento desaparecimento deste radical. Este rápido abaixamento inicial é geralmente devido a reações de transferência do hidrogénio do antioxidante para o radical, consideradas como as mais importantes para a eficácia antioxidante das moléculas. A diminuição da velocidade de desaparecimento do radical decorre de reações secundárias mais lentas dos produtos de dimerização do radical fenóxilo.

2.2. Determinação do primeiro potencial anódico - Voltametria Cíclica

Determinou-se por voltametria cíclica o primeiro potencial anódico do hidroxitirosol e seus derivados, *Tabela 22*.

Tabela 22 - Valores do primeiro potencial anódico, determinados por voltametria cíclica, para o hidroxitirosol e seus derivados.

Antioxidante	**pH = 7,3**	**pH = 3,6**	**pH = 3,6 + Tween 80**
	***Epa** (V)	***Epa** (V)	***Epa** (V)
HT	0,217	0,418	------
HT1	0,228	0,421	------
HT2	0,221	0,416	------
HT3	0,217	0,412	------
HT4	0,222	0,393	0,415
HT6	0,245	0,404	0,388
HT8	0,233	0,412	0,419
HT10	0,231	0,392	0,397
HT12	0,205	0,402	0,382
HT14	0,229	0,369	0,382
HT16	0,213	0,403	0,394

Epa, potencial anódico *vs* Ag/AgCl.

A partir dos resultados obtidos verificou-se que todos os compostos apresentaram um valor do primeiro potencial anódico muito semelhante, e que a presença de Tween 80 não alterou este valor.

Deste modo, a possível diferença na eficácia antioxidante dos compostos em sistemas emulsionados, não é devida a sua diferente reatividade, mas sim causada pela diferente localização no sistema emulsionado.

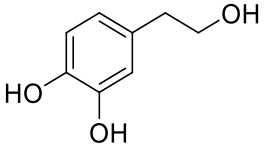
3. Distribuição do hidroxitirosol e seus derivados em sistemas binários

3.1. Constantes de partição P_A^O , em sistemas binários óleo/água

Determinou-se a constante de partição, P_A^O, do hidroxitirosol e dos seus derivados para uma mistura binária constituída por 4 mL de óleo de peixe purificado e 6 mL de solução tampão citrato 0,04 M e pH = 3,65, contendo uma concentração de $3{,}0 \times 10^{-3}$ M do antioxidante, de acordo com o procedimento descrito na secção material e métodos.

Na *Tabela 23*, encontram-se os resultados obtidos para a distribuição dos diferentes antioxidantes nas misturas binárias.

Tabela 23 - Valores das constantes de partição de uma mistura binária óleo de peixe/água, T=25ºC, para o hidroxitirosol e seus derivados.

Antioxidante				P_A^O
Estrutura		% $(AO)_O$	% $(AO)_A$	
	HT	0,55	99,45	0,0083 ± 0,03
	HT2	16,7	83,3	1,80 ± 0,01
	HT3	65,3	34,7	2,80 ± 0,18
	HT4	79,5	20,5	5,81 ± 0,70
	HT6	≃ 100	≃ 0	>>> 5,81
	HT8	≃ 100	≃ 0	>>> 5,81
	H12	≃ 100	≃ 0	>>> 5,81
	HT16	≃ 100	≃ 0	>>> 5,81

Observou-se que o HT se encontra quase na totalidade na fase aquosa (~99%), diminuindo esta quantidade à medida que aumenta a cadeia lateral. A partir do hexanoato de HT, inclusive, não foi possível detetar os compostos na fase aquosa pelo que se considerou que estes se encontram na sua totalidade na fase oleosa.

4. Distribuição do hidroxitirosol e seus derivados em emulsões

4.1. Constantes de partição do hidroxitirosol e seus derivados em emulsões óleo de peixe/tampão citrato (O/A)

Como se verificou anteriormente a partir das constantes de partição binárias, (*Tabela 23*), o HT apresenta uma elevada solubilidade na fase aquosa (~99%), o derivado HT2, apresenta solubilidade nas duas regiões oleosa e aquosa, a partir do derivado HT6 todos os derivados apresentam solubilidade apenas na região oleosa.

Determinou-se as constantes de partição P_O^I e P_A^I a partir da análise do modelo cinético da pseudofase simplificado (água/interface) para o HT, a partir do modelo completo para o HT2 (água/interface/óleo) e a partir do modelo simplificado (óleo/interface) para os derivados mais lipofílicos como o HT6, HT8, HT12 e HT16, *Figura 104*.

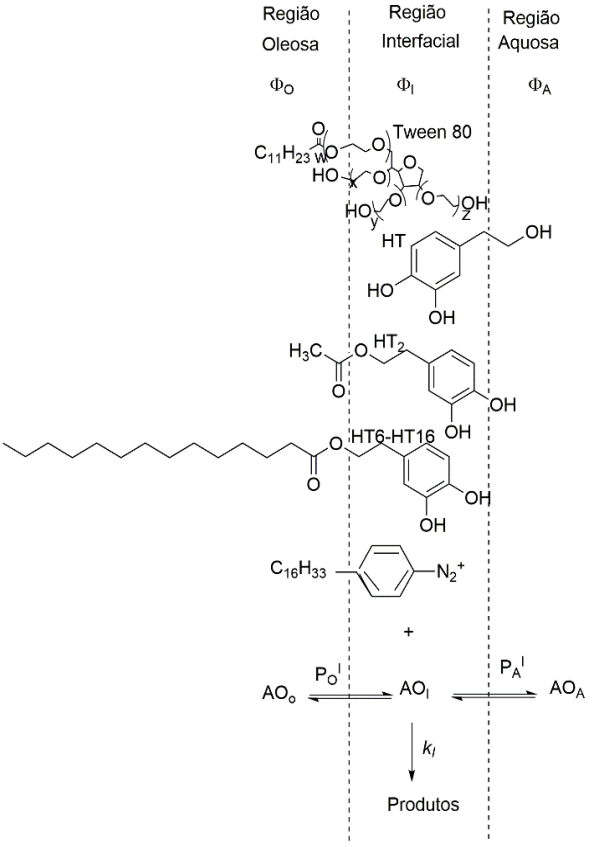


Figura 104 – Distribuição do HT e derivados num sistema emulsionado.

Nas *Figuras 105-107*, encontra-se a k_{obs} para todos os compostos, que diminuí num fator de 3-10 vezes ao aumentar a fração de emulsionante de Φ_I= 0,005 a Φ_I= 0,04.

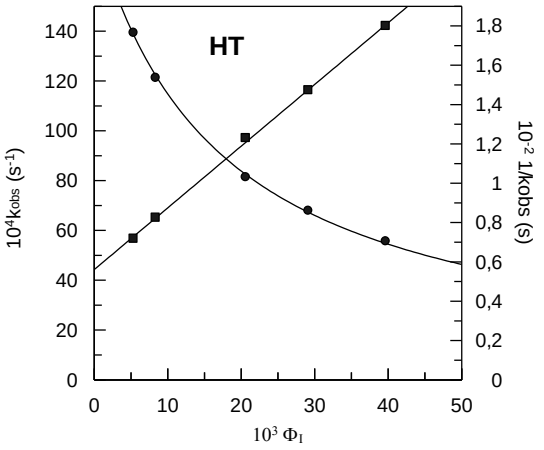


Figura 105 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 48* e *49* para o HT. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90× $10^{-4}M$, [AO] =2,00× $10^{-3}M$, [NED] =0,019 M e *T*= 25ºC.

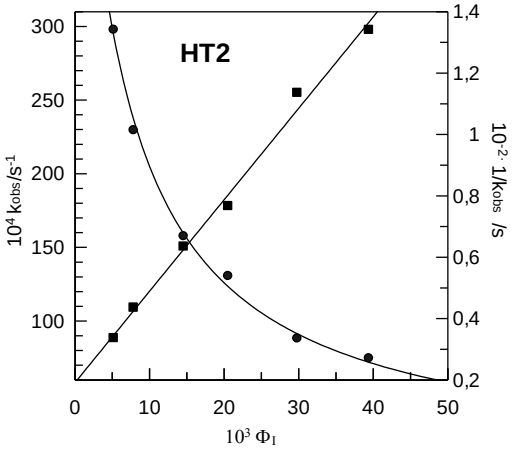


Figura 106 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 31* e *32* para o HT2. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90× 10^{-4}M, [AO] =2,0× 10^{-3}M , [NED] =0,019 M e T= 25ºC.

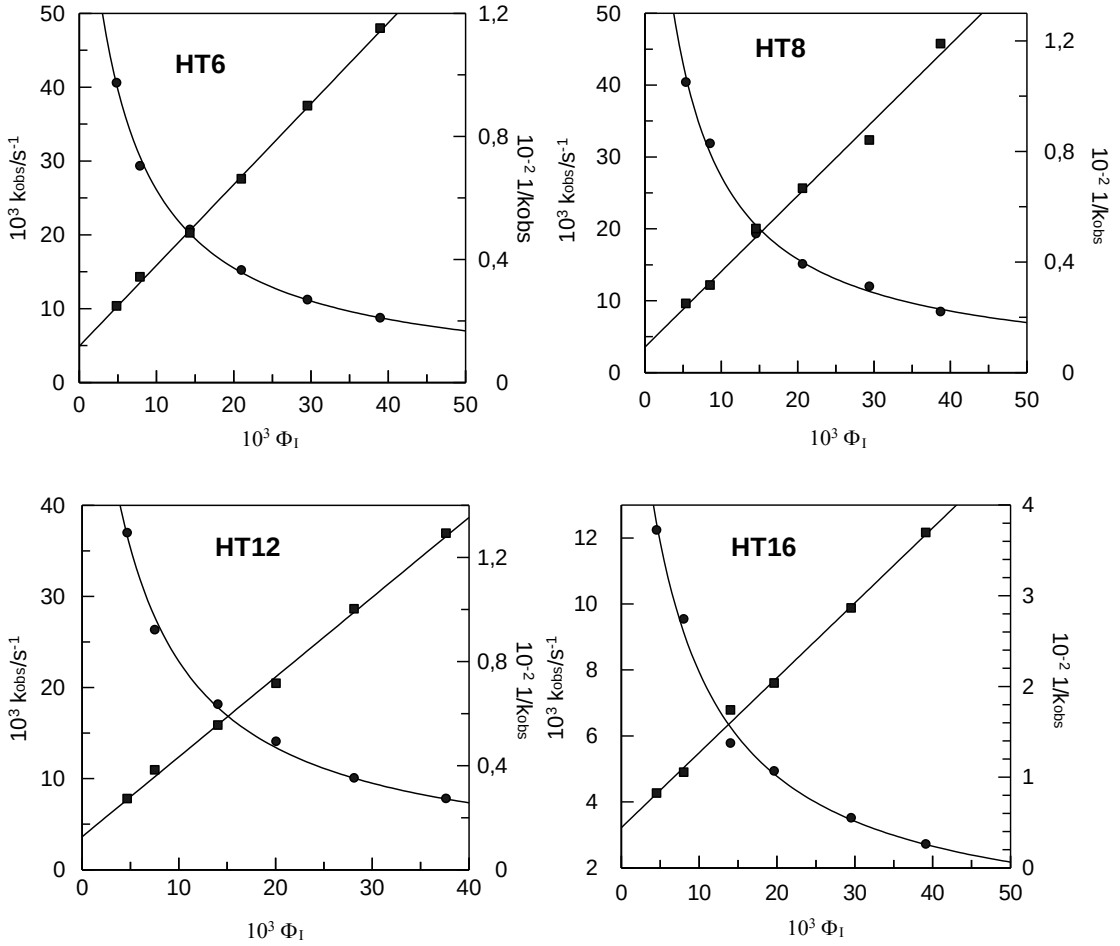


Figura 107 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 42*, para os derivados HT6, HT8, HT12 e HT16. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] = 2,90x10^{-4} M, [AO] = 2,00x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25,0ºC.

Os valores das constantes de partição, P_O^I e P_A^I, e da velocidade de reação na região interfacial, k_I, encontram-se na *Tabela 24*.

Tabela 24 - Valores de $\boldsymbol{P_O^I}$ P_O^I, P_A^I e $\boldsymbol{k_I}$ obtidos para o HT e derivados.

	HT	**HT2**	**HT6**	**HT8**	**HT12**	**HT16**
$\boldsymbol{P_A^I}$	34 ± 1	207± 39	---	---	---	---
$\boldsymbol{P_O^I}$	---	115 ± 22	89 ± 8	119 ± 45	97 ± 14	75 ± 12
10^2 k_I ($M^{-1}s^{-1}$)	10,6 ± 0,2	16,7 ± 5,7	19,0 ± 0,3	18,7 ± 8,8	16,3 ± 0,4	16,0 ± 0,2

Na *Figura 108*, podemos observar a distribuição dos vários compostos em emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65/Tween 80).

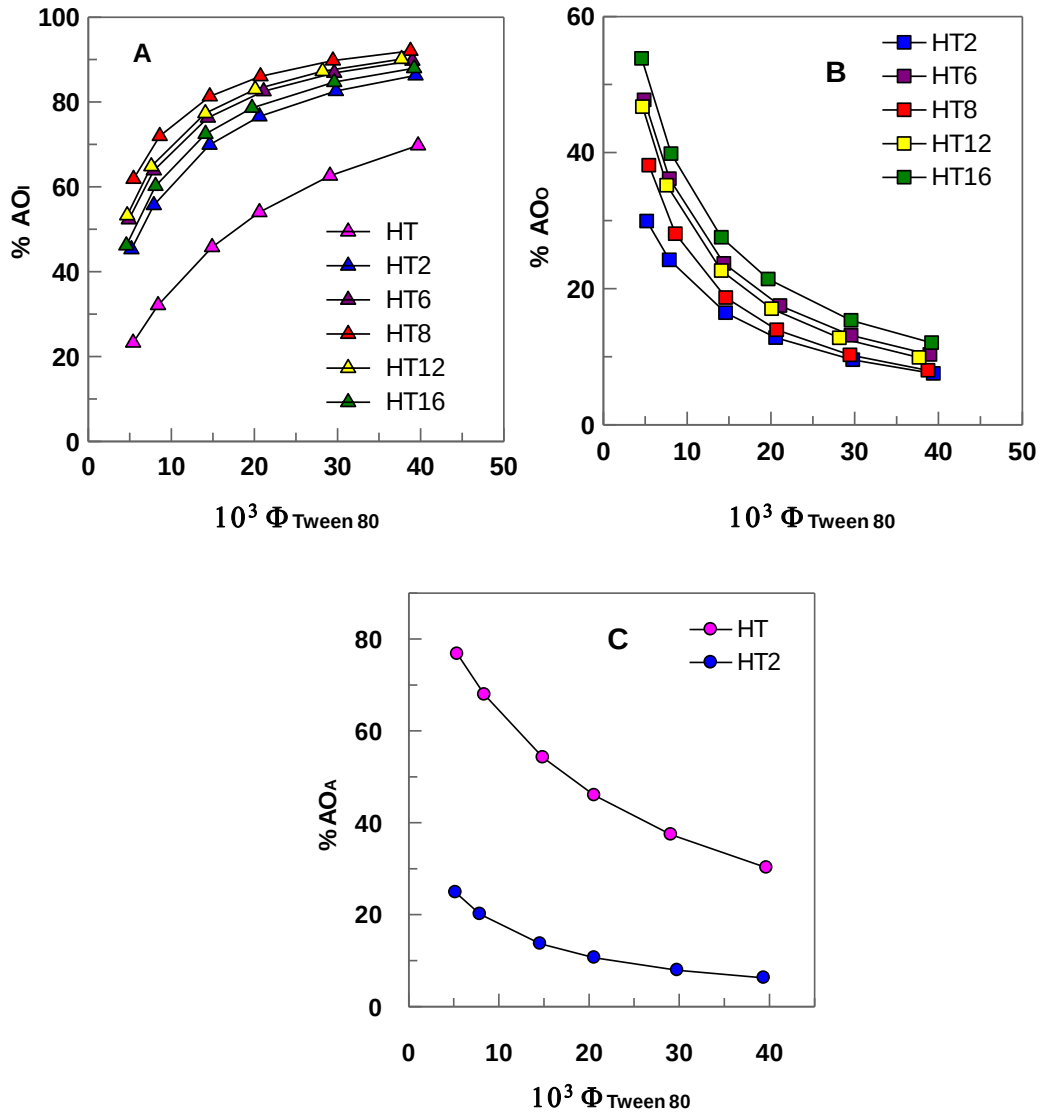


Figura 108 - Variação da percentagem do HT e seus derivados em emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), região interfacial (A), região oleosa (B) e região aquosa (C).

Pela análise dos resultados da *Tabela 24*, percebe-se como varia a percentagem do HT e dos seus derivados em cada uma das regiões (oleosa, aquosa e interfacial) numa emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 / Tween 80).

Verificou-se que para a fração de emulsionante $\Phi_I = 0,005$ apenas cerca de 20% do HT se encontra na região interfacial. À medida que Φ_I aumenta, esta percentagem vai aumentando, sendo que, quando $\Phi_I=0,04$, cerca de 80% do antioxidante encontra-se nesta região. Para derivado HT2, verificou-se que a percentagem o AO que se encontra na região interfacial para o menor valor de Φ_I é aproximadamente 40%,

aumentando para perto dos 85% à medida que se vai aumentando a fração de emulsionante, até se atingir Φ_I = 0,042. Em contrapartida este encontra-se em cerca de 20% na região aquosa diminuindo para cerca de 5% para a fração de emulsionante Φ_I=0,04. Com o aumento de mais de 4 carbonos, os antioxidantes passam a estar apenas localizados nas regiões oleosa e interfacial, verificando-se que mais de 50% do HT6, HT8, HT12 e o HT16 encontra-se distribuídos na região interfacial, e à medida que Φ_I aumenta a percentagem de antioxidante na interface também aumenta, de modo que quando Φ_I=0,040 cerca de 90% todos estes antioxidantes encontram-se na região interfacial. Verificando-se assim, que a fração de emulsionante exerce uma influência significativa sobre a fração de antioxidante que se encontra em cada região. Quanto maior for Φ_I, maior é a percentagem de antioxidante na região interfacial.

Para uma mesma fração de emulsionante, Φ_I, o HT é o composto com menor percentagem na região interfacial, aumentando até ao derivado HT8, e diminui depois para o HT12 e HT16 (*Figura 108*).

A percentagem de AO na região interfacial não se correlaciona diretamente com a sua hidrofobicidade. Assim, as percentagens de AO na região interfacial seguem a seguinte ordem: HT< HT2<HT16<HT6<HT12<HT8. Deste modo podemos verificar que a quantidade de antioxidante para uma mesma fração de emulsionante aumenta na região interfacial com o aumento da cadeia alquílica o derivado, até um máximo de 8 carbonos diminuindo a partir deste (*Figura 109*).

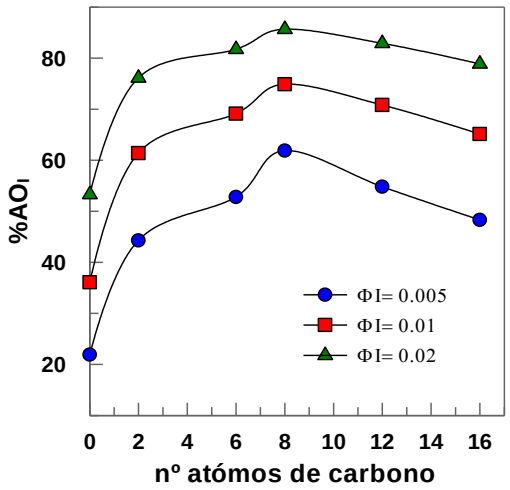
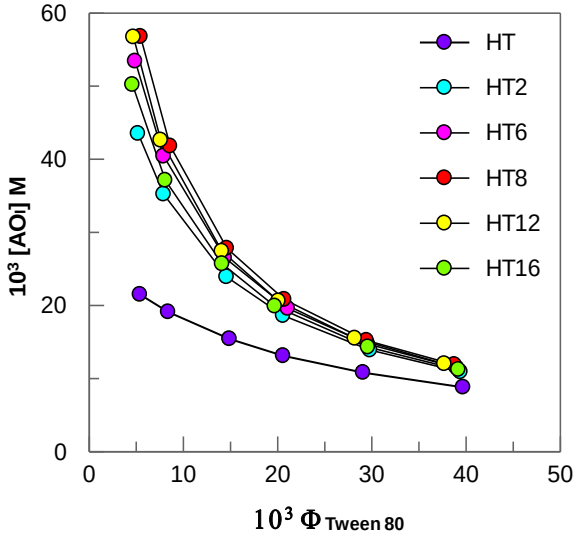


Figura 109 – Variação da percentagem de AO na região interfacial em função do número de átomos de carbono da cadeia alquílica, para três frações de emulsionante, Φ_I, numa emulsão 4:6 (óleo de peixe tampão citrato 0,04M, pH=3,65 / Tween 80).

4.2. Concentrações efetivas dos antioxidantes nas regiões oleosa, aquosa e interfacial das emulsões

Como verificamos pela análise da distribuição dos AOs (*Figura 108*) a concentração de AO na região interfacial aumenta à medida que Φ_I aumenta até que praticamente todo o AO é dissolvido nessa região e, por consequência, a percentagem deste diminui nas regiões oleosa e aquosas. Contudo, os volumes das regiões aquosa, oleosa e interfacial das emulsões podem variar pelo que a concentração de AO vai depender do volume de emulsionante e da relação óleo/água do sistema emulsionado. Portanto, a concentração efetiva do AO em cada região é modificada pela alteração de qualquer uma das regiões. Deste modo, calcularam-se as concentrações dos vários AOs em emulsões 4:6 (óleo de peixe tampão citrato, 0,04M, pH=3,65 / Tween 80), a partir dos dados de distribuição, aplicando as *equações 57, 58 e 59*. Na *Figura 110*, encontram-se as variações das concentrações efetivas dos vários derivados AOs em cada região da emulsão 4:6 O/A.



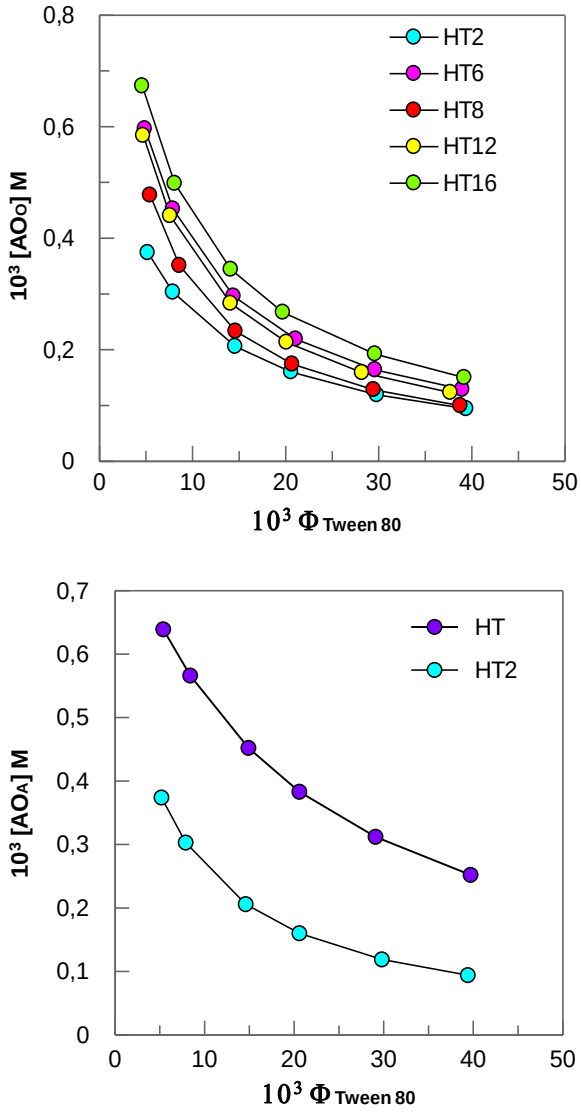


Figura 110 – Concentrações efetivas na região oleosa, aquosa e interfacial das emulsões 4:6 óleo de peixe/tampão citrato (0,04M, pH= 3,35)/ Tween 80, em função da fração de emulsionante, [AO_T] = 0,5 mM.

Para qualquer valor de fração de emulsionante, observa-se que a concentração efetiva de AO na região interfacial é muito superior, num fator de 20-115 vezes, que a estequiométrica [AO_T]= $5{,}0\times10^{-4}$ M. Verifica-se igualmente que a concentração efetiva quer na água quer no óleo podem ser superiores ou inferiores do que a concentração estequiométrica dependendo do AO e da fração de emulsionante. Por exemplo a concentração efetiva do HT na água é 1,2 vezes superior à concentração estequiométrica para a fração de emulsionante mais baixa (Φ_I=0,005) e 2,4 vezes inferior para as frações de emulsionante mais alta (Φ_I=0,040). No caso do derivado HT2, a concentração efetiva na região aquosa é superior que a estequiométrica e aumenta com o aumento da fração de emulsionante cerca de 1,2-7,5 vezes.

Para os compostos mais lipofílicos (HT6,HT8 e HT16), verificou-se que a concentração na região oleosa é superior à estequiométrica cerca de 1,2 vezes para a fração de emulsionante mais baixa Φ_I=0,005. Para as frações de emulsionante superiores a Φ_I=0,005, a concentração efetiva na região oleosa destes derivados lipofílicos é inferior á estequiométrica num fator de 1,1 a 4 vezes.

Portanto, para qualquer [AO_T] dada, a concentração efetiva dos AO nas diferentes regiões de emulsão depende da %AO na referida região e da fração de emulsionante utilizada para uma mesma relação O/A.

Na região interfacial temos de ter em conta que um aumento da fração de emulsionante significa um aumento da % AO na região interfacial, mas por outro lado devido ao aumento do volume desta região ocorrerá uma diluição do AO nesta região. Nas regiões oleosa e aquosa a %AO diminui sempre com o aumento da fração de emulsionante. Assim, na maior parte dos casos, haverá sempre uma diluição efetiva dos AO nas três regiões da emulsão com o aumento da fração de emulsionante.

Analisou-se igualmente o efeito que a fração de emulsionante e a relação O/A apresentam sobre as concentrações dos AOs na região interfacial (*Figura 111*).

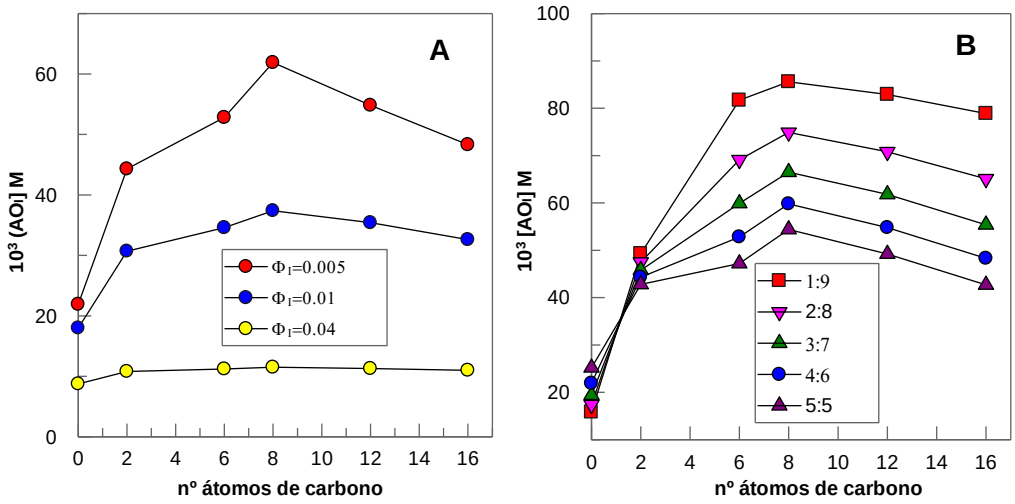


Figura 111 - (A)- Efeito da hidrofobicidade do AO na concentração do AO na região interfacial para o HT e seus derivados, numa emulsão 4:6 O/A (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65/ Tween 80) com três frações de emulsionante diferentes. (B) Efeito da relação O/A na concentração do HT e derivados na região interfacial, para a fração de emulsionante Φ_I =0,005, [AO_T] = 0,5 mM.

Na *Figura 111 (A)* mostra-se o efeito na concentração interfacial do AO em emulsões com uma relação constante O/A mas com diferentes concentrações de emulsionante em função do número de átomos de carbono da cadeia alquílica dos AOs. Verificou-se que para frações de emulsionante altas (Φ_I =0,04), a concentração de AO

na região interfacial é muito similar (~1,00 × 10^{-4} M). No entanto, para frações de emulsionante mais baixas (Φ_I=0,005), podemos verificar que a concentração na região interfacial aumenta até ao HT8 ((~6,00 × 10^{-4} M) diminuindo depois para o HT12 e HT16.

Na *Figura 111 (B)*, é possível verificar o efeito que a relação O/A tem sobre a concentração dos AO na região interfacial. Para um valor constante de fração de emulsionante (Φ_I =0,005), verificamos que para compostos mais lipofílicos a concentração de AO na região interfacial aumenta com a diminuição do volume da região oleosa utilizado na emulsão (~5,00 × 10^{-2} M a 8,6 × 10^{-2} M), ou seja cerca de 100 - 165 vezes superior que a concentração estequiométrica. Por outro lado, ao aumentarmos a relação O/A, a concentração de AO na região interfacial aumenta para os composto hidrofílicos e diminui para os compostos mais lipofílicos.

Por exemplo, para uma concentração estequiométrica [AO_T] = 0,5 mM, a [HT_I] aumenta de ~ 15,8 mM (O/A= 1:9) para [HT_I] ~ 22,5 mM (O/A = 5: 5), mas a concentração efetiva para o HT16 [$HT16_I$] diminuiu de ~ 78,0 mM (O/A = 1: 9) para ~ 42,0 mM (O/A = 5:5).

Estes resultados demonstram que alterando a relação O/A, pode modular significativamente as concentrações dos AO na região interfacial, inclusive modificar a ordem relativa da percentagem de AO na região interfacial: um aumento da relação O/A favorece a incorporação dos antioxidantes hidrofílicos na região interfacial, mas por outro lado diminui a incorporação dos AO hidrofóbicos.

5. Distribuição do hidroxitirosol e seus derivados em nanoemulsões

5.1. Constantes de partição do hidroxitirosol (HT) e seus derivados em nanoemulsões

As constantes de partição do hidroxitirosol (HT) e derivados foram obtidas como descrito anteriormente pelo modelo cinético da pesudofase. Através do método de derivatização entre a sonda química 16-ArN_2^+ e os vários antioxidantes. Em todos os pares de dados absorvância-tempo obtidos ajustaram-se perfeitamente à equação integrada de ordem 1, sendo assim possível obter a constante de velocidade observada, k_{obs}.

Nas *Figuras 112-114*, mostram-se os vários gráficos da k_{obs} em função da fração de emulsionante, para os vários antioxidantes, bem como a 1/ k_{obs} a partir dos ajustes dos dados (k_{obs} vs Φ_I) às várias equações do modelo cinético da pseudofase, descrito na *secção I*. Em todos os casos verificou-se uma diminuição de k_{obs} entre 2,4 - 8 vezes à medida que o valor de Φ_I presente na emulsão aumenta de 0,005 para 0,04.

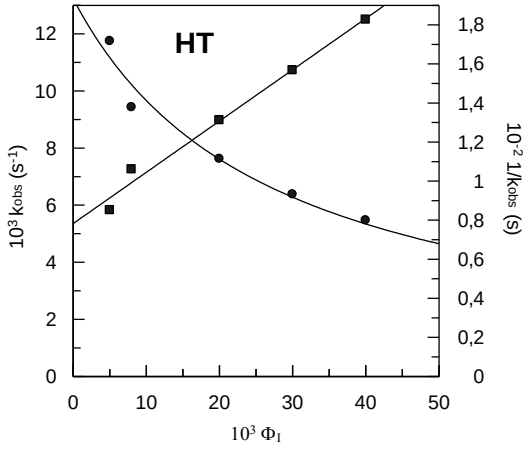


Figura 112 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 48 e 49* para o HT. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90× $10^{-4}M$, [AO] = 2,0× $10^{-3}M$, [NED] =0,019 M e *T*= 25ºC.

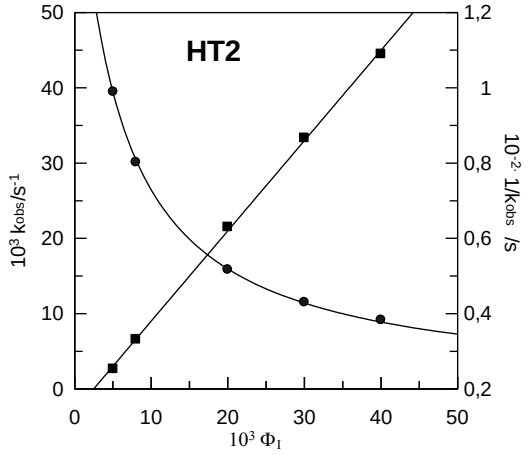


Figura 113 – Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 31* e *32* para o HT2. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65)/Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90× $10^{-4}M$, [AO] = 2,0× $10^{-3}M$, [NED] =0,019 M e *T*= 25ºC.

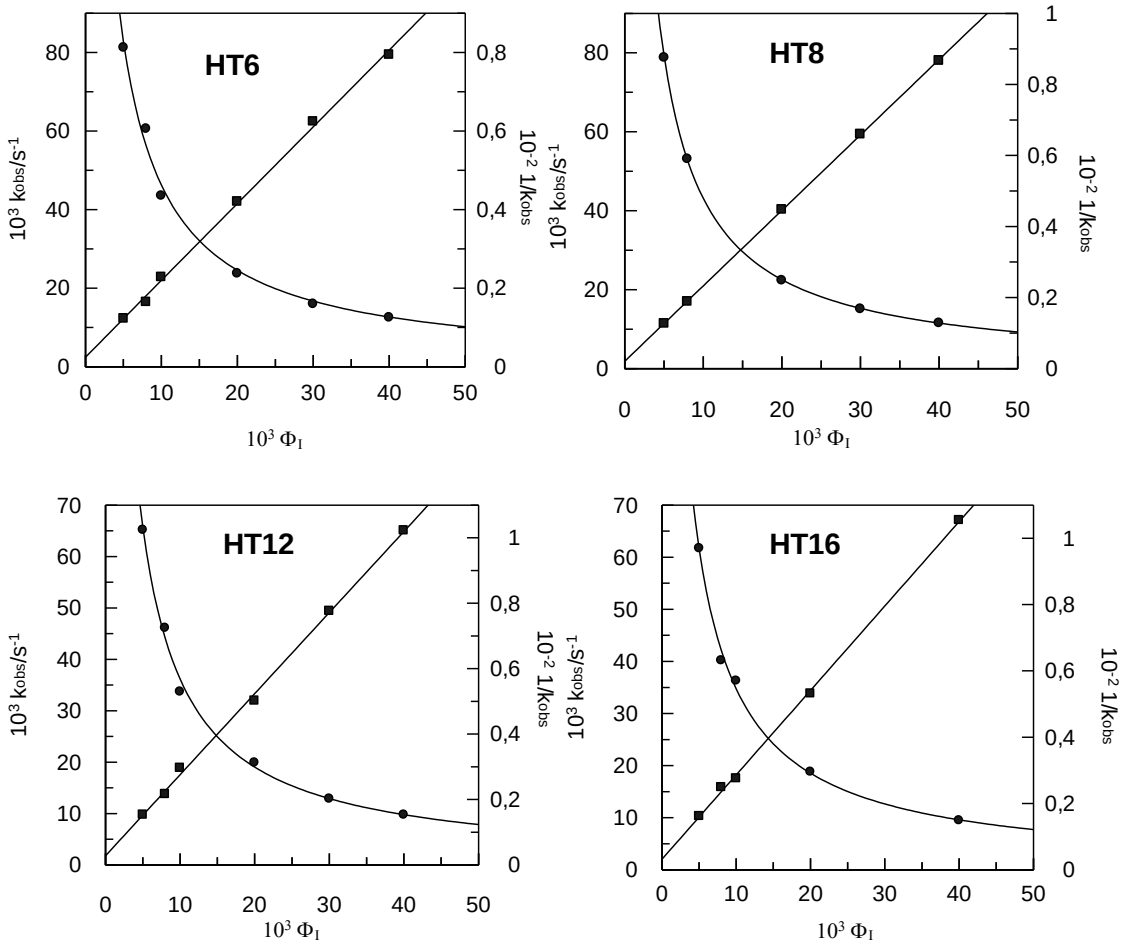


Figura 114 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes à *equação 42*, para o HT6,HT8,HT12 e HT16. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90× $10^{-4}M$, [AO] = 2,0× $10^{-3}M$, [NED] =0,019 M e *T*= 25ºC.

Na *Tabela 25* encontram-se os valores das contantes de partição, P_A^I, P_O^I e os valores de k_I.

Tabela 25 - Sumário dos valores das constantes de partição de P_A^I, P_O^I e k_I obtidas para o hidroxitirosol e seus ésteres.

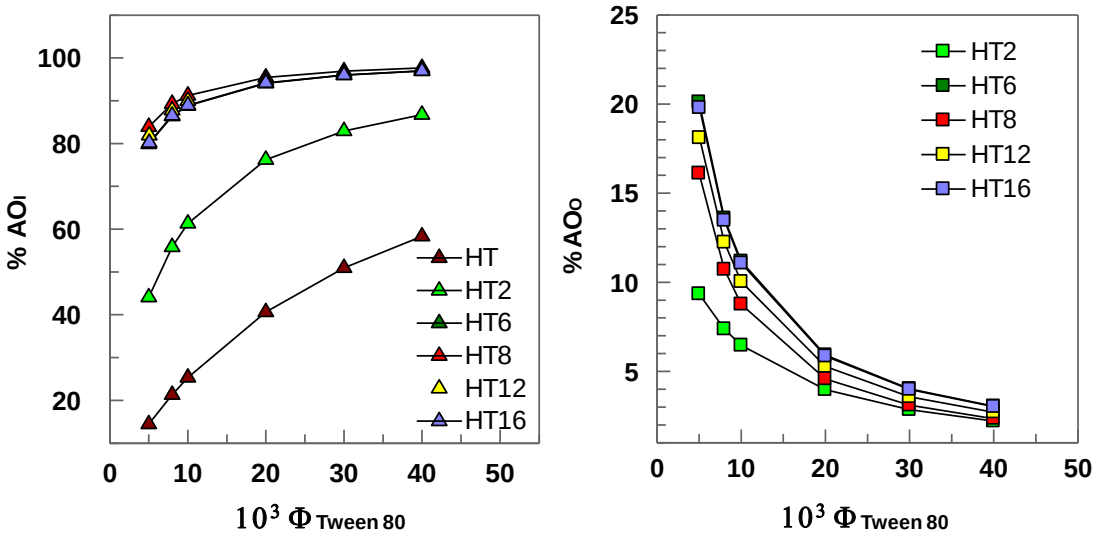
	HT	**HT2**	**HT6**	**HT8**	**HT12**	**HT16**
P_A^I	30 ± 4	186 ± 14	----	----	----	----
P_O^I	----	103 ± 8	79 ± 22	104 ± 13	89 ± 19	80 ± 13
10^2 k_I ($M^{-1}s^{-1}$)	19,0 ± 1,3	20,7 ± 2,9	25,6 ± 0,6	23,6 ± 0,2	20,2 ± 0,4	19,6 ± 0,3

Em todos os casos os valores de P_O^I e P_A^I obtidos são maiores que a unidade o que indica que a energia libre de Gibbs para a transferência dos mesmos entre a regiões aquosa e oleosa para a interfacial é negativa, o que significa que os AO tem uma tendência natural a estarem localizados na região interfacial.

O valor de P_A^I aumenta com o aumento da cadeia hidrofóbica dos AO, o que implica que a solubilidade em água diminui. Por outro lado, os valores de P_O^I diminuem quando aumentamos o número de átomos de carbono da cadeia alquílica em mais de 8, o que reflete o aumento da solubilidade no óleo.

Os valores de k_I são independentes do aumento da hidrofobicidade dos antioxidantes e semelhantes para todos os AOs.

A partir dos valores das constantes de partição, obteve-se a percentagem de antioxidante nas nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe /tampão citrato, 0,04M, pH=3,65/ Tween 80) em cada uma das regiões da nanoemulsão, para cada valor de Φ_I, *Figura 115*.



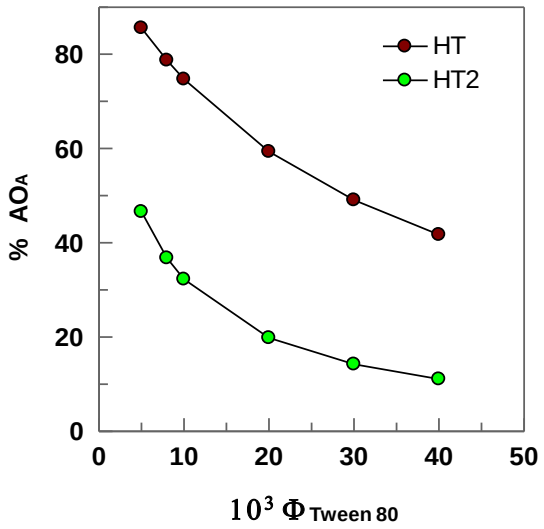


Figura 115 - Variação da percentagem do HT e dos seus derivados: (A) na região interfacial, (B), na região oleosa, (C) e na região aquosa de uma nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65), com a fração de emulsionante Tween 80.

Através dos resultados da *Figura 115,* verificou-se que para uma fração de emulsionante (Φ_I) de 0,005, apenas 20% do HT encontra-se distribuído na região interfacial, e à medida que Φ_I aumenta, a concentração deste também vai aumentando na região interfacial, ou seja, quando Φ_I=0,04, cerca de 70% do antioxidante encontra-se nesta região interfacial.

O derivado HT2 encontra-se distribuído nas três regiões da nanoemulsão, encontrando-se em cerca 40% na região interfacial aumentando para perto dos 90% à medida que se vai aumentando a fração de emulsionante, até se atingir Φ_I = 0,04. Com o aumento da fração de emulsionante a percentagem do HT2 na região aquosa diminui de ~ 50% a 10%, mas aumenta na região oleosa cerca de 10%.

Os derivados mais lipofílicos distribuem-se apenas pelas regiões interfacial/oleosa, apresentando-se na região interfacial numa percentagem de 80% para fração de emulsionante mais baixa (Φ_I=0,005), aumentando par cerca de 95% para a fração de emulsionante mais alta (Φ_I =0,04).

Através dos valores das constantes de partição obtidas verificamos um aumento do valor de P_O^I até ao HT8 e depois diminui para o HT12 e HT16. Isto permite-nos concluir que com o aumento da cadeia hidrocarbonada existe um aumento da quantidade de antioxidante na região interfacial até um máximo de 8 carbonos, diminuindo depois para os derivados com cadeia alquílica de 12 e 16 carbonos.

Verifica-se então que a percentagem de todos os AO na região interfacial aumenta com o aumento da fração de emulsionante, ocorrendo uma diminuição dos AOs na fase aquosa e oleosa, tal como verificado para as emulsões.

Os resultados mostram que para qualquer valor de Φ_I a % AO não se correlaciona com a hidrofobicidade dos antioxidantes, sendo a ordem observada : %HT<HT2< HT6=HT16=HT12<HT8 (*Figura 116*). Esta ordem é bastante semelhante à obtida em emulsões.

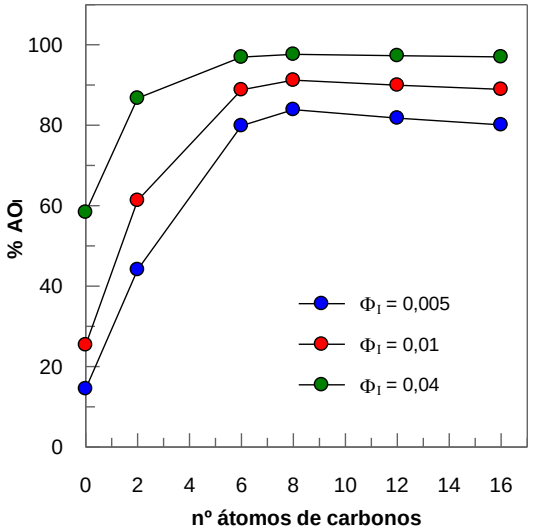


Figura 116 - Variação da percentagem de AO na região interfacial em função do número de átomos de carbono, para a fração de emulsionante Φ_I =0,005, Φ_I =0,01 e Φ_I =0,04 numa emulsão 4:6 (óleo de peixe tampão citrato 0,04M, pH=3,65 / Tween 80).

5.2. Concentrações efetivas do HT e seus derivados em cada região da nanoemulsão O/A

Determinou-se a concentração dos AOs na região interfacial através das *equações 57, 58* e *59*. Na *Figura 117* encontram-se as variação das concentrações de AO na região interfacial, oleosa e aquosa em função da fração de emulsionante, Φ_I.

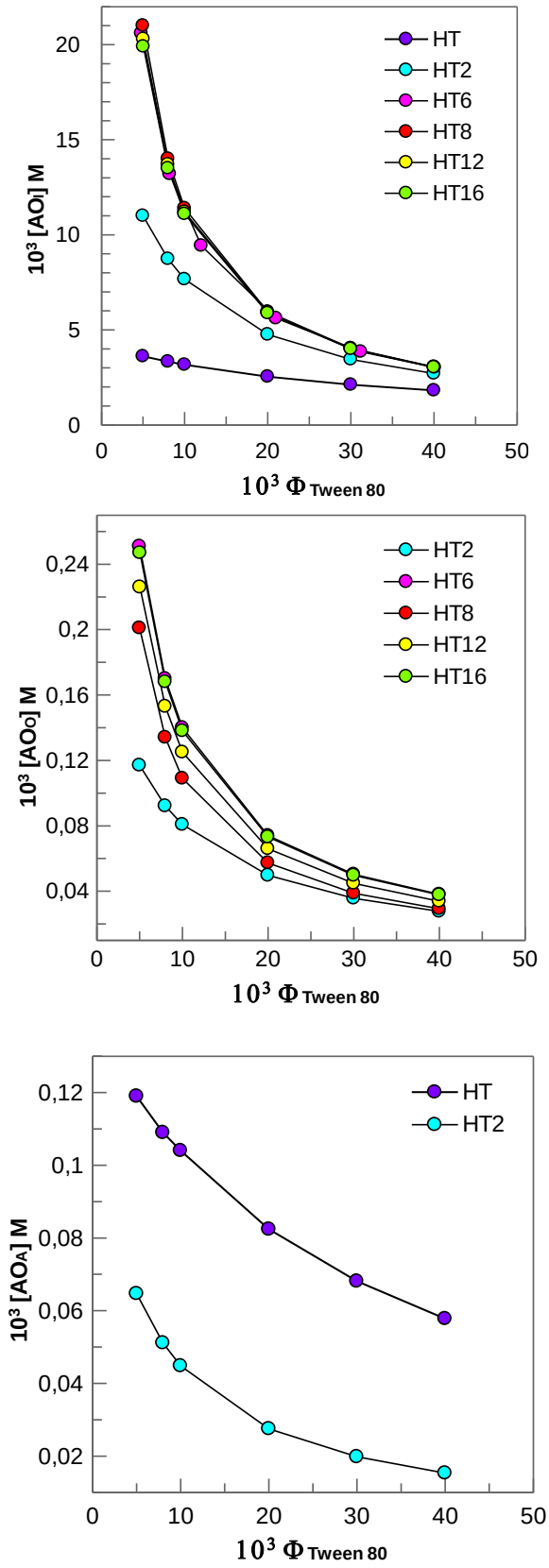


Figura 117 - Variação da concentração efetiva nas 3 regiões da nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04M, pH=3,65), com a fração de emulsionante Tween 80, [AO_T] = 0,125 m M.

Observando-se a *Figura 117*, podemos verificar que para qualquer valor de Φ_I, a concentração efetiva dos AOs na região interfacial é muito maior, num fator de 20-170 vezes, do que a estequiométrica ($1{,}25\times10^{-4}$ M), enquanto que a concentração efetiva na água é menor num fator de 1-8 vezes e no óleo pode ser maior ou menor dependendo do composto. Por exemplo, em qualquer Φ_I, a concentração efetiva de HT2 é 1,3 a 8 vezes menor na região aquosa e cerca de 1-4 vezes menor no óleo do que á concentração estequiométrica. A concentração efetiva para os derivados mais lipofílicos na região oleosa é maior para a fração de emulsionante mais baixa Φ_I =0,005 cerca de 1-2 vezes do que a concentração estequiométrica, e menor cerca de 1-3 vezes para a fração de emulsionante mais alta Φ_I =0,04. Verificou-se também para todos os AOs que com o aumento da fração de emulsionante a concentração de AO em cada uma das regiões diminui.

Deste modo analisou-se o efeito que a fração de emulsionante e a relação O/A apresentam sobre as concentrações na região interfacial. Na *Figura 118*, mostra-se a variação da concentração efetiva na região interfacial em função da hidrofobicidade dos AOs para três frações de emulsionante, em função do tamanho da cadeia alquílica do AOs (A) e a influência da alteração da razão O/A (B).

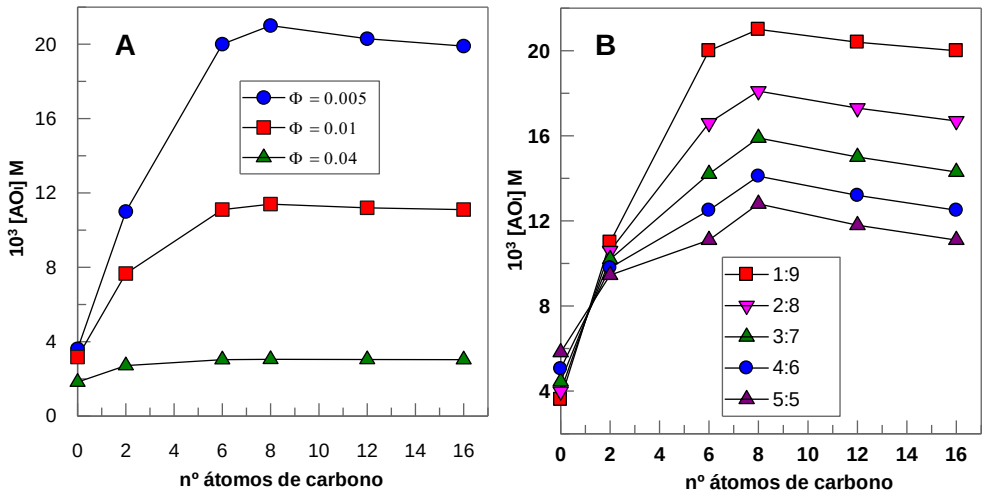


Figura 118 – (A)- Efeito da hidrofobicidade do AO na concentração do AO na região interfacial para o HT e derivados, numa nanoemulsão 1:9 O/A (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65/ Tween 80) com três frações de emulsionante diferentes. (B) Efeito da relação O/A na concentração do HT e derivados na região interfacial, para a fração de emulsionante Φ_I =0,005, $[AO_T]$ = 0,125 mM.

Através da *Figura 118 (A)*, verificamos que a variação na concentração dos AOs na região interfacial com o número de átomos de carbonos da cadeia alquílica é mais evidente para frações de emulsionante mais baixas, (Φ_I =0,005), do que para frações mais altas (Φ_I =0,04), onde a concentração efetiva é praticamente constante (~ 3 mM).

Isto é consequência da incorporação dos AO na região interfacial, de forma que para frações de emulsionante mais altas, uma grande percentagem de todos os AO localizam -se nesta região. Por outro lado, também se verificou que com o aumento da fração de emulsionante a concentração de todos os AOs diminui cerca de 3-6 vezes dependendo do composto devido á diluição, provocada pelo aumento do volume da região interfacial.

Na *Figura 118 (B)*, é possível verificar o efeito que a relação O/A tem sobre a concentração dos AO na região interfacial. Para um valor constante de fração de emulsionante (Φ_I =0,005), verificamos que a concentração de AO na região interfacial aumenta com o maior volume de óleo utilizado na emulsão (~4 mM a 20 mM), ou seja cerca de 20 - 167 vezes superior que a concentração estequiométrica $[AO_T] = 1{,}25 \times 10^4$ M. Para a razão 1:9 O/A, é mais evidente o aumento da concentração dos AO na região interfacial com o aumento da cadeia alquílica de cerca de 5 vezes (~4 mM a 20 mM), em relação á razão 5:5 O/A que só aumenta cerca de 2 vezes (~6mM a 12mM).

Apesar das diferentes razões O/A, verificou-se um máximo de concentração dos AO na região interfacial para o derivado HT8.

Estes resultados demonstram que alterando a relação O/A, pode-se modular significativamente as concentrações dos AO na região interfacial.

6. Análise comparativa da distribuição dos antioxidantes em emulsões e nanoemulsões

Analisando em conjunto os resultados obtidos para as emulsões e nanoemulsões com óleo de peixe, é possível analisar se o tamanho da gota do sistema emulsionado tem ou não um efeito significativo sobre a distribuição.

Uma análise comparativa da distribuição a partir das constantes de partição nos dois sistemas emulsionados, verificou-se que estas constantes determinadas apresentam diferenças inferiores a 10% (*Tabela 26*), dependendo da natureza do AO e da fração de emulsionante utilizada, *Figura 119*.

Tabela 26 - Constantes de partição para o hidroxitirosol e seus ésteres numa emulsão e numa nanoemulsão.

		HT	HT2	HT6	HT8	HT12	HT16
Nanoemulsão	P_A^I	30 ± 4	186 ± 14	----	----	----	----
	P_O^I	----	103 ± 8	79 ± 22	104 ± 13	89 ± 19	80 ± 13
	$10^2\ k_I$ ($M^{-1}s^{-1}$)	19,0 ± 1,3	20,7 ± 2,9	25,6 ± 0,6	23,6 ± 0,2	20,2 ± 0,4	19,6 ± 0,3
Emulsão	P_A^I	34 ± 1	207± 39	---	---	---	---
	P_O^I	---	115 ± 22	89 ± 8	119 ± 45	97 ± 14	75 ± 12
	$10^2\ k_I$ ($M^{-1}s^{-1}$)	10,6 ± 0,2	16,7 ± 5,7	19,0 ± 0,3	18,7 ± 8,8	16,3 ± 0,4	16,0 ± 0,2

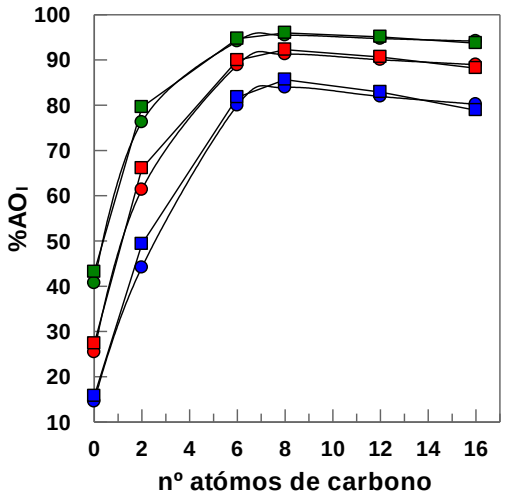


Figura 119 - Distribuição comparativa do hidroxitirosol e derivados em emulsões e nanoemulsões. Variação das frações de emulsionante (Φ_I = 0,005, 0,01 e 0,02). Condições nanoemulsões e emulsões 1:9 óleo de peixe/tampão citrato , 0,04M, pH=3,65.

Através da *Figura 119*, podemos observar que a percentagem de AO na região interfacial na emulsão é muito semelhante à percentagem de AO na mesma região na nanoemulsão. Assim, é possível concluir que a distribuição dos AOs em sistemas emulsionados é independente do diâmetro das gotas que o constitui.

De acordo com o sucedido para a serie de galatos, verificou-se que a distribuição do HT e seus ésteres é muito semelhante nos dois sistemas emulsionados. Assim, confirma-se que a distribuição dos AO é independente do tamanho de gota e, por conseguinte, da área de superfície da região interfacial.

7. Avaliação da atividade antioxidante em sistemas emulsionados e correlação com a sua distribuição

7.1. Atividade antioxidante do hidroxitirosol e seus derivados em emulsões O/A

Estudou-se a atividade antioxidante do HT e dos seus derivados em emulsões formadas por óleo de peixe e tampão citrato (0,04 M, pH= 3,65), com 0,5 %, 1% e 2% de Tween 80 e contendo 0,5 mM de cada um dos antioxidantes. Para tal, submeteram-se as emulsões a um teste de aceleração oxidativa a uma temperatura de 40 ºC (teste da estufa de Schaal). Estas experiências realizaram-se em triplicado.

A *Figura 120*, representa o tempo (dias) que o conteúdo em dienos conjugados das emulsões contendo 1% de emulsionante e HT e seus ésteres demorou a alcançar o valor de 0,5 %.

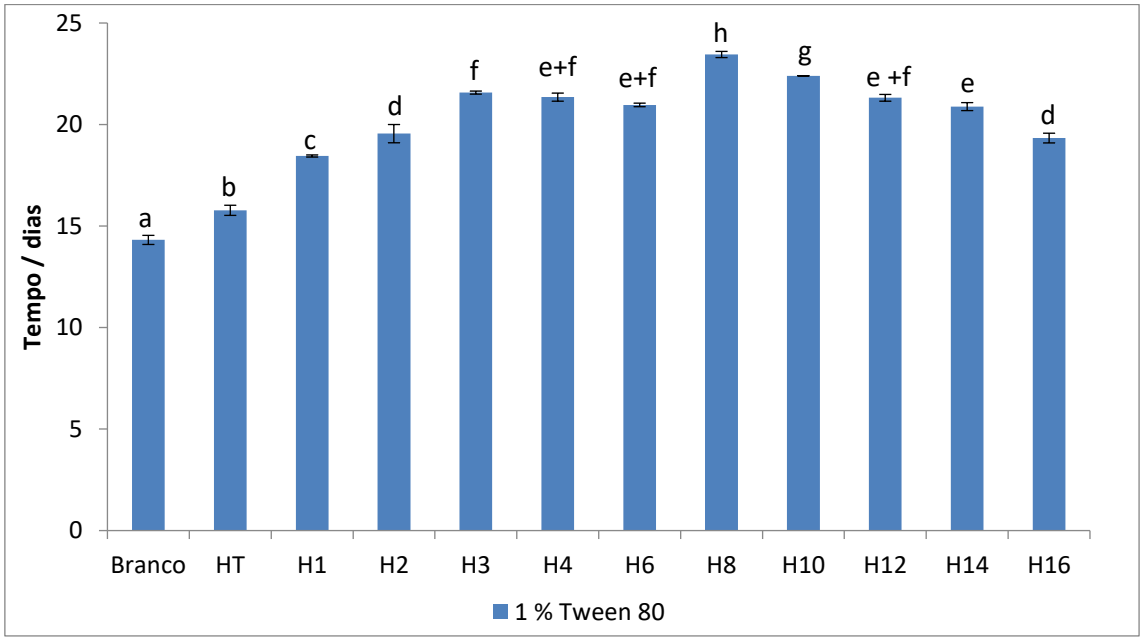


Figura 120 - Tempo (dias) para que as emulsões contendo 1% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: emulsões 4:6 (óleo de peixe/Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,65/ Tween 80), [AO_T] = 0,5 mM

De acordo com o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a atingir o valor de 0,5 %, para a percentagem de emulsionante de 1 %, a ordem de atividade

antioxidante foi: HT8 > HT10 > HT3 = HT4 = HT6 = HT12 = HT14 > HT2 = HT16 > HT1 > HT > branco.

A ordem de eficácia obtida não obedece ao paradoxo polar, na medida em que os antioxidantes mais hidrofóbicos, como o HT16, apresentam menor eficácia que o HT8 nos sistema emulsionado utilizado. A eficácia dos antioxidantes aumentou até ao HT8, decrescendo para os antioxidantes com cadeias hidrocarbonadas maiores que 8 carbonos. Resultados semelhantes foram encontrados por Medina *et al [58]* para uma série de ésteres do HT em emulsões de óleo de peixe/água. Estes autores observaram um aumento da atividade antioxidante do HT para o HT8 e uma diminuição da atividade antioxidante para o HT12.

A atividade antioxidante numa emulsão depende da partição e distribuição dos antioxidantes entre as diferentes regiões que a constituem, da estabilidade dos antioxidantes e, muito particularmente, dos fenómenos que ocorrem na região interfacial óleo/água. Desta forma, a concentração de antioxidante na região interfacial terá um papel importante no que respeita à estabilidade oxidativa das emulsões. Avaliou-se, por isso, o efeito na atividade antioxidante com o aumento da fração de emulsionante.

Na *Figura 121* está representado o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a alcançar o valor de 0,5 % nas emulsões contendo 0,5 %, 1 % e 2 % de emulsionante Tween 80 e os vários AOs.

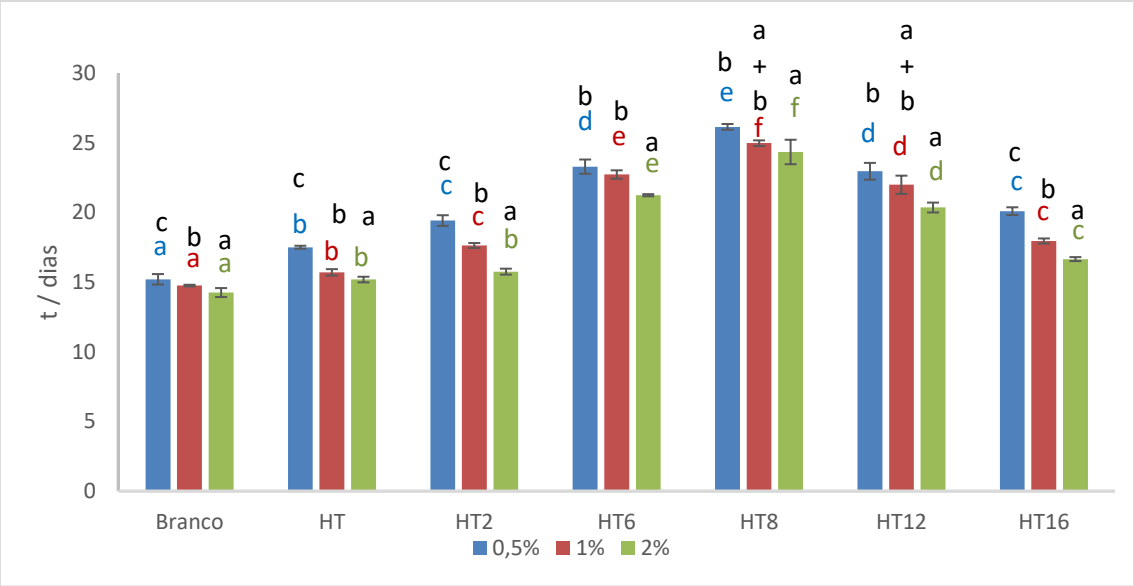


Figura 121 – Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0.5 %, 1% e 2% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes; letras coloridas – compostos diferentes, percentagem de Tween 80 igual; letras pretas – compostos iguais, percentagem de Tween 80 diferente). Condições experimentais: emulsões 4:6 (óleo de peixe/Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,65/ Tween 80), [AO_T] = 0,5 mM.

Podemos verificar que, o tempo que o conteúdo em dienos conjugados das emulsões contendo os ésteres do HT demorou a alcançar o valor de 0,5 % diminuiu com o aumento da percentagem de emulsionante. Embora ocorra um aumento da quantidade do antioxidante na região interfacial, com o aumento da quantidade de emulsionante ocorre igualmente uma diluição do antioxidante que se encontra nesta região o que explica este resultado. O resultado da atividade antioxidante dependerá assim, do balanço entre o aumento da quantidade do antioxidante na região interfacial e da diluição que ocorre pelo aumento do volume nesta região

7.1.1. Correlação da distribuição com a eficácia antioxidante em emulsões O/A

Na *Figura 122* encontram-se a correlação dos resultados da distribuição com a eficácia antioxidante em emulsões.

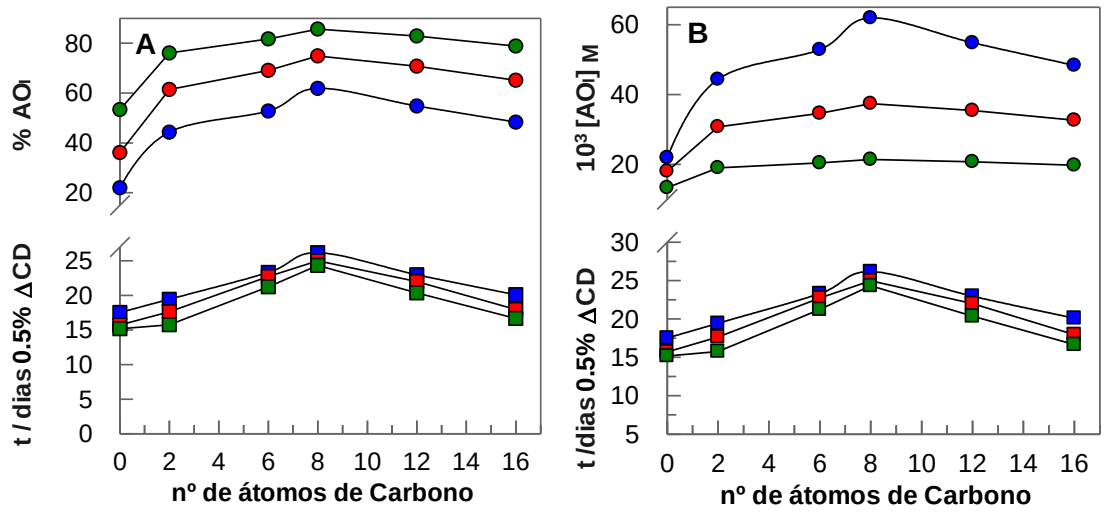


Figura 122 – Variação da eficácia antioxidante e da percentagem de AO na região interfacial (A) e da eficácia antioxidante e da concentração efetiva na região interfacial (B) em função do aumento de átomos de carbono da cadeia alquílica, numa emulsão 4:6 de óleo de peixe/tampão citrato,0,04M / pH=3.65, para a frações de emulsionante de Φ_i=0,005 (azul), Φ_i=0,01 (vermelho) e Φ_i=0,02 (verde).

Analisando em conjunto os dados da distribuição e da eficácia antioxidante, verificamos que a concentração de AO na região interfacial e a eficácia antioxidante correlacionam entre si, encontrando-se um ligeiro máximo para o derivado HT8. Estes resultados estão de acordo com os anteriormente obtidos para a serie dos galatos, confirmando a importância das concentrações dos AO na região interfacial para atividade antioxidante dos mesmos. Assim, mais uma vez os AO que se encontram em

maior concentração na região interfacial (*Figura 122 B*), ou seja, em menor percentagem de AO nesta região (*Figura 122 A*), são os que apresentam maior atividade antioxidante.

7.2. Atividade antioxidante do hidroxitirosol e seus derivados em nanoemulsões O/A

Estudou-se a atividade antioxidante do hidroxitirosol e dos seus derivados em nanoemulsões formadas por óleo de peixe e tampão citrato (0,04 M, pH= 3,65), com 0,5 %, 1% e 2% de Tween 80 e contendo 0,125 mM de cada um dos antioxidantes, a uma temperatura de 40 ºC.

A *Figura 123* mostra um exemplo típico das cinéticas de oxidação lipídica obtidas.

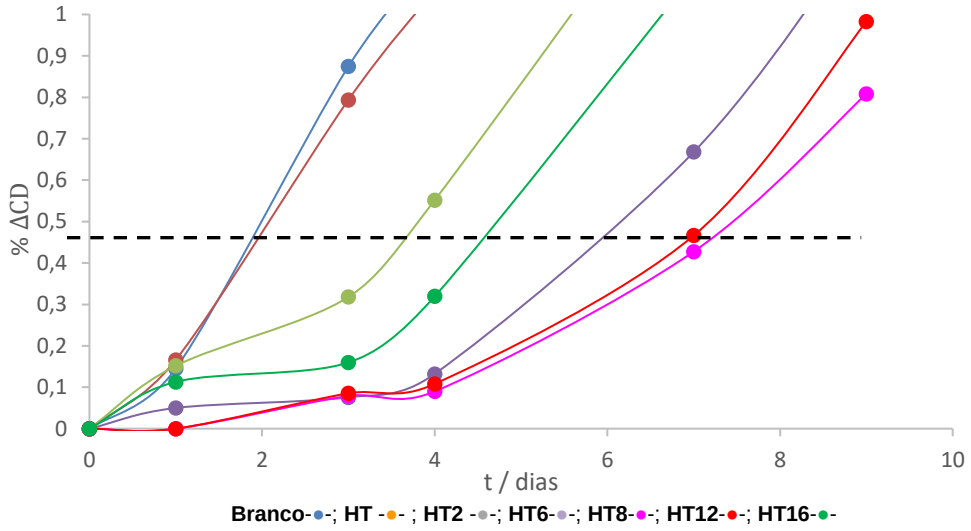


Figura 123 – Efeito do HT e dos seus ésteres na oxidação das nanoemulsões 1:9 óleo de peixe/tampão citrato,0,04M, pH=3,65, a T = 40ºC para a fração de emulsionante de 0,5% Tween 80, monitorizada pelo aumento da percentagem em dienos conjugados.

A *Figura 124* representam o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a alcançar o valor de 0,5 % nas nanoemulsões, contendo 0,5 %, 1 % e 2 % de emulsionante, respetivamente.

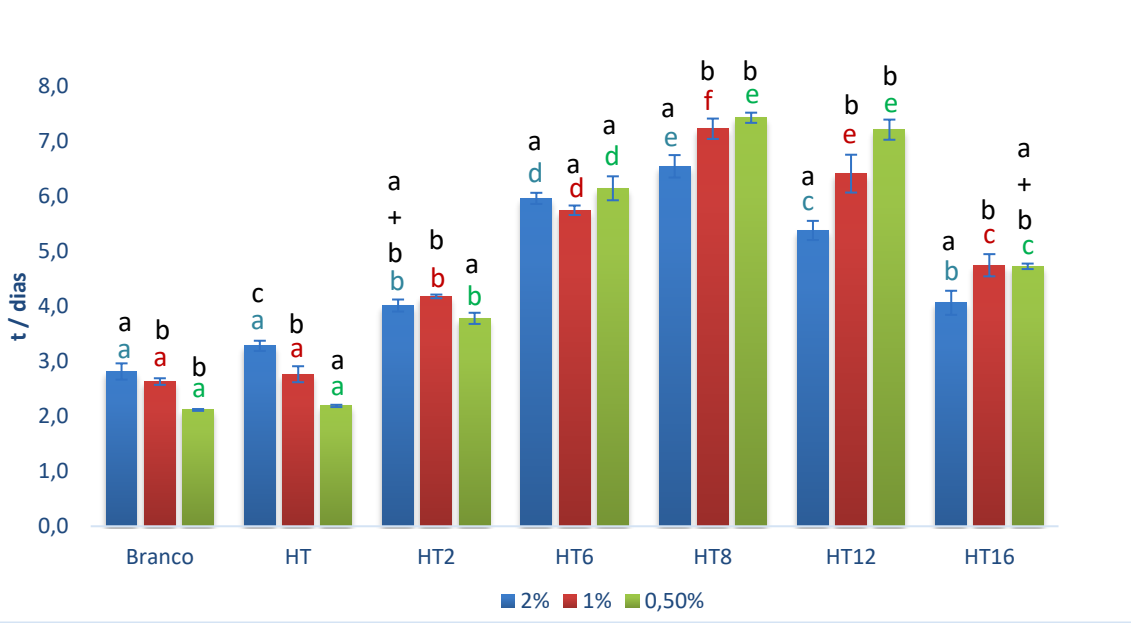


Figura 124 - Tempo (dias) para que as nanoemulsões contendo 0.5 %, 1% e 2% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados, (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes; letras coloridas – compostos diferentes, percentagem de Tween 80 igual; letras pretas – compostos iguais, percentagem de Tween 80 diferente). Condições experimentais: nanoemulsões 1:9 (óleo de peixe/Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,65/ Tween 80), [AO_T] = 0,125 mM.

De acordo com o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demora a atingir o valor de 0,5 %, para as várias percentagens de emulsionante de 0,5 %, 1 % e 2 %, a atividade antioxidante aumentou do HT para o HT8, diminuindo depois a partir do derivado HT12.

7.2.1. Correlação da distribuição com a eficácia antioxidante em nanomulsões O/A

Na *Figura 125*, mostra-se a percentagem de AO na região interfacial (A) e a variação da eficácia antioxidante e da concentração do AO na região interfacial (B) em função do aumento da cadeia alquílica, para as frações de emulsionante Tween 80 de Φ_I =0,005, Φ_I =0,01 e Φ_I =0,02.

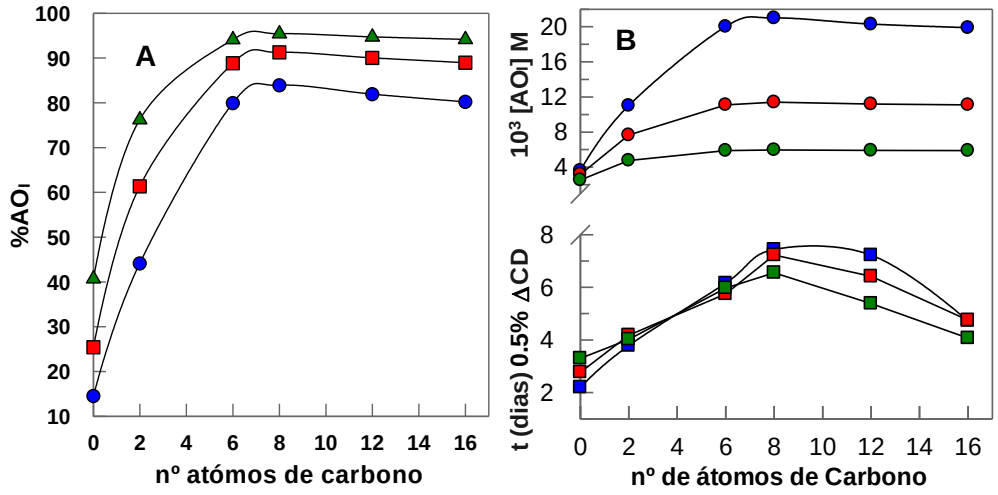
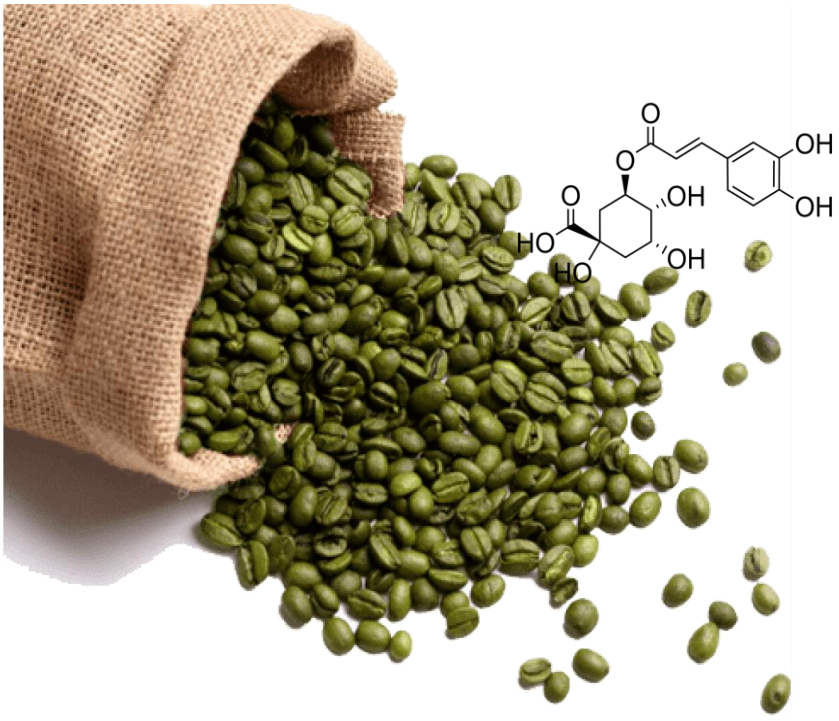


Figura 125 - Variação da percentagem de AO na região interfacial (A) e da eficácia antioxidante e da concentração efetiva na região interfacial (B) em função do aumento da cadeia alquílica, numa nanoemulsão 1:9 de óleo de peixe/tampão citrato,0,04M / pH=3,65, para a frações de emulsionante de Φ_I=0,005 (azul), Φ_I=0,01 (vermelho) e Φ_I=0,02 (verde), [AO_T] = 0,125 mM.

Observando a *Figura 125 (A)*, verificou-se novamente que a percentagem de AO na região interfacial aumenta com o aumento da fração de emulsionante pelo que na fração mais alta Φ_I=0,04 , 40% a 90% de AO encontra-se nesta região, dependo do AO. Por outro lado, aumentando a fração de emulsionante, aumentamos o volume da região interfacial pelo que a concentração dos AOs diminui na referida região (*Figura 125 (B*)).

O derivado que apresenta maior concentração na região interfacial, o HT8, é o derivado que também apresenta melhor eficácia antioxidante, concluindo-se assim que existe uma correlação direta entre a eficácia antioxidante e a concentração deste na região interfacial.

Capítulo 4 – Ácido Clorogénico e Derivados



Os ácidos hidroxicinâmicos encontram-se em abundância nos alimentos de origem vegetal. O ácido cafeico é o maior representante desta família de polifenóis, estando presente nos alimentos principalmente como ácido clorogénico, que é um éster deste com ácido quínico. O café e frutas são as maiores fontes de ácido clorogénico na alimentação. Estudos epidemiológicos têm sugerido a associação entre o consumo destes alimentos e a prevenção de doenças cardiovasculares.

O ácido clorogénico é muito hidrofílico devido à presença de inúmeros grupos hidroxilo. De modo a aumentar a sua hidrofobicidade é possível proceder à sua esterificação com álcoois de cadeia alquílica linear de vários tamanhos a fim de aumentar a lipossolubilidade destes compostos.

1. Síntese dos derivados do ácido clorogénico

Sintetizaram-se vários ésteres do ácido clorogénico por esterificação, deste com um álcool com cadeia alquílica contendo de 1 a 16 carbonos, de acordo com o procedimento descrito por *Giraldo et al.* com algumas modificações (*Figura 126*).

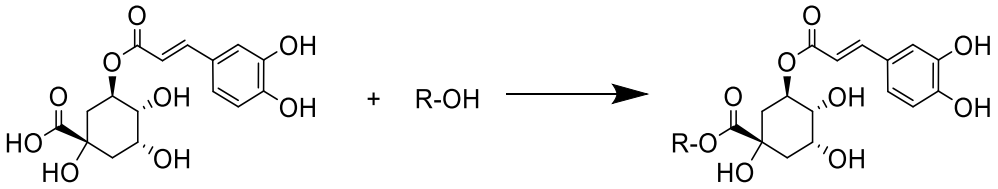


Figura 126 - Síntese dos ésteres do ácido clorogénico.

Os rendimentos obtidos, após purificação, variaram entre 36 % a 94 % (*Tabela 27*).

Tabela 27 - Resultados experimentais das massas e rendimentos obtidos nas sínteses dos derivados do ácido clorogénico.

Derivados	R	m_{obtida}/g	Rendimento (%)
CGA1	C_1H_3	0,47	94
CGA2	C_2H_5	0,36	72
CGA3	C_3H_7	0,35	59
CGA4	C_4H_9	0,40	70
CGA8	C_8H_{17}	0.26	61
CGA10	$C_{10}H_{21}$	0,34	36
CGA12	$C_{12}H_{25}$	0,41	57
CGA16	$C_{16}H_{33}$	0,39	48

A purificação dos ésteres de cadeia longa, por extração líquido-líquido, mostrou-se difícil pelo facto dos sais destes compostos apresentarem propriedades tensioativas consideráveis. Assim, aquando da extração dos derivados da mistura reacional, formando-se emulsões de difícil separação bem como espuma abundante, justificando os rendimentos mais baixos obtidos para estes compostos.

2. Reatividade do ácido clorogénico e seus derivados

2.1. Avaliação da atividade antirradicalar – Método do DPPH•

A atividade antirradicalar é definida pelo parâmetro EC_{50} que corresponde à concentração mínima necessária para o antioxidante captar 50 % dos radicais de DPPH• iniciais. Para determinar esse parâmetro, representou-se graficamente, para um determinado tempo, a variação da absorvância com a relação mol AO/ mol DPPH•, *Figura 127*.

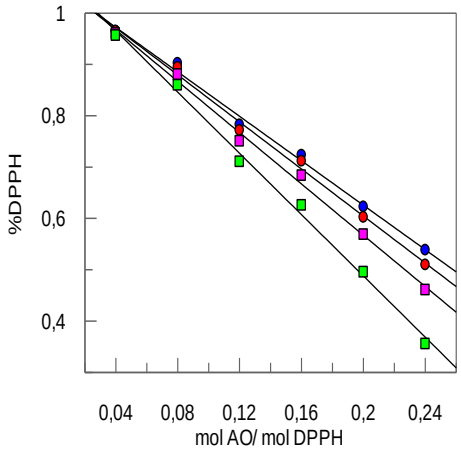


Figura 127 - Representação da variação da percentagem de DPPH• com a concentração de antioxidante (ex: clorogenato de metilo), expressa em mol AO/ mol DPPH•, para os diferentes tempos de reação, com o correspondente ajuste linear. (-●- 5 min, -●- 15 min, -■- 30 min, -■- 60 min).

Determinaram-se os valores de EC_{50} para o ácido clorogénico e seus derivados (*Tabela 28)*. Dado que os valores de EC_{50} indicam a relação mol AO/ mol DPPH• necessária para reduzir a metade a concentração inicial de DPPH•, os antioxidantes que tenham um valor de EC_{50} menor, serão aqueles que apresentam maior atividade antirradicalar.

Tabela 28 - Valores de EC_{50} obtidos para diferentes tempos de reação, para o ácido clorogénico e seus derivados.

Antioxidante	EC_{50}			
	5 min	15 min	30 min	60 min
CGA	0,243 ± 0,004	0,235 ± 0,005	0,234 ± 0,005	0,234 ± 0,006
CGA1	0,245 ± 0,005	0,232 ± 0,004	0,213 ± 0,005	0,182 ± 0,005
CGA2	0,243 ± 0,003	0,217 ± 0,005	0,188 ± 0,009	0,172 ± 0,012
CGA3	0,258 ± 0,006	0,233 ± 0,003	0,197 ± 0,005	0,162 ± 0,004
CGA4	0,248 ± 0,003	0,234 ± 0,002	0,213 ± 0,002	0,179 ± 0,005
CGA8	0,244 ± 0,003	0,234 ± 0,004	0,217 ± 0,005	0,184 ± 0,008
CGA10	0,242 ± 0,004	0,228 ± 0,005	0,207 ± 0,007	0,176 ± 0,009
CGA12	0,249 ± 0,006	0,238 ± 0,004	0,220 ± 0,004	0,189 ± 0,005
CGA16	0,237 ± 0,006	0,223 ± 0,006	0,200 ± 0,005	0,161 ± 0,005

EC_{50} expresso em mol de antioxidante/ mol de $DPPH^{\bullet}$

Pela análise da *Tabela 28*, e ao fim de 5 minutos de reação, não se observaram diferenças significativas entre o ácido clorogénico e seus derivados, o que sugere que a reatividade destes frente ao radical $DPPH^{\bullet}$ é similar. No entanto, verificou-se que em solução metanólica e após 30 minutos de reação, ocorre uma maior diminuição do valor do parâmetro EC_{50} para os ésteres derivados do ácido clorogénico do que para o CGA, indicando um aumento na reatividade do polifenol causada pela esterificação do grupo carboxílico.

Na generalidade, as curvas absorvância em função do tempo para todos os ésteres caracterizam-se por um rápido desaparecimento inicial da absorção do radical $DPPH^{\bullet}$, normalmente atribuído a reações de transferência do hidrogénio/eletrão do antioxidante para o radical, seguido de um lento desaparecimento subsequentemente deste radical, normalmente atribuído a reações secundárias mais lentas de produtos de dimerização do radical fenóxilo, entre outras. Todos os derivados do ácido clorogénico apresentaram este comportamento de um modo similar, mostrando a existência de um mecanismo de reação semelhante para todos os ésteres do CGA estudados. A semelhante reatividade dos derivados do ácido clorogénico frente aos radicais $DPPH^{\bullet}$ em solução sugerem que a possível diferença na atividade antioxidante destes compostos em emulsões poderá então dever-se à provável diferença na distribuição destes pelas várias regiões que as compõem.

2.2. Determinação do primeiro potencial anódico - Voltametria Cíclica

De forma a avaliar as propriedades redox do ácido clorogénico e seus derivados, determinou-se por voltametria cíclica o primeiro potencial anódico (*Epa*) dos antioxidantes. Na *Tabela 29* encontram-se os resultados obtidos.

Tabela 29 - Valores do primeiro potencial anódico, determinados por voltametria cíclica, para o ácido clorogénico e seus derivados.

	pH = 7,3	**pH = 3,6**	**pH = 3,6 + Tween 80**
Antioxidante	***Epa** (V)	***Epa** (V)	***Epa** (V)
CGA	0,298	0,395	0,398
CGA1	0,295	0,390	0,394
CGA2	0,292	0,410	0,403
CGA3	0,298	0,415	0,388
CGA4	0,295	0,397	0,400
CGA8	0,298	0,416	0,409
CGA10	0,297	0,393	0,394
CGA12	0,305	0,396	0,407
CGA16	0,302	0,394	0,400

**Epa*, potencial anódico *vs* Ag/AgCl.

Compostos com potenciais anódicos mais baixos são mais facilmente oxidados e geralmente apresentam melhor atividade antioxidante. De acordo com a atividade similar na reatividade frente ao radical DPPH$^{\bullet}$ encontrado para os ésteres do CGA (*Tabela 28*), não foram também observadas diferenças significativas no valor do potencial anódico para os vários clorogenatos . Além disso, a presença de Tween 80, não alterou o valor do potencial anódico encontrado. Podemos então concluir que os valores obtidos para o primeiro potencial anódico são independentes do comprimento da cadeia alquílica dos ésteres e independente da presença de Tween 80.

3. Distribuição do ácido clorogénico e seus derivados

3.1. Constantes de partição P_A^O em sistemas binários óleo/água

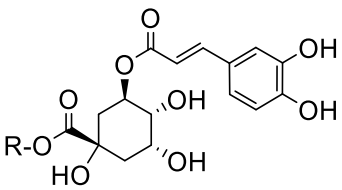
Determinou-se a constante de partição, P_A^O, do ácido clorogénico e dos seus derivados para uma mistura binária constituída por 4 mL de óleo de peixe purificado e 6 mL de solução tampão citrato 0,04 M e pH = 3,65, contendo uma concentração de $3{,}0 \times 10^{-3}$ M do antioxidante, de acordo com o procedimento descrito na secção material e métodos.

Para o efeito, fez-se a quantificação espectrofotométrica dos vários antioxidantes nas fases oleosa e aquosa, e calculou-se a constante de partição da seguinte forma:

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

Na *Tabela 30* encontram-se os resultados obtidos para os diferentes antioxidantes.

Tabela 30 - Percentagem dos diferentes antioxidantes presentes na fase aquosa e oleosa de uma mistura binária óleo/água e o valor da constante de partição P_A^O, para o ácido clorogénico e seus derivados.

Antioxidantes		**Sistema binário água/ óleo**		
Estrutura	-R	P_A^O	% AO_o	% AO_A
	-H (CGA)	0,009 ± 0,002	0,6 ± 0,2	99,4 ± 0,2
	- CH_3 (CGA1)	0,03 ± 0,02	2,2 ± 1,4	97,8 ± 1,4
	-CH_2CH_3 (CGA2)	0,05 ± 0,01	2,9 ± 0,5	97,1 ± 0,5
	-$(CH_2)_2CH_3$ (CGA3)	0,15 ± 0,02	9,1 ± 1,0	90,9 ± 1,0
	-$(CH_2)_3CH_3$ (CGA4)	0,20 ± 0,01	12,5 ± 0,5	87,5 ± 0,5
	-$(CH_2)_5CH_3$ (CGA6)	15,8 ± 0,4	91,3 ± 0,2	8,7 ± 0,2

Verifica-se, como esperado, a quase total solubilidade do ácido clorogénico na fase aquosa da mistura binária, numa percentagem de 99,4 %. Os derivados CGA1, CGA2 CGA3 e CGA4, ainda apresentam uma elevada percentagem em água, 98, 97, 91 e 88 % respetivamente. A partir do clorogenato de hexilo ocorre uma abrupta diminuição da solubilidade em água, encontrando-se todos os antioxidantes praticamente na fase oleosa.

4. Distribuição do ácido clorogénico e seus derivados em emulsões O/A

4.1. Constantes de partição do ácido clorogénico e seus derivados em emulsões óleo de peixe/tampão citrato (O/A)

Estudou-se o efeito que a fração de emulsionante utilizada exerce sobre o valor de k_{obs}, entre os iões 16-ArN_2^+ e o ácido clorogénico em emulsões 1:9, óleo de peixe/tampão citrato (0,04 M, pH= 3,65) para frações de emulsionante (Tween 80) compreendidas entre 0,005 e 0,04. Para isso, utilizou-se o método da derivatização descrito na *secção I*. Em todos os casos, os pares de dados absorvância-tempo obtidos ajustaram-se perfeitamente à equação integrada de ordem 1, tendo assim possível obter a constante de velocidade observada, k_{obs}. Na *Figura 128* está representado um exemplo de uma variação típica da absorvância do corante em função do tempo, bem como a representação de $\ln(A_t - A_{inf})$ em função do tempo para o CGA e para o derivado CGA8.

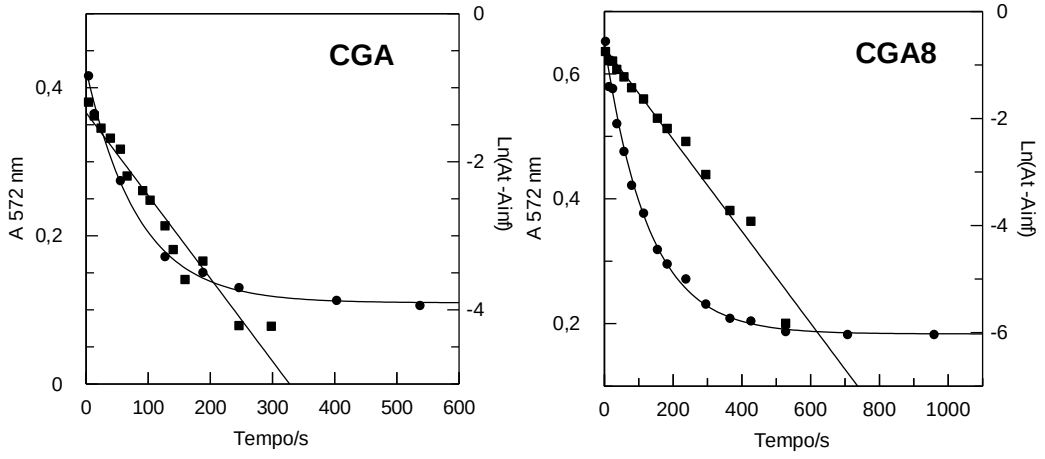


Figura 128 - Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln [A_t-A_{inf}] vs tempo. (Condições experimentais: emulsão 1:9 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), Φ_I = 0,03845 para o CGA e CGA8 e Φ_I = 0,010651, [16-ArN_2^+] = 3,54x10^{-4} M, [AO] = 4,0x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25 ºC.

Dado que mais de 99% do CGA se encontra na região aquosa, analisaram-se os resultados experimentais com base no modelo simplificado da pseudofase, ajustando os dados (k_{obs}, Φ_l) às *equações 48* e *49* deduzidas na *secção I (Figura 129).*

Pelos valores da constante de partição binária (*Tabela 30*), podemos concluir que os derivados clorogenato de etilo (CGA2) e butilo (CGA4), são solúveis nas duas regiões, oleosa e aquosa, encontrando-se o CGA2 cerca de 97% na fase aquosa e o CGA4 cerca de 90%, pelo que os resultados experimentais para estes dois compostos foram obtidos recorrendo ao modelo completo da pseudofase, ajustando os dados (k_{obs}, Φ_l) às *equações 31* e *32* deduzidas na *secção I* (*Figura 130*).

Uma vez que os clorogenatos de octilo, dodecilo e hexadecilo se encontravam aproximadamente 100% na região oleosa, aplicou-se o modelo cinético da pseudofase simplificado (MCPS) na análise dos dados experimentais, ajustando os dados (k_{obs}, Φ_l) à *equação 42* deduzidas na *secção I (Figura 131)*.

Nas *Figuras 129-131*, observa-se a variação da k_{obs} para todos os compostos em função da fração de emulsionante. Verificou-se k_{obs} diminuiu num fator de 3-7 vezes ao aumentar a fração de emulsionante de Φ_l= 0,005 a Φ_l= 0,04.

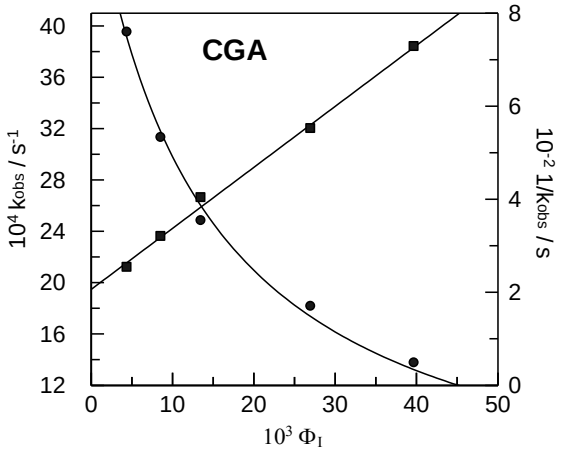


Figura 129 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_l) com os respetivos ajustes às *equações 48* e *49*. Condições experimentais: emulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =3,54× $10^{-4}M$, [CGA] =4,00× $10^{-3}M$, [NED] =0,019 M e *T*= 25ºC.

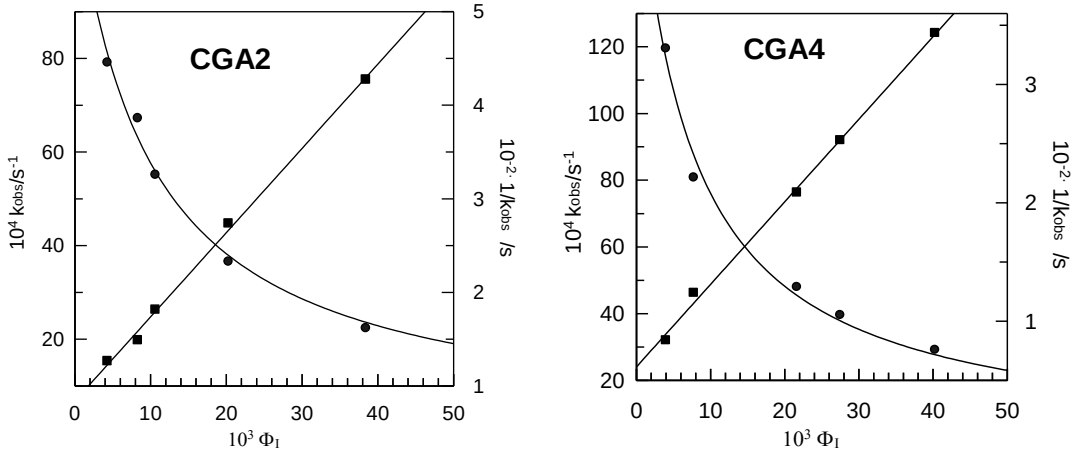


Figura 130 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes à *equações 31* e *32*. Condições experimentais: emulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90× 10^{-4}M, [CGA2] = 4,0x10^{-3} M, [CGA4] = 2,0x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25 ºC.

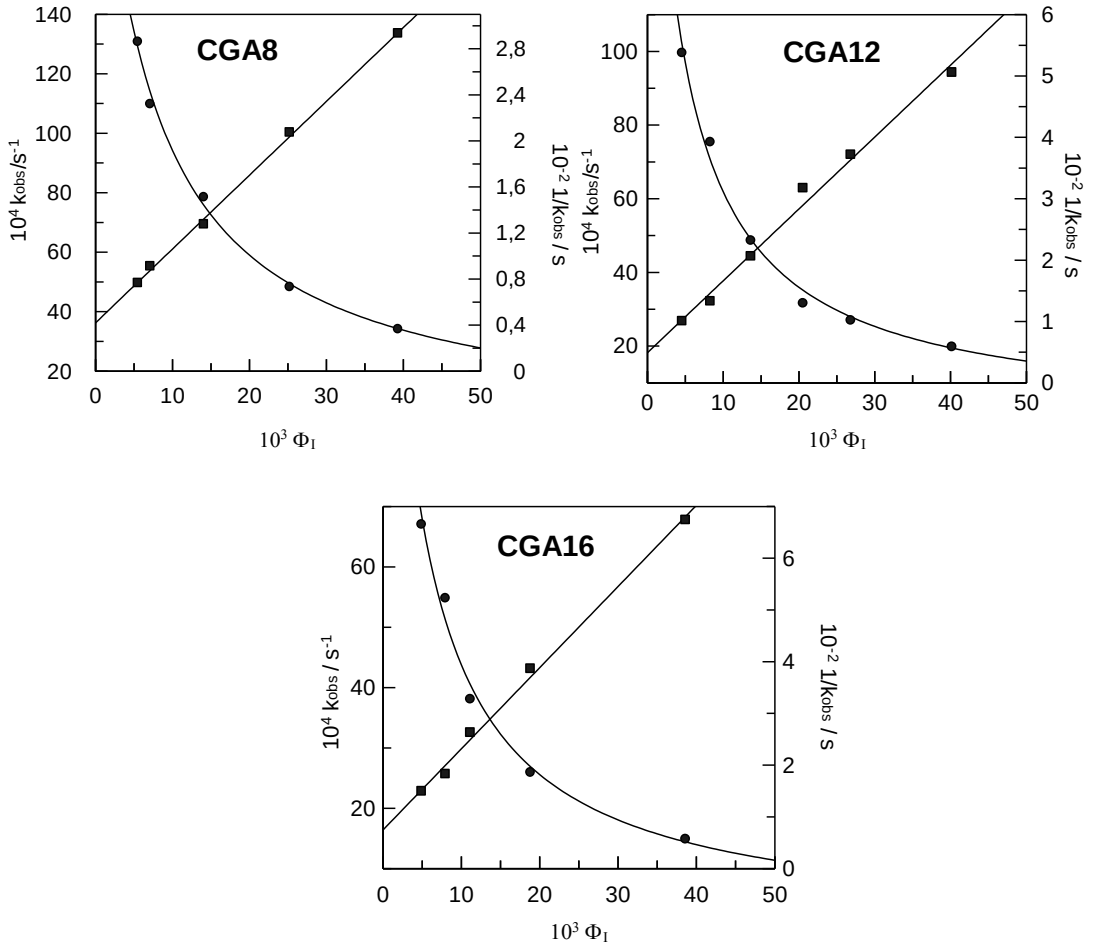


Figura 131 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 41* e *42*, para o CGA8, CGA12 e CGA16. Condições experimentais: emulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] = 2,90x10^{-4} M, [NED] = 0,019 M, [CGA6-CGA8] = 4,0x10^{-3}, [CGA_C16] = 3,0x10^{-3} M T = 25,0ºC.

Na *Tabela 31* encontram-se os valores das contantes de partição, P_A^O, P_A^I, P_O^I e os valores de k_I calculados.

Tabela 31 - Sumário dos valores das constantes obtidas para o ácido clorogénico e seus derivados numa mistura binária4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato) e numa emulsão 1:9 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato), para o ácido clorogénico e seus derivados.

	CGA	**CGA2**	**CGA4**	**CGA8**	**CGA12**	**CGA16**
P_A^I	47,13	67,19	78,07	---	---	---
P_O^I	---	1343,88	390,35	20,2	22,33	20,98
$10^2\ k_I$ ($M^{-1}s^{-1}$)	1,9 ± ,07	2,8 ± 0,4	3,6 ± 0,7	3,7 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1

Em todos os casos os valores de P_O^I e P_A^I obtidos são maiores que a unidade o que indica que a energia libre de Gibbs para a transferência vários AOs entre a regiões aquosa e oleosa para a interfacial é negativa, o que significa que os AO tem uma tendência natural a estarem localizados na região interfacial.

O valor de P_A^I aumenta com o aumento da cadeia hidrofóbica dos AO, o que implica que a solubilidade em água diminui. A partir do derivado CGA8, os antioxidantes passam a estar distribuídos apenas entre as regiões interfacial e oleosa, pelo que apresentam apenas uma constante de partição, P_O^I . Os valores de P_O^I aumentam até ao C12 (P_O^I = 23,86) diminuindo para o derivado CGA16 (P_O^I = 20,98), o que reflete um aumento da solubilidade no óleo.

Os valores de k_I são independentes do aumento da hidrofobicidade dos antioxidantes, demonstrando que o mecanismo de reação é idêntico para todos os antioxidantes uma vez que os valores obtidos para a constante k_I são bastante similares.

A partir dos valores das constantes de partição, obteve-se a percentagem de antioxidante em cada uma das regiões para uma emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65), para cada valor de Φ_I, *Figura 132*.

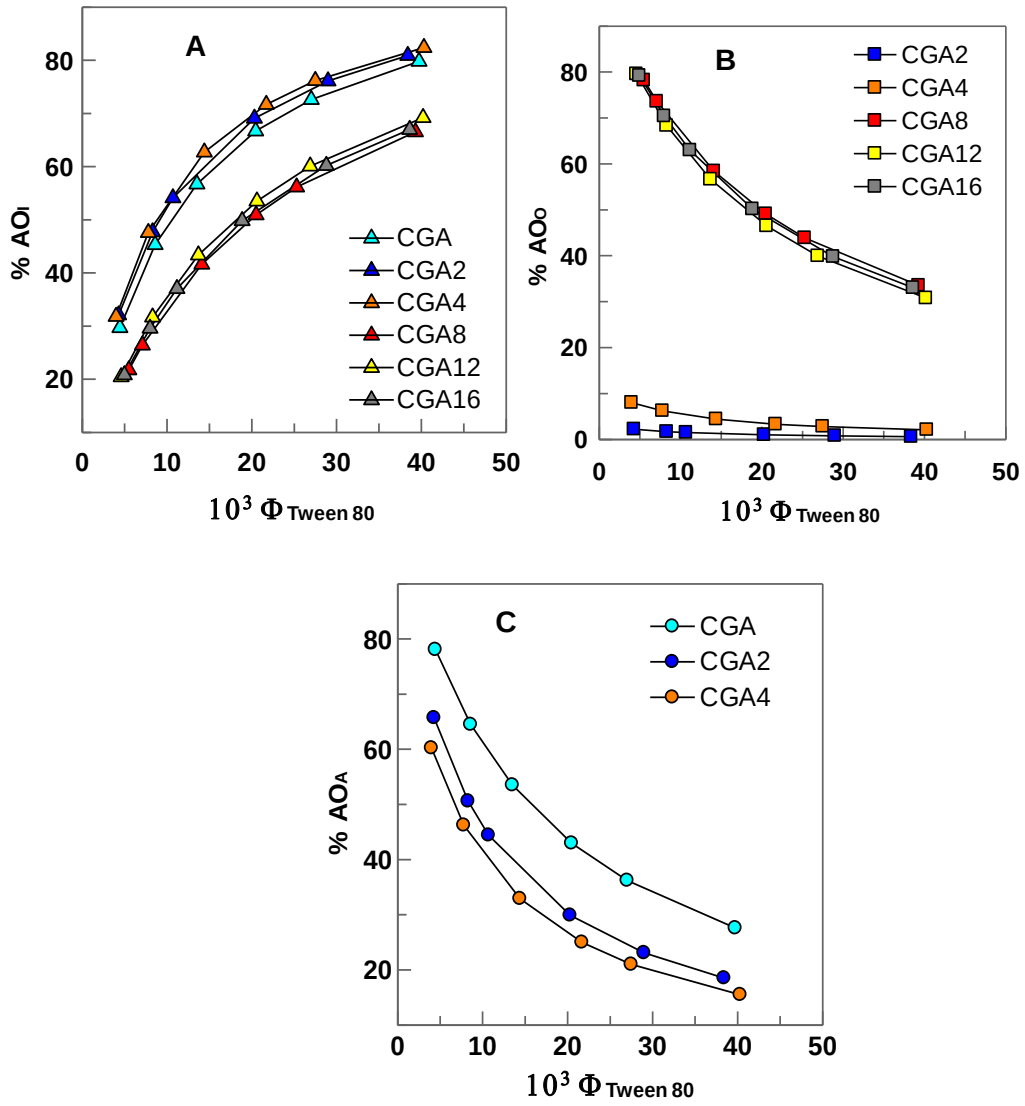


Figura 132 - Variação da percentagem do ácido clorogénico e seus derivados na região interfacial (A), na região oleosa (B) e na região aquosa (C), da emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) , em função da fração de emulsionante Tween 80.

Pela análise da *Figura 132,* observou-se que todos os antioxidantes se encontravam na região interfacial numa percentagem entre 20 e 33% para uma fração de emulsionante de Φ_I =0,005. Estes valores são relativamente baixos quando comparados com as outras séries de AOs descritos nos capítulos anteriores (40-60% para os ésteres do HT e 57-70% para os galatos).

O CGA distribui-se apenas na região aquosa e interfacial, sendo insolúvel no óleo, aumentando a cadeia alquílica, aumentamos a solubilidade em óleo, mas apenas a partir de 8 carbonos é que os clorogenatos se distribuem apenas na região oleosa e interfacial, deixando de mostrar solubilidade em água.

Assim, para a fração de emulsionante mais baixa Φ_l =0,005, o CGA e os derivados CGA2 e CGA4 encontra-se na região interfacial em cerca de 20 % aumentando para cerca de 60 % para a fração de emulsionante mais alta Φ_l =0,04. Já os ésteres mais lipofílicos encontram-se na região interfacial aproximadamente em 30 % para Φ_l =0,005, aumentando esta percentagem para 75-80% para a fração de emulsionante mais alta, Φ_l =0,04.

Verifica-se assim, novamente que a fração de emulsionante exerce uma influência significativa sobre a fração de antioxidante que se encontra em cada fase. Quanto maior for Φ_l, maior é a percentagem de antioxidante na região interfacial.

Os resultados mostram que para qualquer valor de Φ_l a %AO na região interfacial não se correlaciona com a hidrofobicidade dos antioxidantes, sendo a ordem observada : %CGA8=CGA12=CGA16<CGA<CGA2<CGA4 (*Figura 133*). Verifica-se então, que o AO que está em maior percentagem na região interfacial em emulsões O/A (4:6) para qualquer fração de emulsionante é o CGA4.

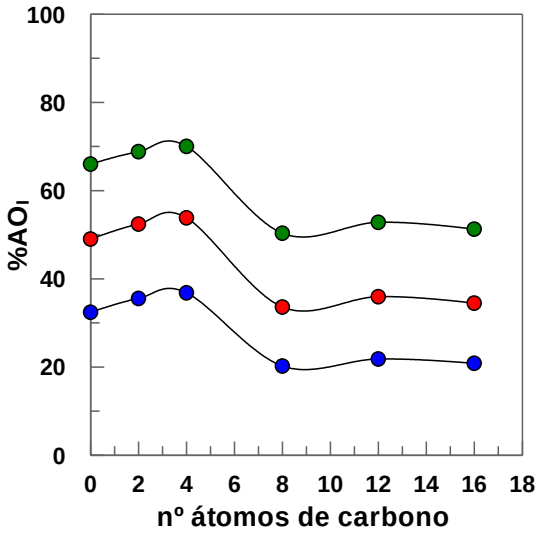


Figura 133 - Variação da percentagem de AO na região interfacial de emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65 / Tween 80) em função do tamanho da cadeia alquílica dos compostos, para a fração de emulsionante de Φ_l = 0,005 (azul), Φ_l = 0,01 (vermelho) e Φ_l = 0,02 (verde).

4.2. Concentrações efetivas do ácido clorogénico e seus derivados em cada região da emulsão

Na *Figura 134* encontra-se a variação das concentrações de AO na região interfacial, oleosa e aquosa em função da fração de emulsionante, Φ_l, para uma emulsão 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65.

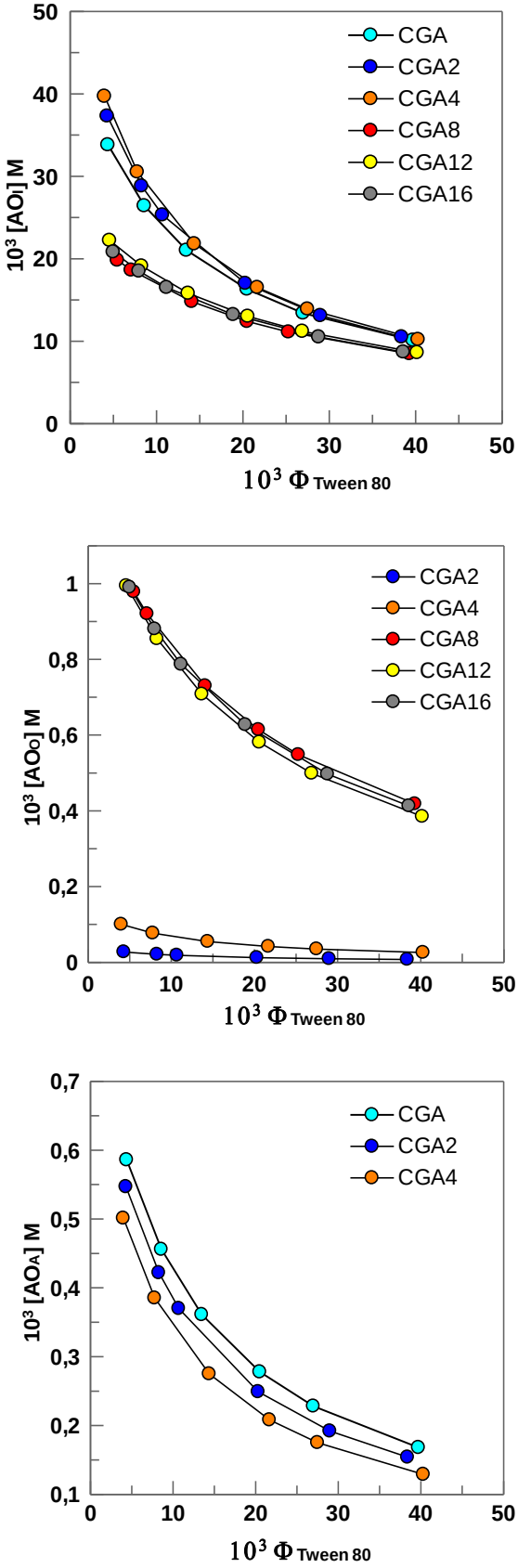


Figura 134 - Variação da concentração efetiva nas 3 regiões da emulsão 4:6 ((v/v, óleo de peixe/tampão citrato), com a fração de emulsionante, $[AO_T]$= 0,5 m M.

Pela observação das concentrações de AO na região interfacial (*Figura 134*), verificou-se que para qualquer valor de Φ_I, a concentração efetiva dos AOs na região interfacial é maior, num fator de 17-75 vezes, do que a concentração estequiométrica ($[AO_T]$ = 5, 00×10^{-4} M). Esta concentração efetiva nas emulsões 4:6 para a série dos clorogenatos é cerca de 1/3 e cerca de metade da concentração efetiva encontrada para as séries do HT e do AG respetivamente. Assim esta série de AO apresentou no geral menos afinidade para a região interfacial. Para qualquer Φ_I, a concentração efetiva de CGA na região aquosa é 1 a 3 vezes menor do que a concentração estequiométrica. A concentração efetiva na região oleosa é menor de 5 a 20 vezes do que a concentração estequiométrica no caso do CGA2 e do CGA4.

Para os compostos mais lipofílicos (CG8, CGA12 e CGA16), a concentração efetiva no óleo é maior cerca de 1-2 vezes para as frações de emulsionante mais baixa (Φ_I = 0,005- Φ_I = 0,02) e menor cerca de 1,2 vezes para as frações mais altas Φ_I = 0,03 a Φ_I = 0,04. Verifica-se também que com o aumento da fração de emulsionante, a concentração de AO em cada uma das regiões diminui para todos os compostos.

Uma diminuição da $\%AO_A$ e da % AOo leva a uma diminuição da concentração efetiva dos AOs nessas regiões. No entanto um aumento da % AO_I com o aumento da fração de emulsionante não implica um aumento na concentração dos AOs na região interfacial $[AO_I]$, mas sim uma diminuição, da concentração efetiva causada pelo aumento do volume de emulsionante como já referido anteriormente. Verificou-se assim, que a concentração efetiva dos AOs na região interfacial é maior para a fração de emulsionante de 0,005, ocorrendo uma diluição significativa de 1,5 a 4 vezes dos AOs nesta região com o aumento da fração de emulsionante.

Na *Figura 135*, mostra-se a variação da concentração efetiva dos AO na região interfacial dos AO, (A) em função do tamanho da cadeia alquílica dos AOs em emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato) para três concentrações de emulsionante, (B) em função do número de átomos de carbono para uma fração de emulsionante de 0,005 para cinco razões O/A.

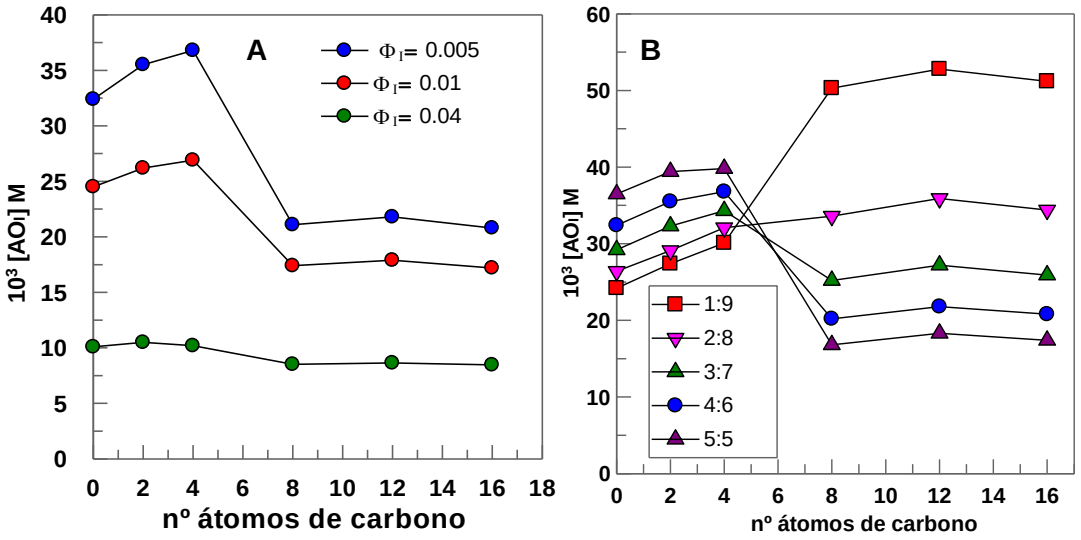


Figura 135 – (A) Variação da concentração efetiva na região interfacial de emulsões 4:6 O/A, em função da cadeia alquílica dos compostos, para 3 frações de emulsionante, (B) Variação da concentração efetiva para diferentes razões O/A em função do número de átomos de carbono da cadeia alquílica, para uma fração de emulsionante de Φ_I =0,005, [AO$_T$]= 0,5 m M.

Os resultados mostram que a variação da concentração de AO na região interfacial em função do número de átomos de carbono na cadeia alquílica é mais percetível para frações de emulsionante mais baixas (Φ_I = 0,005) do que para frações de emulsionante mais altas (Φ_I = 0,04), onde se encontram todos com uma concentração semelhante de ~ 10 mM. Podemos verificar que a concentração na região interfacial aumenta até ao derivado CGA4 diminuindo abruptamente para o CGA8, ficando depois praticamente constante até ao CGA16, para a fração de emulsionante mais baixa (Φ_I = 0,005).

A *Figura 135 (B*), mostra o efeito complexo que a relação óleo/água usada na preparação das emulsões tem na concentração dos AOs na região interfacial. A um valor constante de Φ_I = 0,005 (a fração de emulsionante mais baixa), concentração de AO na região interfacial depende da hidrofobicidade do AO. Verifica-se que a concentração interfacial dos AOs hidrofílicos aumenta com o aumento da razão O/A, (ou seja, com a diminuição da região aquosa) e que a concentração dos AO mais hidrofóbicos diminui. Por exemplo, para uma concentração estequiométrica [AO$_T$] = 0,5 mM, o [CGA$_I$] aumenta de ~ 25 mM para ~ 53 mM , mas a concentração efetiva para o CGA12 [CGA12$_I$] diminuiu de ~ 53 mM para ~ 17,0 mM, quando se altera a relação O/A de 1:9 para 5:5. Verificou-se que alterando a razão O/A, alteramos a concentração relativa dos AOs, sendo que para a emulsão com a razão O/A 1:9 o composto com maior concentração na região interfacial é o CGA12 (~ 53 mM) mas para as emulsões com a razão O/A de 2:8, 3:7, 4:6 e 5:5, o composto que apresenta maior concentração na região interfacial é o CGA4. Estes

resultados demonstram que alterando a relação O/A, pode-se modular significativamente as concentrações dos AO na região interfacial, bem como alterar a ordem relativa da concentração dos antioxidantes na região interfacial. Um aumento na relação O/A favorece a incorporação dos AOs hidrofílicos na região interfacial das emulsões, mas diminui a incorporação de AOs hidrofóbicos.

5. Distribuição do ácido clorogénico e seus derivados em nanoemulsões

5.1. Constantes de partição do ácido clorogénico e seus derivados em nanoemulsões

Os valores das constantes de velocidade observadas, k_{obs}, foram obtidos para a reação dos iões 16-ArN_2^+ com CGA e seus ésteres em nanoemulsões 1: 9 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65 / Tween 80), variando a fração de emulsionante (Φ_I) de Φ_I = 0,005 a Φ_I = 0,04. A *Figura 136* mostra um exemplo representativo de uma cinética típica para o clorogenato de etilo e para o clorogenato de octilo. Em todos os casos, os pares de dados de absorvância do corante azóico formado / tempo ajustaram-se perfeitamente à equação integrada de ordem um, cujo declive fornecem os valores de k_{obs}.

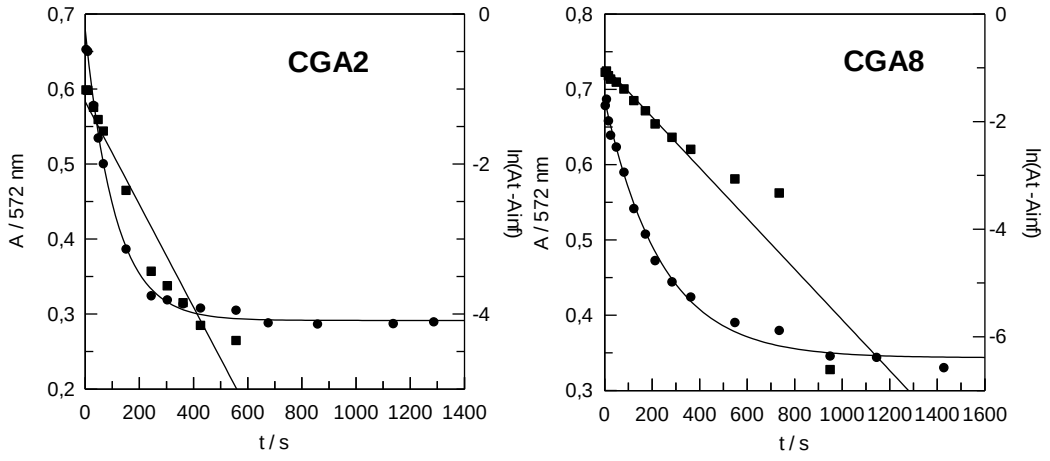


Figura 136 - Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln [A_t-A_{inf}] vs tempo, para CGA2 e CGA8 Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65/ Tween 80), Φ_I=0,00799 CGA2 e Φ_I=0,0300 CGA8, [16-ArN_2^+] = 2,90× $10^{-4}M$, [AO] = 2,0× $10^{-3}M$, [NED] =0,019 M e *T*= 25ºC.

Pela análise dos dados k_{obs} em função de Φ_I, determinou-se as constantes de partição do CGA e dos seus derivados em nanoemulsões 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato), ajustando estes dados as *equações 48* e *49* (*Figura 137*), as *equações 31* e *32* (*Figura 138*) e as *equações 41* e *42* (*Figura 139*), do modelo cinético da pseudofase.

A variação de k_{obs} em função Φ_I para o CGA (*Figura 137*), e para os clorogenatos de etilo e butilo e para os clorogenatos de octilo dodecilo e hexadecilo, pode ser observada nas *Figuras 138 e 139* respetivamente. Em todos os casos, observou-se diminuição de k_{obs} num fator de 3-4 vezes com o aumento de Φ_I = 0,005 para Φ_I = 0,04.

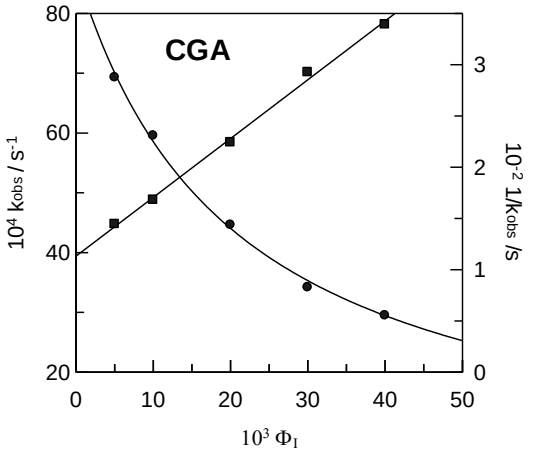


Figura 137 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 48* e *49* para o CGA. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90× $10^{-4}M$, [AO] = 4,0× $10^{-3}M$, [NED] =0,019 M e *T*= 25ºC.

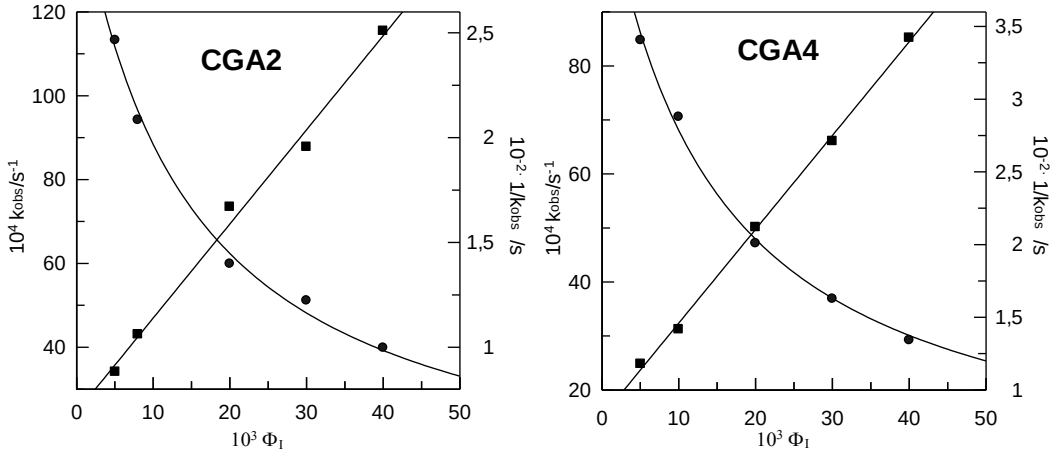


Figura 138 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 31* e *32* para os derivados do CGA2 e CGA4. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90× $10^{-4}M$, [AO] = 2,0× $10^{-3}M$, [NED] =0,019 M e *T*= 25ºC.

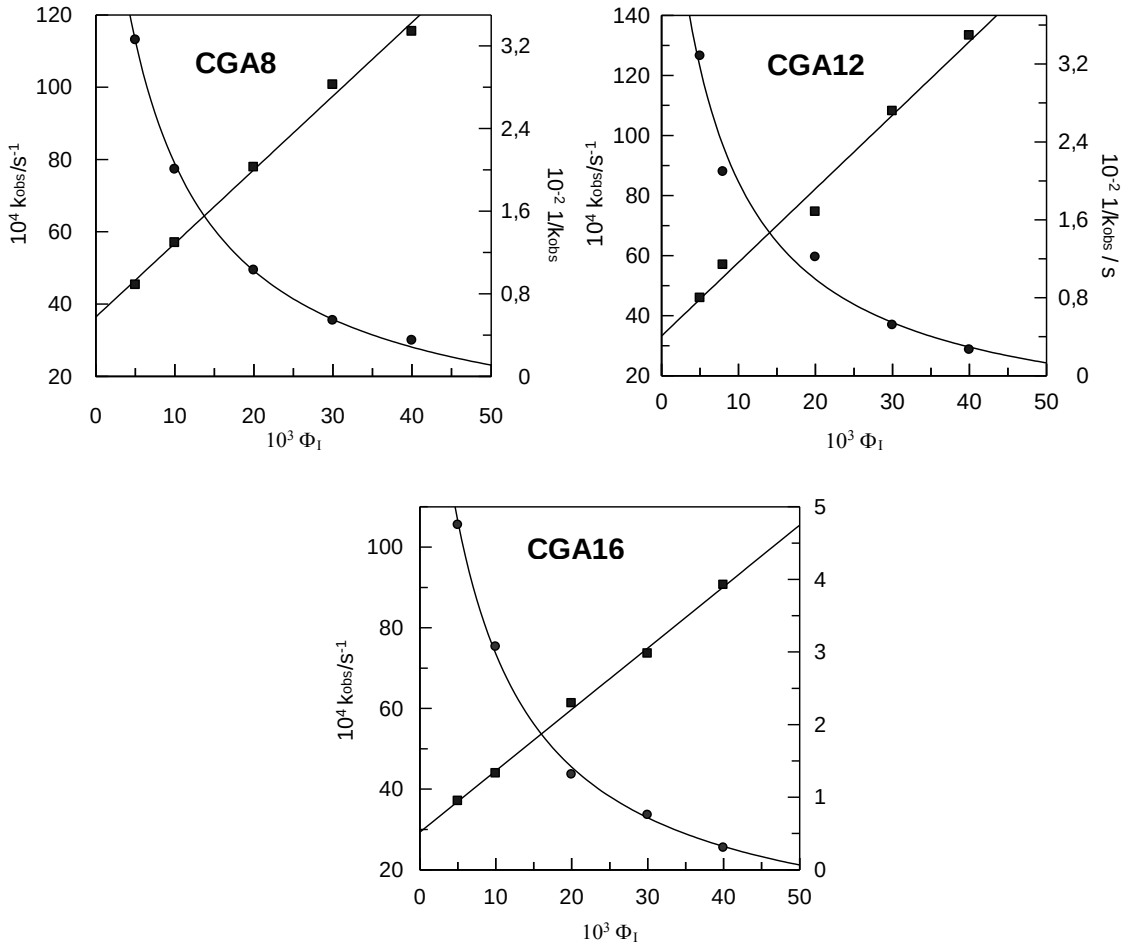


Figura 139 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 41* e *42*, para o CGA8,CGA12 e CGA16. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =2,90× $10^{-4}M$, [AO] = 2,0× $10^{-3}M$, [NED] =0,019 M e *T*= 25ºC.

Na *Tabela 32* encontram-se os valores das contantes de partição, P_A^I, P_O^I e os valores de k_I, dos vários compostos estudados.

Tabela 32 - Sumário dos valores das constantes de partição P_O^I, P_A^I e k_I, obtidas para o ácido clorogénico e seus deriavdos.

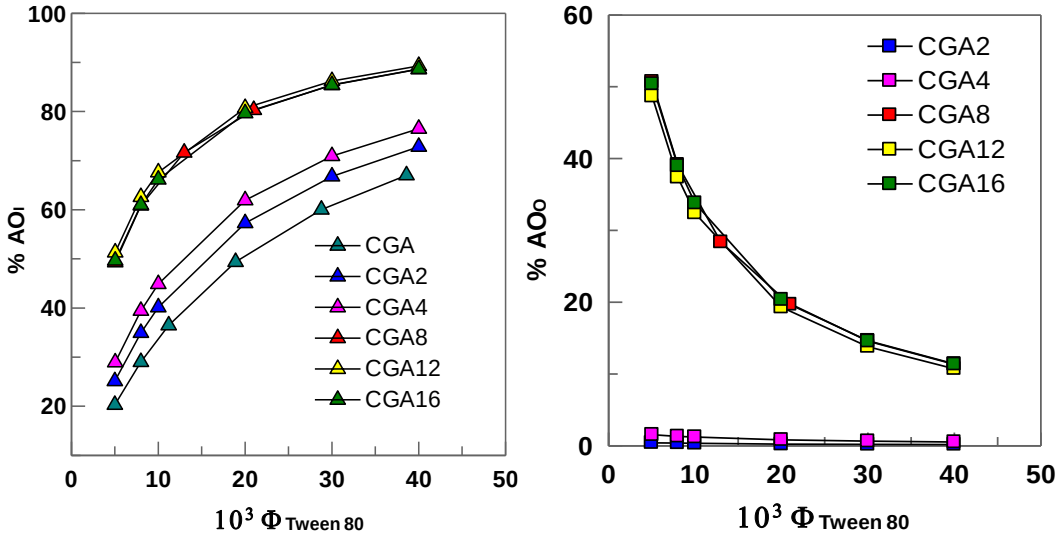
	CGA	**CGA2**	**CGA4**	**CGA8**	**CGA12**	**CGA16**
P_A^I	46 ± 3	60 ± 8	74 ± 5	----	----	----
P_O^I	----	1195 ± 166	369 ± 26	19 ±1	21 ± 8	20 ± 2
10^2 k_I (M-1s-1)	4,4 ± 0,1	5,5 ± 1,2	7,7 ± 0,9	6,8 ± 0,1	7,2 ± 0,1	6,4 ± 0,1

Em todos os casos os valores de P_O^I e P_A^I obtidos são maiores que a unidade o que indica que a energia libre de Gibbs para a transferência dos mesmos entre a regiões aquosa e oleosa para a interfacial é negativa, significando que os AO tem uma tendência natural a estarem localizados na região interfacial.

O valor de P_A^I aumenta com o aumento da cadeia hidrofóbica dos AO, o que implica que a solubilidade em água diminui. Por outro lado, os valores de P_O^I diminuem quando aumentamos o número de átomos de carbono da cadeia alquílica, o que reflete o aumento da solubilidade no óleo.

Os valores de k_I são independentes do aumento da hidrofobicidade dos antioxidantes.

A partir dos valores das constantes de partição, calculou-se a percentagem de antioxidante em cada uma das regiões da nanoemulsão 1:9 de óleo de peixe/tampão citrato, para cada valor de Φ_I, *Figura 140*.



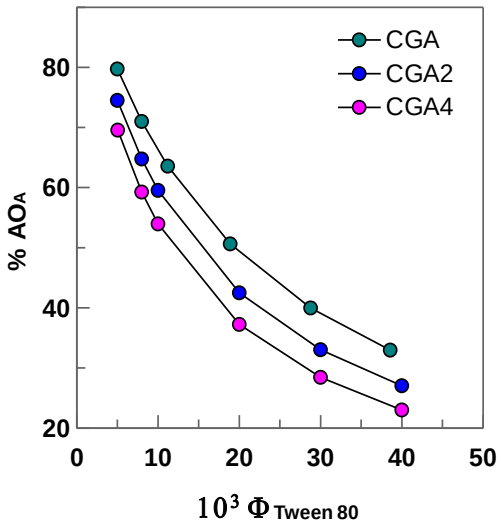


Figura 140 - Variação da percentagem do ácido clorogénico e seus derivados numa nanoemulsão 1:9 óleo de peixe/tampão citrato, (A) na região interfacial, (B) na região oleosa e (C) na região aquosa.

Pela análise da *Figura 140,* podemos observar que o todos os antioxidantes se encontram na região interfacial numa percentagem entre 20% e 50%. Observa-se deste modo que a percentagem na região interfacial desta série de AOs derivada do CGA encontra-se em muito menor quantidade que as séries dos ésteres do HT e do AG (40-85% e 52-90% respetivamente) anteriormente estudados confirmando a menor afinidade deste composto para região interfacial.

A percentagem de AO na região interfacial aumenta com o aumento da fração de emulsionante, verificando-se uma diminuição do AO na fase aquosa e oleosa, tal como verificado para as emulsões. Os compostos mais lipofílicos encontram-se praticamente na mesma percentagem na região interfacial, cerca de 40% para Φ_I=0,005, aumentando para ~ 80% com o aumento da fração de emulsionante para Φ_I=0,04.

Os resultados mostram que para qualquer valor de Φ_I a % AO na região interfacial para os clorogenatos não se correlacionam com a hidrofobicidade dos antioxidantes, sendo a ordem observada : CGA<CGA2<CGA4<CGA8=CGA16=CGA12 (*Figura 141*).

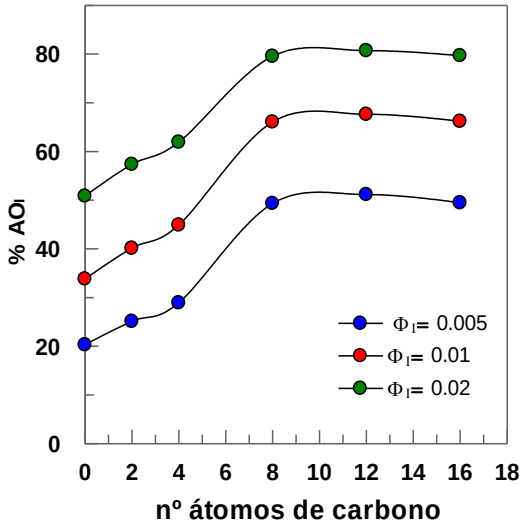
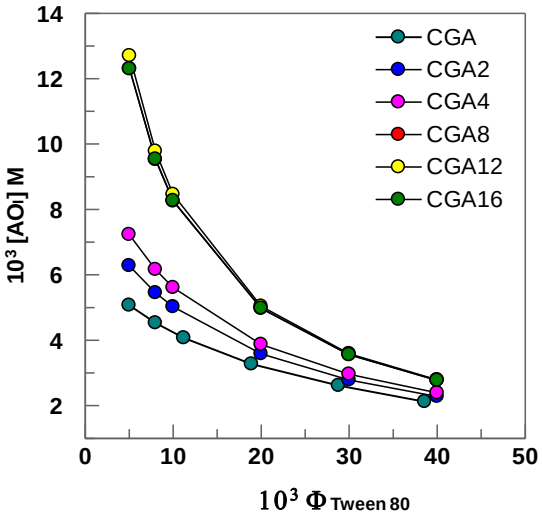


Figura 141 - Variação da percentagem de AO na região interfacial com o número de átomos de carbono. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato), fração de emulsionante, Φ_I = 0,005, Φ_I = 0,01 e Φ_I = 0,02.

5.2. Concentrações efetivas do ácido clorogénico e seus derivados em cada região da nanoemulsão O/A

Na *Figura 142* encontra-se a variação das concentrações dos AOs na região interfacial, oleosa e aquosa em função da fração de emulsionante, Φ_I, para uma nanoemulsão 1:9 óleo de peixe/tampão citrato.



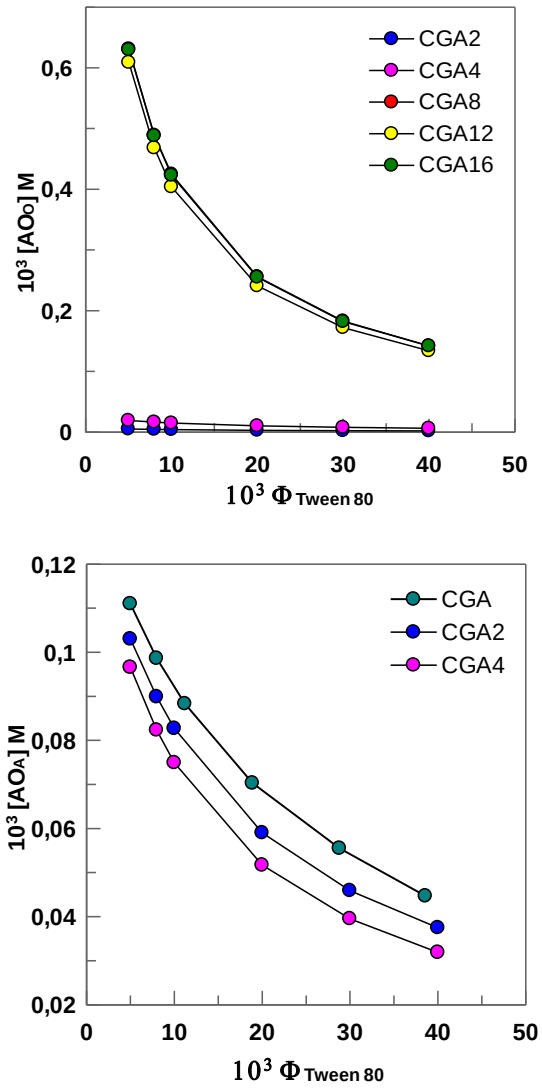


Figura 142 - Variação da concentração efetiva nas 3 regiões da nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato), com a fração de emulsionante, $[AO_T]$ = 0,125 mM.

Observando a *Figura 142*, verificou-se que para qualquer valor de Φ_I, a concentração efetiva dos AOs na região da interfacial é muito maior, num fator de 17-95 vezes, do que a concentração estequiométrica ($[AO_T]=1{,}25\times10^{-4}$ M). No entanto, as concentrações efetivas encontradas para a série dos clorogenatos no geral são cerca de metade daquelas obtidas para as outras séries de AOs (20-170 vezes e a 20-190 vezes maiores que a concentração estequiométrica para os ésteres do HT e para os galatos respetivamente).

A concentração efetiva dos derivados CGA2 e CGA4 mostrou ser menor cerca de 7-27 vezes no óleo e cerca de 1-3 vezes na água do que a concentração estequiométrica. Já os compostos mais lipofílicos, apresentam uma concentração efetiva no óleo maior cerca de 1 a 5 vezes do que a concentração estequiométrica. Verificou-se também que

com o aumento da fração de emulsionante a concentração de AO em cada uma das regiões diminui.

Na *Figura 143*, mostra-se a variação da concentração efetiva na região interfacial com a hidrofobicidade dos AO para três concentrações de emulsionante (A), e o efeito da razão óleo/água na distribuição dos AOs (B).

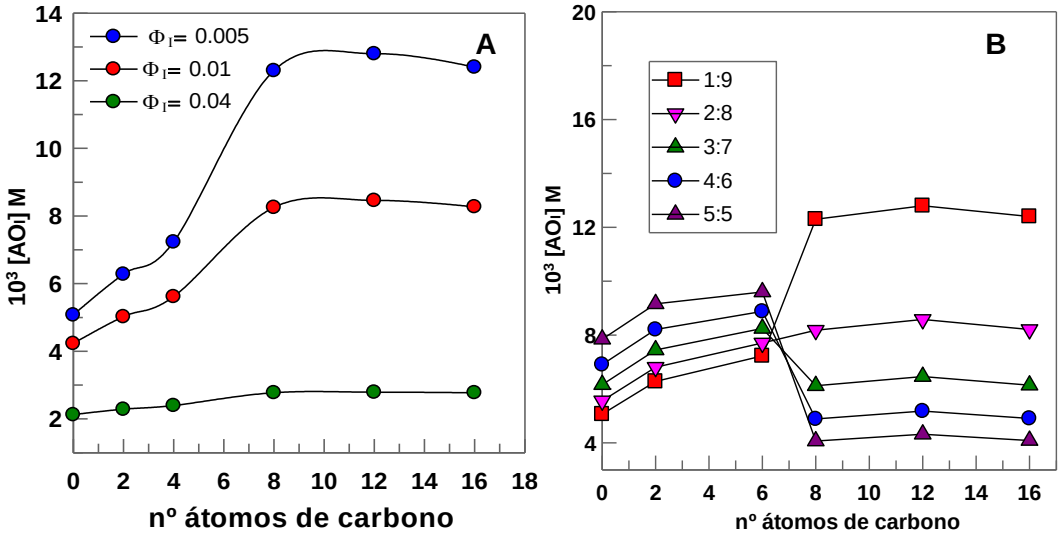


Figura 143 - Variação da concentração efetiva de AO na região interfacial com o número de átomos de carbono. Condições experimentais: nanoemulsão 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato), para as frações de emulsionante de Φ_I = 0,005, Φ_I = 0,01 e Φ_I = 0,02, [AO_T] = 0,125 mM.

Através da *Figura 143*, verificou-se que a variação da concentração de AO na região interfacial para frações de emulsionante mais altas (Φ_I =0,04), são praticamente iguais. Isto é consequência da incorporação dos AO na região interfacial com o aumento da fração de emulsionante.

6. Análise comparativa da distribuição dos antioxidantes em emulsões e nanoemulsões O/A

Analisando em conjunto os resultados obtidos para as emulsões e nanoemulsões, é possível analisar se o tamanho da gota interfere na distribuição dos AOs.

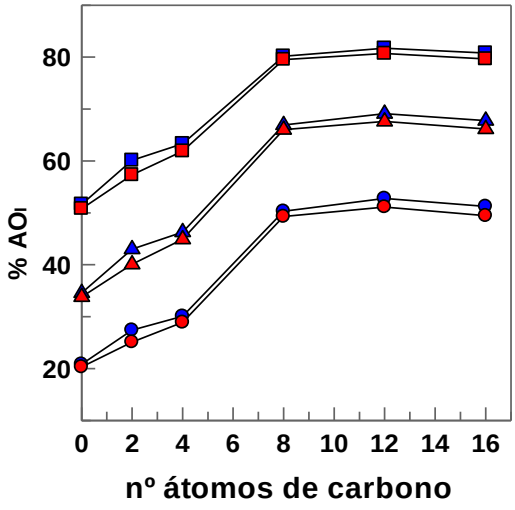
Uma análise comparativa das constantes de partição verifica-se que são muito semelhantes, apresentam diferenças inferiores a 11%, pelo que o tamanho da gota

aparentemente não altera a distribuição dos AO (*Tabela 33*), pelo menos significativamente.

Tabela 33 – Valores das constantes de partição P_O^I, P_A^I e a constante de velocidade na região interfacial k_I, em emulsões e nanoemulsões O/A, para o ácido clorogénico e seus derivados.

		CGA	CGA2	CGA4	CGA8	CGA12	CGA16
Emulsão	P_A^I	47 ± 3	67 ± 5	78 ± 9	---	---	---
	P_O^I	---	1344 ± 94	390 ± 44	21 ± 7	22 ± 3	21 ± 5
	10^2 k_I ($M^{-1}s^{-1}$)	1,9 ± ,07	2,8 ± 0,4	3,6 ± 0,7	3,7 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,5 ± 0,1
Nanoemulsão	P_A^I	46 ± 3	60 ± 8	74 ± 5	----	----	----
	P_O^I	----	1195 ± 166	369 ± 26	19 ±1	21 ± 8	20 ± 2
	10^2 k_I ($M^{-1}s^{-1}$)	4,4 ± 0,1	5,5 ± 1,2	7,7 ± 0,9	6,8 ± 0,1	7,2 ± 0,1	6,4 ± 0,1

Por outro lado, uma análise comparativa da distribuição, calculada a partir das constantes de partição nos dois sistemas emulsionados, mostra que as constantes de partição para ambos os sistemas emulsionados dependem da natureza do AO e da fração de emulsionante utilizada, *Figura 144.*



Emulsões: -●- Φi =0,005; -■- Φi =0,01; -▲- Φi =0,02: Emulsões: -●- Φi =0,005; -■- Φi =0,01; -▲- ,Φi =0,02

Figura 144 – Comparação da distribuição em emulsões 1:9 O/A e nanoemulsões 1:9 O/A, para três frações de emulsionante Tween 80, em função do número de átomos de carbono da cadeia alquílica.

7. Avaliação da atividade antioxidante em sistemas emulsionados e correlação com a sua distribuição

7.1. Atividade antioxidante do ácido clorogénico e seus derivados em emulsões O/A

Estudou-se a atividade antioxidante do ácido clorogénico e dos seus derivados em emulsões 4:6 formadas por óleo de peixe e tampão citrato (0,04 M, pH= 3,65), com 0,5 %, 1% e 2% de Tween 80 e contendo 0,5 mM de cada um dos antioxidantes. Para tal, submeteram-se as emulsões ao teste da estufa de Schaal a uma temperatura de 40 ºC. Estas experiências realizaram-se em triplicado.

A *Figura 145*, representa o tempo que o conteúdo em dienos conjugados das emulsões contendo cada um dos AOs e 0,5 , 1 e 2% de emulsionante, demorou a alcançar o valor de 0,5 %.

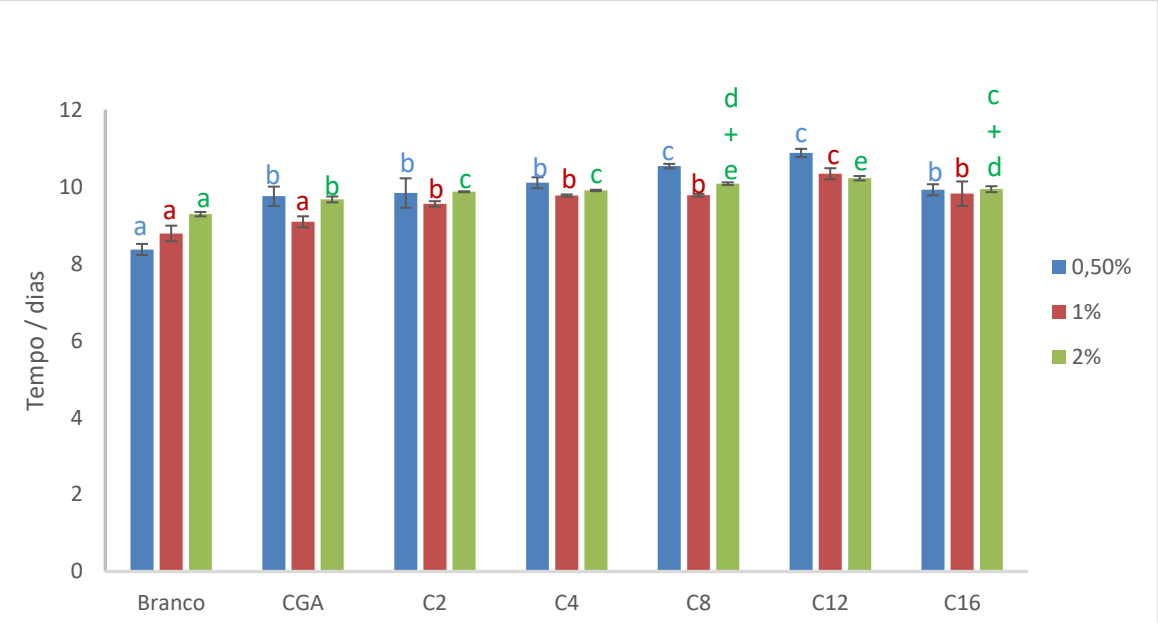


Figura 145 - Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0.5 %, 1% e 2% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: emulsões 4:6 (óleo de peixe/Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,65/ Tween 80), [AO_T] = 0,5mM.

Verificou-se que os compostos testados apresentavam atividade antioxidante muito baixa e estatisticamente muito semelhante ($p<0,05$), havendo apenas um pequeno aumento do CGA para o CGA12, a partir do qual voltou a diminuir, no caso das emulsões contendo 0,5 e 1% de emulsionante. Assim, a introdução da cadeia alquílica da estrutura do CGA não melhorou substancialmente a atividade antioxidante deste composto em sistemas emulsionados.

7.1.1. Correlação da distribuição com a eficácia antioxidante em emulsões O/A

A reatividade do CGA e seus derivados frente ao radical de DPPH é muito similar, o que significa que a modificação da cadeia hidrocarbonada não afeta significativamente a eficácia antioxidante, deste modo um aumento da eficácia antioxidante vai depender da sua localização no meio emulsionado. Podemos também verificar que existe uma similaridade entre os valores de $k_{I,}$ da reação entre o CGA e derivados com os iões $16ArN_2^+$, o que nos indica que o grupo reativo dos AO se encontra num meio reacional muito semelhante.

De modo, a verificar se existe algum tipo de relação entre a eficácia antioxidante e as concentrações efetivas dos vários AOs nas diferentes regiões das emulsões, comparou-se a eficácia antioxidante com a percentagem de AO na região interfacial e com a sua concentração efetiva na dada região, *Figura 146*.

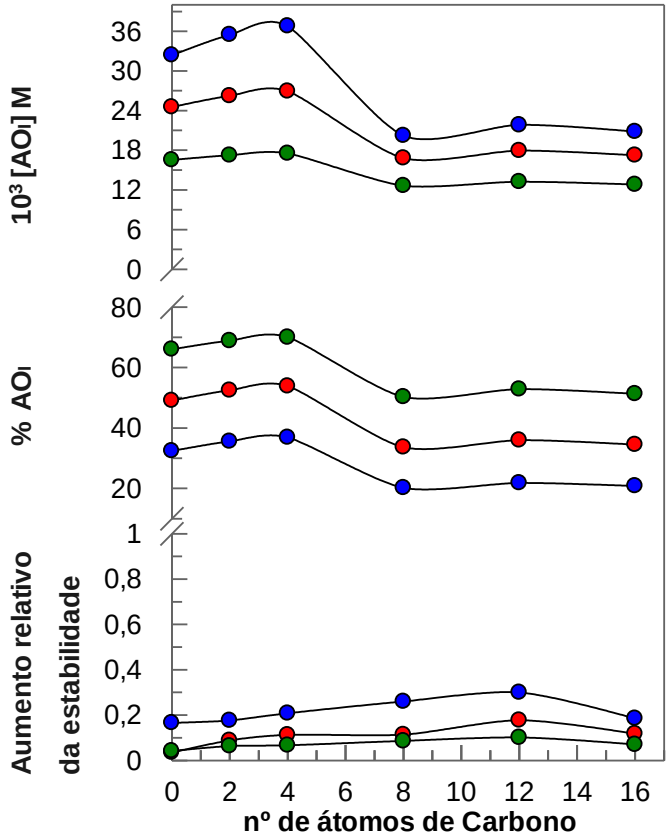


Figura 146 – Variação do tempo necessário para alcançar 0.5% do conteúdo em dienos conjugados, a percentagem de AO na região interfacial e a concentração efetiva de AO na região interfacial com o número de átomos de carbono, para 3 percentagens de emulsionante (-●- Φ_I =0,005: -●- Φ_I =0,01; -●- Φ_I =0,02), em emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65 / Tween 80), [AO_T] = 0,5mM.

Verificou-se já anteriormente que estes compostos apresentam um perfil de distribuição um pouco diferente do que foi encontrado para os AOs derivados do AG e do HT. De facto, parece existir dois grupos distintos de compostos; um grupo com carácter hidrofílico acentuado, o CGA, CGA2 e CGA4, com concentrações interfaciais muito próximas, e um grupo com forte carácter hidrofóbico, igualmente com concentrações interfaciais bastante semelhantes. Em sistemas emulsionados com relação O/A de 4:6, e devido ao alto carácter hidrofóbico do 2º grupo, e a diminuição do volume da região aquosa, os AOs que se encontram em maior percentagem na região interfacial são os AOs mais hidrofílicos. Deste modo, esperar-se-ia uma melhor atividade antioxidante por parte destes. No entanto o que se verificou foi uma baixa atividade antioxidante por parte de todos os AOs causada, por um lado, pela elevada quantidade dos AOs mais hidrofílicos na região aquosa das emulsões que, não só exercem qualquer atividade antioxidante nesta região como podem exercer alguma atividade pró-oxidante, e por outro lado devido à baixa concentração dos AOs mais lipofílicos na região interfacial. De notar que os AOs

mais lipofílicos desta série encontram-se em muito melhor concentração na zona interfacial que os AOs da série do AG e do HT como referido anteriormente no *ponto 4.2*.

7.2. Atividade antioxidante do ácido clorogénico e seus derivados em nanoemulsões O/A

Tal como para as emulsões estudou-se a atividade antioxidante do ácido clorogénico e dos seus derivados em nanoemulsões formadas por óleo de peixe e tampão citrato (0,04 M, pH= 3,65), com 0,5 %, 1% e 2% de Tween 80 e contendo 0,125mM de cada um dos antioxidantes. Para tal, submeteram-se as emulsões ao teste da estufa de Schaal a uma temperatura de 40 ºC. Estas experiências realizaram-se em triplicado.

A *Figura 147*, representa o tempo que o conteúdo em dienos conjugados das nanoemulsões 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato) contendo vários AOs e 0,5, 1 e 2% de emulsionante, demorou a alcançar o valor de 0,5 % , para 0,5 %, 1% e 2% de emulsionante Tween 80.

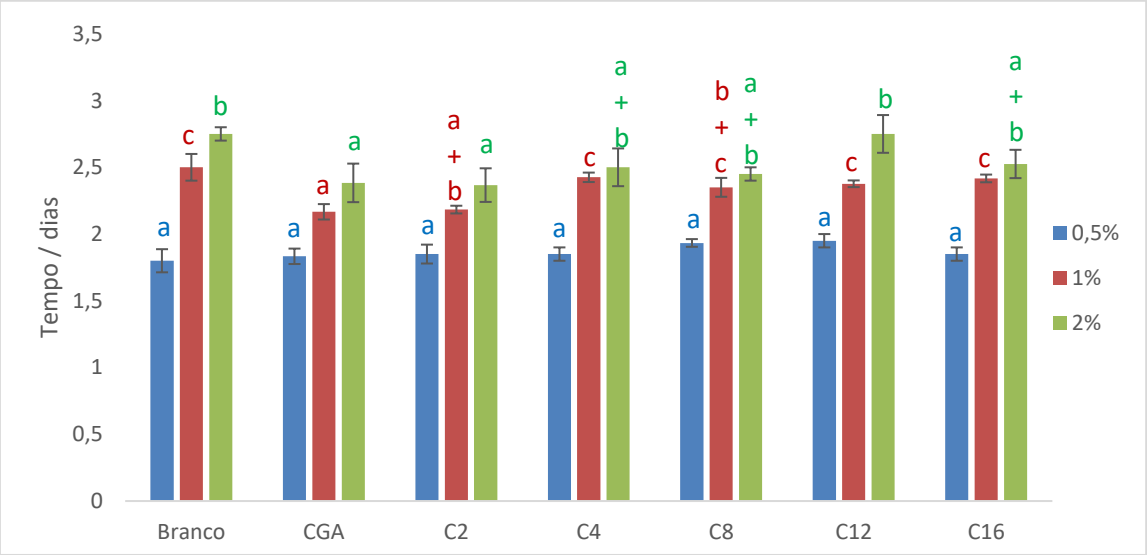


Figura 147 - Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0.5 %, 1% e 2% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: nanoemulsões 1:9 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,65/ Tween 80), $[AO_T]$ = 0,125 mM.

De notar que variando a percentagem de Tween 80 verificou-se uma diferença estatisticamente significativa na estabilidade oxidativa das nanoemulsões na ausência de antioxidante como já anteriormente observado durante o teste da estufa de Schaal efetuada com nanoemulsões para a série do AG e do HT.

Neste teste, não se verificou qualquer atividade antioxidante por parte dos composto, podendo-se inclusivamente afirmar que em alguns casos ocorreram efeitos pró-oxidantes como no caso do CGA e do CGA2 em nanoemulsões contendo 0,5 % de emulsionante. No geral, a estabilidade das emulsões aumentou apenas com o aumento da percentagem de emulsionante, como observado para o caso das nanoemulsões sem AO.

7.2.1. Correlação da distribuição com a eficácia antioxidante em nanoemulsões O/A

Na *Figura 148* encontra-se representado, o aumento ou a diminuição da estabilidade relativa das nanoemulsões, a percentagem de AO na região interfacial e a concentração efetiva na região interfacial em função do número de átomos de carbono da cadeia alquílica dos clorogenatos.

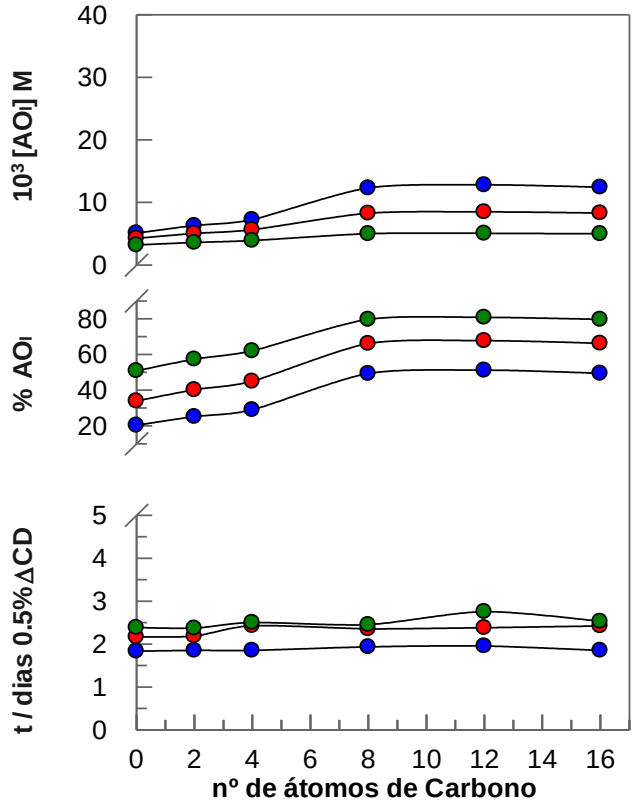


Figura 148 - Variação do tempo necessário para alcançar 0.5% do conteúdo em dienos conjugados, a percentagem de AO na interface e a concentração efetiva de AO na interface com o número de átomos de carbono, para 3 percentagens de emulsionante (-●- Φ_I =0,005: -●- Φ_I =0,01; -●- Φ_I =0,02), [AO_T] = 0,125 mM.

Como referido no ponto anterior, não se observou qualquer atividade antioxidante por parte do CGA ou seus clorogenatos. Uma vez que estes compostos ou são muito

hidrofílicos (CGA, CGA2 e CGA4) ou muito lipofílicos (CGA8, CGA12 e CGA16), as concentrações efetivas encontradas na região interfacial são muito baixas quando comparadas com as concentrações encontradas para as outras séries de compostos pelo que estas não foram suficientes para inibir as reações de oxidação

Em sistemas contendo óleos com um conteúdo em ácido gordos ómega-3 muito elevado e, por conseguinte, com um número de hidrogénios bis-alílicos na sua estrutura igualmente muito elevado, a facilidade com que se formam radicais livres é grande, pelo que se formam um grande número de radicais livres. Por outro lado, estes radicais livres ao formarem-se, deslocam-se para a região interfacial onde podem atingir concentrações elevadas causadas pelo reduzido volume desta região. Deste modo, concentrações mais baixas de AO nesta região poderão não ser suficientes para a neutralização de todos os radicais que aí se acumulam e por esse motivo não apresentaram atividade antioxidante. De notar que mesmo os AOs mais lipofílicos apresentam concentrações efetivas interfaciais menores que o AG ou o HT que também não mostraram ter grande atividade antioxidante.

No caso dos AO mais hidrofílicos, o efeito pró-oxidante encontrado parece correlacionar com a concentração dos AOs na região aquosa. Por um lado, os AO dissolvidos na região aquosa não entram em contacto com os radicais livres que se formaram na região oleosa, pelo que não podem atuar como AO e, por outro lado, podem exercer algum efeito pró-oxidante pela sua interação com vestígios de metais existentes na região aquosa. De facto, a redução de metais pelos AOs leva a formação de espécies metálicas que catalisam mais eficazmente a degradação de hidroperóxidos e a sua formação de radicais livres.

De notar que as concentrações interfaciais destes AOs neste sistema é bastante menor quando comparado com as concentrações interfaciais encontradas nas emulsões onde já não se verificou uma grande atividade antioxidante por parte deste compostos. Assim seria de esperar que neste sistema também não fosse observada uma grande atividade antioxidante.

Capítulo 5 – Ácido Cafeico e derivados



O ácido cafeico apresenta propriedades antioxidantes (quer in vitro, quer in vivo), bem como propriedades imunomoduladoras e anti-inflamatórias. Devido á sua elevada solubilidade em água a sua eficácia em sistemas emulsionados fica comprometida, pelo que neste trabalho foram sintetizados derivados do ácido cafeico com diferentes solubilidades.

1. Síntese do ácido cafeico e seus derivados

1.1. Síntese de monomalonatos

Sintetizaram-se vários monomalonatos, pela reação de um álcool apropriado (*Figura 149*) com o ácido de Meldrum, de acordo com o procedimento descrito por Menezes et al *[151]*.

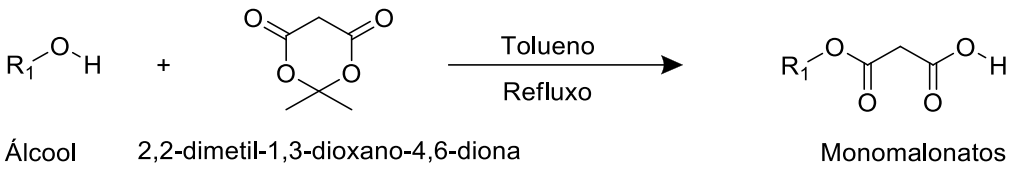


Figura 149 - Síntese dos monomalonatos.

Os rendimentos obtidos após purificação foram de 54% a 90 % (*Tabela 34*).

Tabela 34 - Resultados experimentais das sínteses dos monomalonatos.

Monomalonato	R_1	m_{obtida}/g	η %
1	CH_3	1,28	54
2	C_2H_6	1,31	49
3	C_3H_7	2,37	81
4	C_4H_9	2,90	91
5	C_6H_{13}	3,21	86
6	C_8H_{17}	2,88	67
7	$C_{10}H_{21}$	3,70	76
8	$C_{12}H_{25}$	4,21	78
9	$C_{14}H_{29}$	3,73	62
10	$C_{16}H_{33}$	3,75	57

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

No caso do monomalonato 1 e 2, o mais baixo rendimento deve-se ao fato de parte do metanol e do etanol evaporarem durante o aquecimento em refluxo da mistura reacional, dado que apresentam pontos de ebulição de 65 ºC e 78 ºC respetivamente, mais baixos que o ponto de ebulição do tolueno (110 ºC).

1.2. Síntese de cafeiatos

Sintetizaram-se vários derivados do ácido 4- hidroxicinâmico fazendo reagir cada monomalonato obtido anteriormente com o derivado benzaldeído apropriado na presença de β-alanina e piridina, de acordo com o procedimento descrito por Menezes *et al [151], Figura 150*.

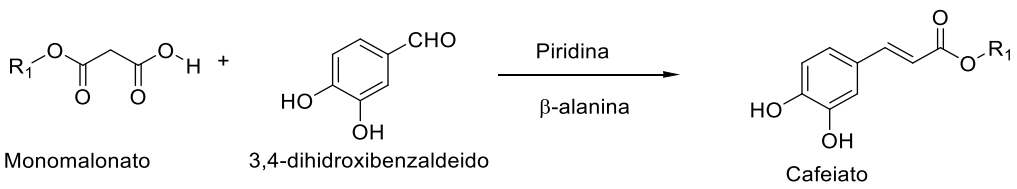


Figura 150 - Síntese de cafeiatos de cadeia longa**.**

Obtiveram-se rendimentos relativamente elevados em todas as sínteses efetuadas (39 a 88 %), *Tabela 35.*

Tabela 35 - Resultados experimentais das sínteses dos cinamatos.

Cafeiatos	R_1	η %	m_{obtida}/g	Tempo/dias
AC1	CH_3	39	0,638	3
AC2	C_2H_6	66	1,04	4
AC3	C_3H_7	76	1,15	6
AC4	C_4H_9	88	1,30	7
AC6	C_6H_{13}	70	0,98	5
AC8	C_8H_{17}	68	0,92	4
AC10	$C_{10}H_{21}$	71	0,93	6
AC12	$C_{12}H_{25}$	61	0,78	7
AC14	$C_{14}H_{29}$	73	0,91	24*
AC16	$C_{16}H_{33}$	61	0,75	12

*19dias à temperatura ambiente mais 5 dias a 40ºC

Aparentemente, o tamanho da cadeia alquilo do monomalonato influência a velocidade da reação. Assim, verificou-se que para cadeias mais longas necessitaram-se de tempos de reação maiores, como podemos verificar na *Tabela 35*. Os rendimentos dos derivados com cadeias mais curtas foram afetados pelo menor tempo de reação utilizado. Para efetuar os estudos de distribuição dentro do tempo disponível, optou-se por sacrificar um pouco os rendimentos obtidos.

Para ser possível correlacionar a distribuição do ácido cafeico e dos seus derivados com a atividade antioxidante, realizaram-se experiências em meios homogéneos para determinar em primeiro lugar a capacidade antirradicalar destes, de modo a verificar se a sua reatividade não era alterada pela introdução de cadeias alquílicas de tamanhos distintos na molécula (*Figura 151*) e, posteriormente estudar a eficácia antioxidante em emulsões modelo O/A.

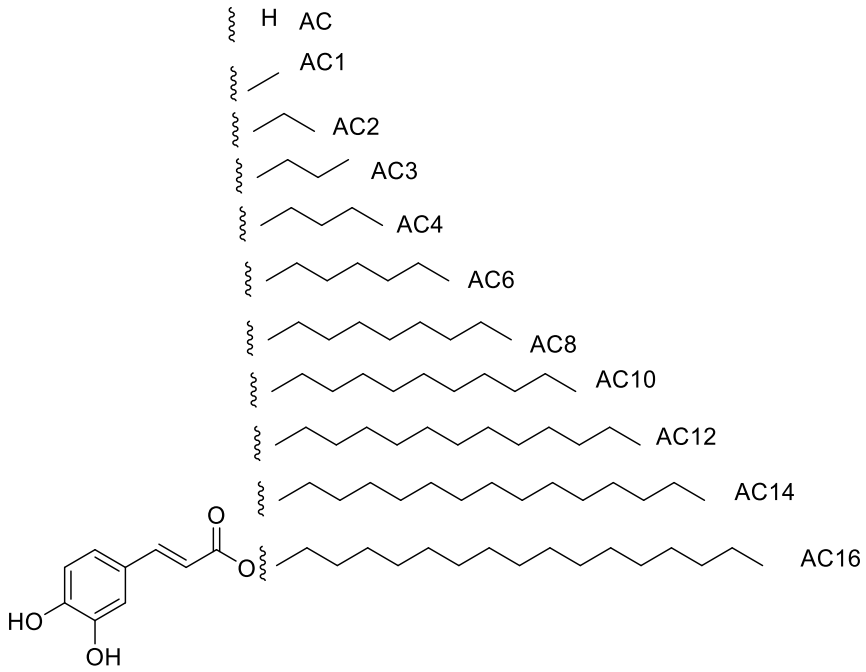


Figura 151 – Estrutura do ácido cafeico e seus derivados.

2. Reatividade do ácido cafeico e seus derivados

2.1. Reatividade do ácido cafeico e derivados frente ao radical DPPH•

A atividade antioxidante define-se a partir do parâmetro EC_{50}, que representa a concentração mínima necessária para o antioxidante captar 50% dos radicais DPPH• iniciais. Para determinar EC_{50}, representou-se graficamente, para um determinado tempo, a variação da absorvância com a relação mol AO/ mol DPPH• (*Figura 152).*

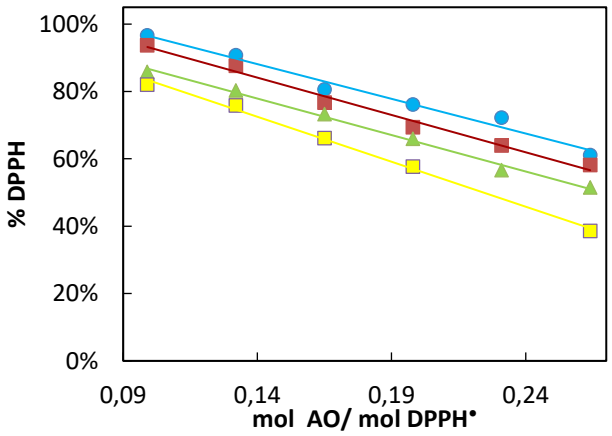


Figura 152 - Representação da variação da percentagem de DPPH• com a concentração de antioxidante (ex. cafeiato de propilo), expressa em mol AO/ mol DPPH, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear. (-●- 5 min, -■- 15 min, -▲-30 min, - ■ - 60 min), T=25ºC.

Os valores de EC_{50} obtidos para o ácido cafeico e seus derivados encontram-se na *Tabela 36*.

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

Tabela 36 - Valores de EC_{50} obtidos para diferentes tempos de reação, para o ácido cafeico e seus derivados.

t / min	**5**	**15**	**30**	**60**
Antioxidante	**EC_{50} ± σ**	**EC_{50} ± σ**	**EC_{50} ± σ**	**EC_{50} ± σ**
AC	0,330 ± 0,005	0,329 ± 0,001 *	0,334 ± 0,002*	0,344 ± 0,005*
AC1	0,308 ± 0,012	0,290 ± 0,008	0,262 ± 0,005	0,222 ± 0,010
AC2	0,323 ± 0,005	0,277 ± 0,005	0,263 ± 0,003	0,2328 ± 0,006
AC3	0,322 ± 0,002	0,291 ± 0,006	0,270 ± 0,017	0,225 ± 0,001
AC4	0,310 ± 0,006	0,293 ± 0,009	0,269 ± 0,005	0,216 ± 0,006
AC6	0,315 ± 0,005	0,262 ± 0,008	0,233 ± 0,006	0,198 ± 0,007
AC8	0,293 ± 0,012	0,269 ± 0,013	0,239 ± 0,005	0,199 ± 0,005
AC10	0,333 ± 0,003	0,285 ± 0,003	0,254 ± 0,009	0,212 ± 0,008
AC12	0,315 ± 0,004	0,294 ± 0,007	0,266 ± 0,006	0,211 ± 0,002
AC14	0,317 ± 0,008	0,298 ± 0,001	0,257 ± 0,003	0,199 ± 0,005
AC16	0,314 ± 0,003	0,282 ± 0,007	0,244 ± 0,001	0,196 ± 0,006

EC_{50} expresso em mol de antioxidante/ mol de DPPH

* Com um nível de significância P <0,05

Os resultados obtidos mostram que em solução metanólica e ao fim de 5 minutos de reação não existem diferenças significativas na atividade antirradicalar do ácido cafeico e seus derivados mais hidrofóbicos frente ao DPPH•, consequência da estrutura fenólica comum a todos eles. No entanto, o valor de EC_{50} para o ácido cafeico mantem-se mais ou menos constante ao longo do tempo, ao contrário do que acontece com os seus ésteres. De facto, a partir de 15 minutos a diferença de reatividade entre o ácido cafeico e os seus derivados é estatisticamente significativa.

Normalmente as curvas Abs vs tempo são caraterizadas inicialmente por um rápido desaparecimento da absorção do radical DPPH•, seguido de um lento desaparecimento subsequentemente deste radical. O abaixamento inicial é atribuído a reações que levam à transferência do hidrogénio do antioxidante para o radical, enquanto

que a descida subsequente é normalmente atribuída a reações secundárias mais lentas de produtos de dimerização do radical fenóxilo, entre outras. Assim, e ao contrário do que acontece com o ácido cafeico, todos os seus derivados apresentam este comportamento de um modo semelhante. A semelhante reatividade dos derivados do ácido cafeico frente aos radicais DPPH$^{\bullet}$ em solução mostram que a possível diferença na atividade antioxidante destes compostos em emulsões poderá então dever-se à provável diferença na distribuição destes pelas várias fases que as compõem.

2.2. Determinação do primeiro potencial anódico - Voltametria Cíclica

Estudou-se por voltametria cíclica o poder redutor dos vários cafeiatos. Na *Tabela 37* encontram-se os resultados do potencial do primeiro pico (*Epa*) anódico.

Tabela 37 – Valores do primeiro potencial anódico, determinados por voltametria cíclica, para o ácido cafeico e seus derivados.

	pH = 7.3	**pH = 3.6**	**pH = 3.6 + Tween 80**
Antioxidante	****Epa* (V)**	****Epa* (V)**	****Epa* (V)**
AC	0,265	0,394	0,411
AC1	0,265	0,392	0,404
AC3	0,273	0,394	0,395
AC4	0,255	0,388	0,383
AC6	0,258	0,397	0,404
AC8	0,263	0,379	0,387
AC10	0,258	0,384	0,390
AC12	0,259	0,376	0,381
AC14	0,266	0,374	0,392
AC16	0,260	0,378	0,386

**Epa*, potencial anódico *vs* Ag/AgCl.

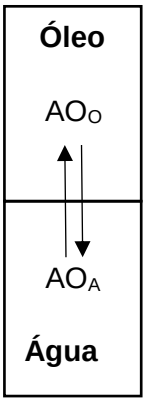
Os antioxidantes primários são agentes redutores, pelo que reagem com as espécies oxidantes pela doação de eletrões. Desta maneira, o poder redutor de um antioxidante, avaliado pela voltametria cíclica, normalmente correlaciona com a eficácia antioxidante destes. Através do resultados obtidos, verificamos que todos os compostos apresentam um potencial muito semelhante tanto a pH=7,3 (~ 0,26 V) como a pH=3,6 (~

0,38 V). Verificou-se também qua a presença de Tween 80 não alterou o valor do primeiro potencial anódico.

3. Distribuição do ácido cafeico e seus ésteres

3.1. Determinação das constantes de partição P_A^O em sistemas binários óleo/água

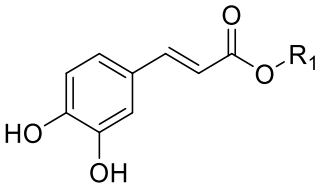
Determinou-se a constante de partição, P_A^O, do ácido cafeico e dos seus derivados para uma mistura binária constituída por 4 mL de óleo de peixe livre de AO naturais e 6 mL de solução tampão citrato 0,04 M e pH = 3,65, contendo uma concentração de 3,0 x 10^3 M do antioxidante, de acordo com o procedimento descrito na secção material e métodos. Para o efeito, fez-se a quantificação espectrofotométrica dos vários antioxidantes nas fases oleosa e aquosa, e calculou-se a constante de partição da seguinte forma:



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

Na *Tabela 38* encontram-se os resultados obtidos para os diferentes antioxidantes.

Tabela 38- Percentagem dos diferentes antioxidantes presentes na fase aquosa e oleosa de uma mistura binária óleo/água e o valor da constante de partição P_A^O, para o ácido cafeico e seus derivados.

Antioxidantes		**Sistema binário água/ óleo**		
Estrutura	-R_1	P_A^O	% AO_o	% AO_A
	-H (AC)	0,19 ± 0,01	1,5 ± 2,1	98,5 ± 0,1
	- CH_3 (AC1)	2,4 ± 0,3	61,0 ± 2,7	39,0 ± 2,6
	-CH_2CH_3 (AC2)	6,5 ± 0,2	81,3 ± 0,5	18,73 ± 0,5
	-$(CH_2)_2CH_3$ (AC3)	21,4 ± 1,3	93,4 ± 0,4	6,6 ± 0,4
	-$(CH_2)_3CH_3$ (AC4)	76,4 ± 5,9	98,0 ± 0,2	1,93 ± 0,2

Observou-se que o AC se encontra quase na totalidade na fase aquosa, diminuindo a quantidade de AO nesta região à medida que aumenta a cadeia alquílica do éster. A partir do cafeiato de butilo, inclusive, todos os antioxidantes encontram-se praticamente na totalidade na fase oleosa.

3.2. Determinação das constantes de partição do ácido cafeico e seus derivados em emulsões óleo de peixe/tampão citrato (O/A)

Estudou-se o efeito que a fração de emulsionante utilizada exerce sobre o valor de k_{obs}, da reação entre os iões 16-ArN_2^+ e o ácido cafeico em emulsões 4:6 óleo de peixe/tampão citrato (0,04 M, pH= 3,65) para frações de emulsionante (Tween 80) compreendidas entre 0,005 e 0,04. Para isso, utilizou-se o método da derivatização descrito no capítulo anterior. Em todos os casos, os pares de dados absorvância-tempo obtidos ajustaram-se perfeitamente à equação integrada de ordem 1, sendo assim possível obter a constante de velocidade observada, k_{obs}. Na *Figura 153* está representado um exemplo de uma variação típica da absorvância do corante em função do tempo, bem como a representação de $\ln(A_t - A_{inf})$ em função do tempo.

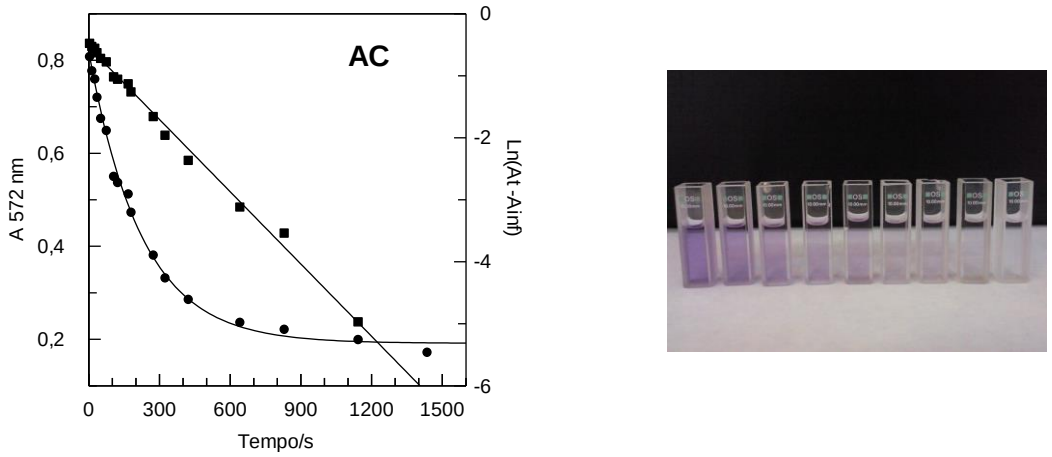


Figura 153 - Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln [A_t-A_∞] vs tempo, para o AC. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65/ Tween 80), 2 Φ_l=0,03828, [16-ArN_2^+] = 3,54× $10^{-4}M$, [AO] = 4,0× $10^{-3}M$, [NED] =0,019 M e *T*= 25ºC.

Nas *Figuras 154 – 156* está representada a variação de k_{obs} com a fração de emulsionante, assim como os ajustes exponencial e linear ao modelo cinético da pseudofase. De acordo com os valores de P_A^O (*Tabela 38*), devido á elevada solubilidade do ácido cafeico em água, espera-se que este se distribua entre as regiões aquosa e interfacial, tendo sido então utilizado o modelo simplificado para determinar a constante de partição P_A^I. O cafeiato de etilo (AC2) encontra-se provavelmente pelas três regiões da emulsão (aquosa, orgânica e interfacial), sendo necessárias duas constantes de partição para descrever a distribuição, P_A^I e P_O^I, tendo sido utilizado, neste caso, o modelo cinético completo da pseudofase (MCP). Aumentando em mais de 4 carbonos a cadeia alquílica, verificamos que a solubilidade no óleo aumenta verificando-se que os derivados AC8, AC2 e AC16 apresentam uma solubilidade nula em água, esperando-se então, que estes se distribuam entre as regiões oleosa e interfacial. Neste caso utilizou-se então o modelo simplificado para calcular a constante de partição P_O^I.

Os resultados mostram que ocorreu uma diminuição da k_{obs}, em um fator de aproximadamente 6-10 vezes à medida que aumentou o valor da fração de emulsionante na emulsão.

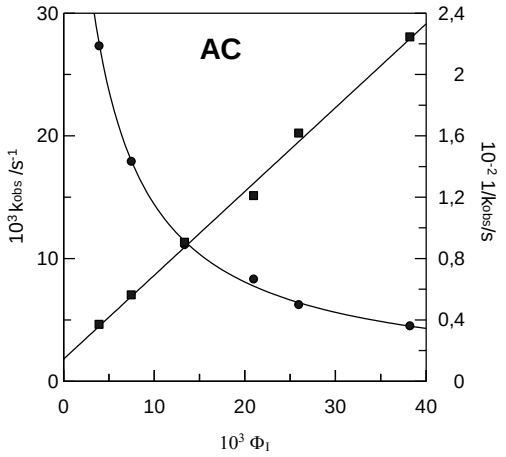


Figura 154 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 48* e *49* para o AC. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN_2^+] =3,54× $10^{-4}M$, [AO] =4,00× $10^{-3}M$, [NED] =0,019 M e *T*= 25ºC.

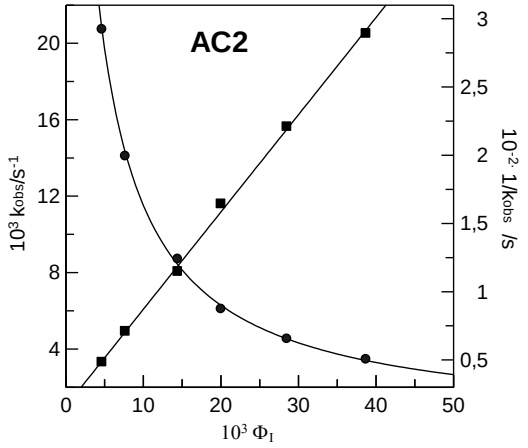
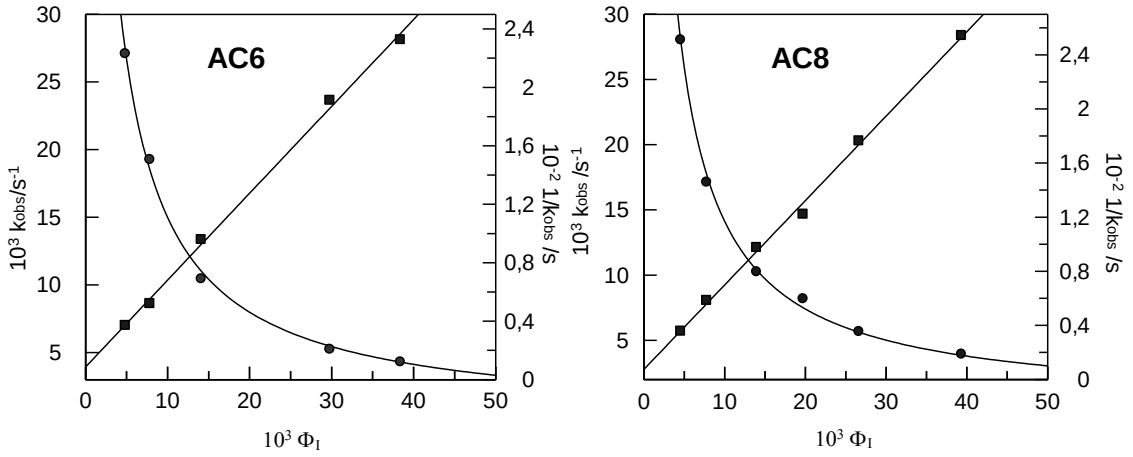


Figura 155 - Representação de k_{obs} e 1/k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 31* e *32* para o AC2. Condições experimentais: emulsão 4:6 (v/v, óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 80), [16-ArN_2^+] = 3,54x10^{-4} M, [AO] = 4,0x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25 ºC.



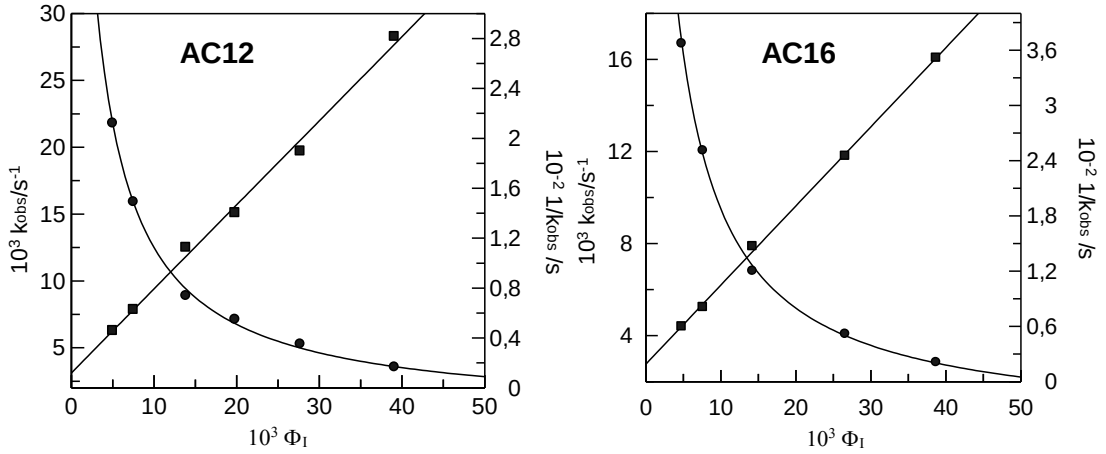


Figura 156 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (ΦI) com os respetivos ajustes às *equações 41* e *42*, para os derivados do ácido cafeico AC6, AC8, AC12 e AC16. Condições experimentais: emulsão 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), [16-ArN2+] = 2,90x10-4 M, [NED] = 0,019 M, [AC6-AC8] = 4,0x10-3, [AC16] = 3,0x10-3 M T = 25,0ºC

Na *Tabela 39* encontram-se os valores determinados das contantes de partição, P_A^I, P_O^I e os valores de k_I.

Tabela 39 - Sumário dos valores das constantes de partição obtidas para o ácido cafeico e seus derivados.

	AC	**AC2**	**AC6**	**AC8**	**AC12**	**AC16**
P_A^I	228 ± 11	1430 ± 209	---	---	---	---
P_O^I	---	220 ± 45	275 ± 28	334 ± 53	226 ± 32	181 ± 33
$10^2\ k_I$ ($M^{-1}s^{-1}$)	4,6 ± 0,2	3,5 ± 1,4	4,2 ± 0,1	4,0 ± 0,1	3,7 ± 0,2	3,9 ± 0,1

Os valores das constantes P_A^I e P_O^I são elevados para todos os derivados variando em função do antioxidante. O valor de P_A^I aumenta à medida que aumenta a hidrofobicidade dos AOs já os valores de P_O^I, apresentam um máximo para o cafeiato de octilo, AC8, ($P_O^I = 334$), diminuindo depois para o cafeiato de hexilo, AC16, ($P_O^I = 181$)

Uma vez que só se modifica o tamanho da cadeia alquílica, confirma-se que o mecanismo de reação é idêntico para todos os antioxidantes uma vez que os valores obtidos para a constante k_I são bastante similares.

A partir das constantes de partição determinou-se a distribuição dos vários compostos em emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 80), *(Figura 157*)

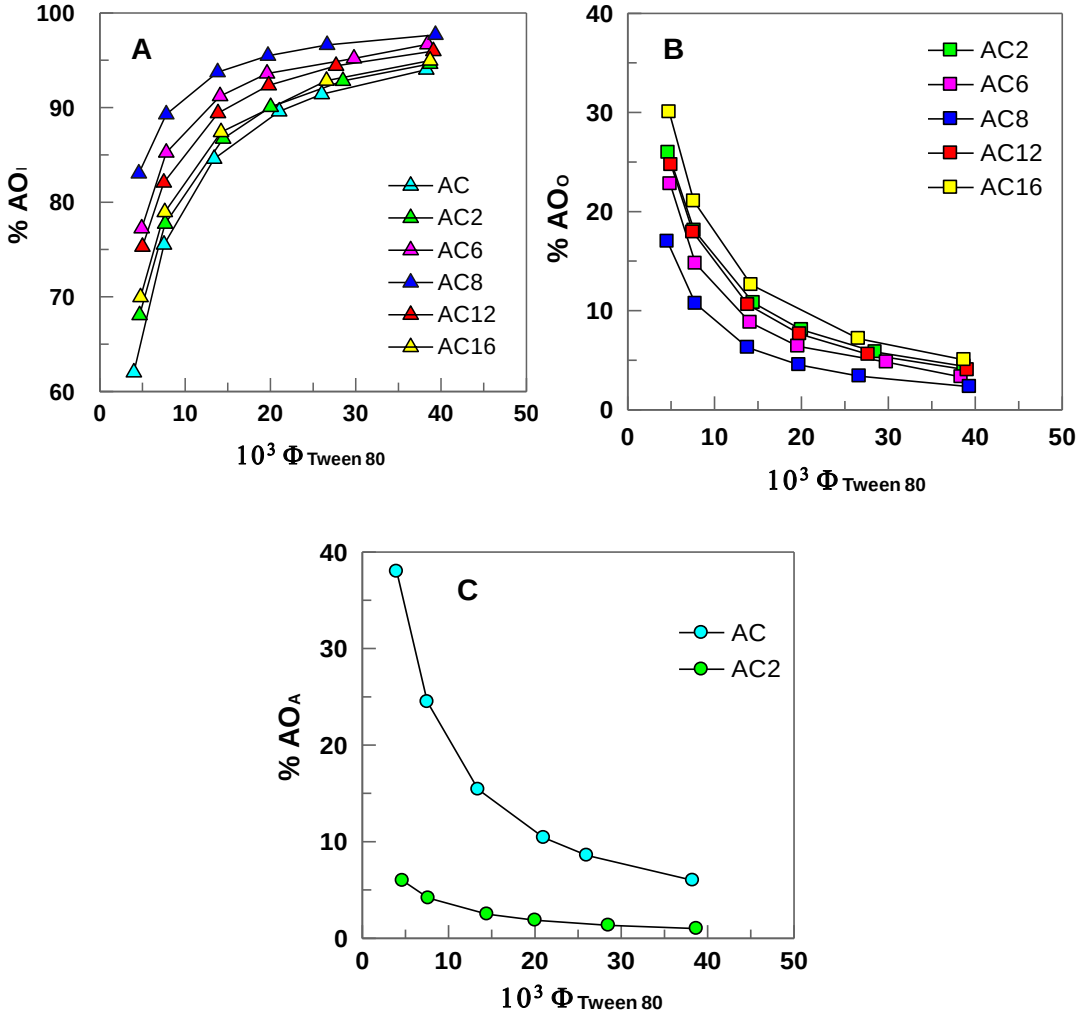


Figura 157 - Variação da percentagem do ácido cafeico e seus ésteres na região interfacial (A), na região oleosa (B) e na região aquosa (C) numa emulsão 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65, em função da fração de emulsionante Tween 80.

Através dos resultados da *Figura 157,* verificou-se que para uma fração de emulsionante (Φ_I) de 0,005 que 60% do ácido cafeico encontra-se distribuído na região interfacial, e à medida que Φ_I aumenta a percentagem deste também vai aumentando na região interfacial, ou seja, quando Φ_I=0,04, cerca de 95% do antioxidante encontra-se na região interfacial. Verifica-se que para uma percentagem de 0,5%, 40% do ácido cafeico (AC) se distribui na região aquosa sendo o antioxidante que tem maior afinidade com esta região.

O cafeiato de etilo encontra-se, maioritariamente distribuído na região interfacial, encontrando-se apenas cerca de 30% e 10 % na fase orgânica e na fase aquosa,

respetivamente. Os derivados cafeiato de hexilo, octilo, dodecilo e hexadecilo encontram-se em cerca de 70% na região interfacial, e à medida que Φ_I aumenta a percentagem de antioxidante na região interfacial também aumenta, ou seja, quando Φ_I=0,040 cerca de 90% dos antioxidantes encontram-se nesta região. O antioxidante que se distribui em maior percentagem na região interfacial, espera-se que seja o composto com melhor capacidade de inibição das reações de oxidação lipídica. Verificou-se ainda que a percentagem de AO presente na região interfacial aumenta quando a fração de emulsionante Tween 80 aumenta para 0,042, verificando-se desta forma uma influência significativa da fração de emulsionante sobre a percentagem de AO presente em cada uma das regiões da emulsão. De notar que com o aumento da fração de emulsionante a diferença de percentagem de AO existente na região interfacial entre os AOs diminui consideravelmente em especial para os compostos mais lipofílicos num fator de 1 a 8 vezes.

4. Avaliação da atividade antioxidante em emulsões

Estudou-se a atividade antioxidante do AC e deus ésteres em emulsões 4:6 formadas por óleo de peixe e tampão citrato (0,04 M, pH= 3,65), 1% de Tween 80 e contendo 0,5 mM de cada um dos antioxidantes. Para tal, submeteram-se as emulsões ao teste da estufa de Schaal a uma temperatura de 40 ºC. Estas experiências realizaram-se em triplicado, e mais uma vez, a determinação do grau de oxidação lipídica foi efetuada através da determinação do conteúdo em dienos conjugados.

A *Figura 158* representa o tempo que o conteúdo em dienos conjugados das emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato) contendo cada AO e 1% de emulsionante demorou a alcançar o valor de 0,5% de dienos conjugados.

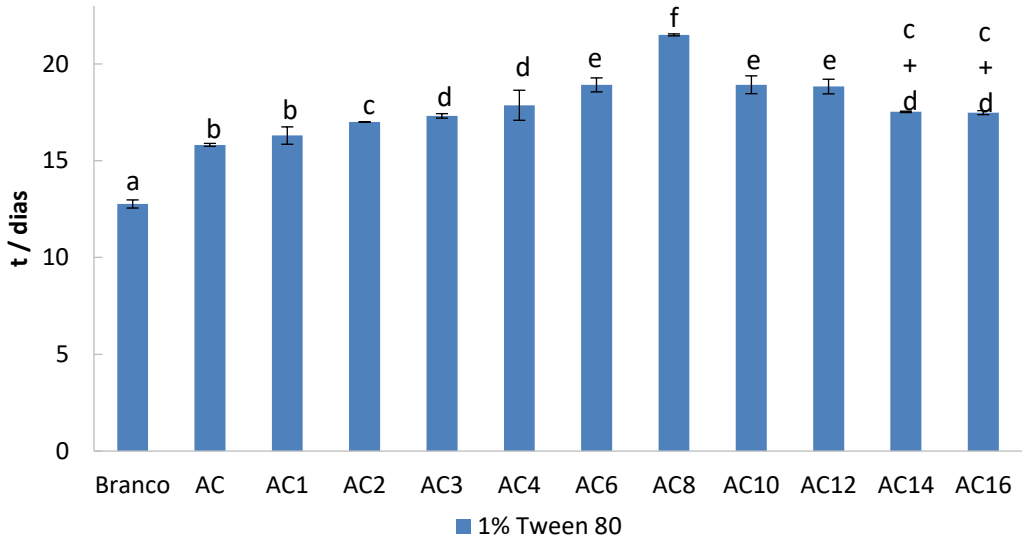


Figura 158 - Tempo (dias) para que as emulsões 4:6 contendo 1% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,65/ Tween 80), [AO_T] = 0,5 mM.

De acordo com o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demora a atingir o valor de 0,5 %, para a percentagem de emulsionante de 1 %, a ordem de atividade antioxidante foi: AC8> AC6 = AC10 = AC12 > AC14 = AC16 = AC4 = AC3 = AC2 > AC1 > AC > branco.

A ordem de eficácia obtida mais uma vez não obedece ao paradoxo polar, na medida em que os antioxidantes mais hidrofóbicos, como o AC16, apresentaram menor eficácia que o AC8 no sistema emulsionado utilizado. A eficácia dos antioxidantes aumentou até ao cafeiato AC8, decrescendo para os antioxidantes com cadeias alquílicas maiores que 8 carbonos. Estes resultados refletem o efeito "cut off". A atividade antioxidante numa emulsão depende da partição e distribuição dos antioxidantes entre as diferentes regiões que a constituem, e da estabilidade dos antioxidantes. Desta forma, a concentração de antioxidante na região interfacial terá um papel importante no que respeita à estabilidade oxidativa de emulsões. Verificou-se que a atividade antioxidante é superior para o composto que apresentou o maior valor de P_O^I. Uma vez que todos os derivados do ácido cafeico mostram uma atividade antiradicalar e um valor de primeiro potencial anódico bastante semelhante, as diferenças observadas só podem advir da diferente distribuição dos vários antioxidantes nas emulsões.

De modo a verificar o efeito da fração de emulsionante, realizou-se uma experiência em que se utilizaram, para um mesmo antioxidante, emulsões contendo diferentes quantidades de emulsionante. Na *Figura 159* está representado o tempo que o

conteúdo em dienos conjugados demorou a alcançar o valor de 0,5% nas emulsões com frações de emulsionante de 0,5%, 1% e 2% para alguns dos antioxidantes. O tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a alcançar o valor de 0,5% diminuiu com o aumento da percentagem de emulsionante para a maioria dos antioxidantes.

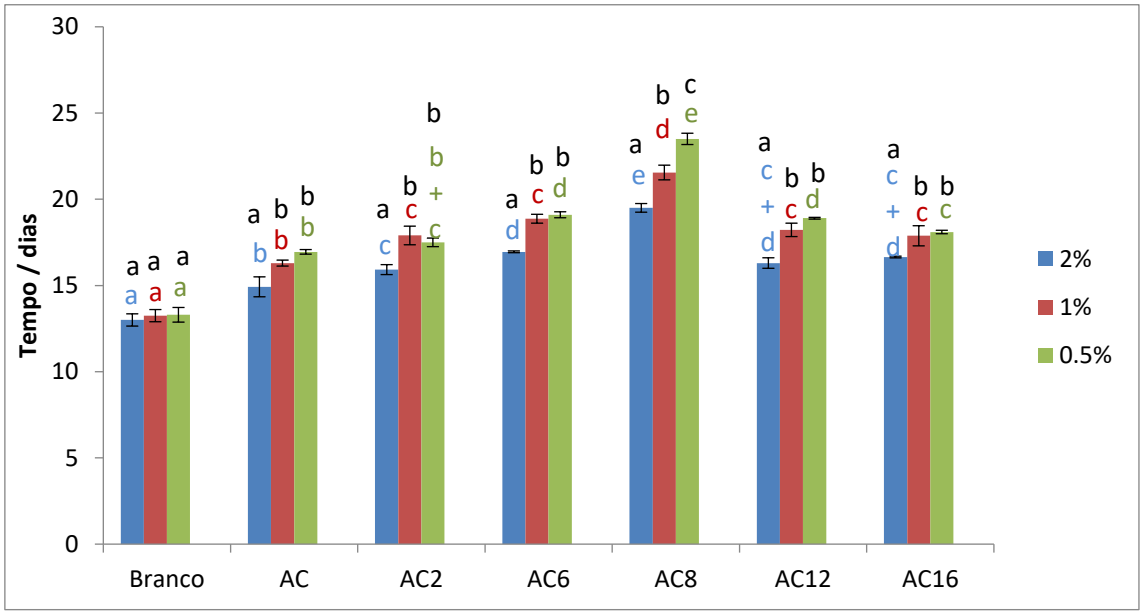


Figura 159 - Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0,5%, 1% e 2% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5%. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes; letras coloridas – compostos diferentes, percentagem de Tween 80 igual; letras pretas – compostos iguais, percentagem de Tween 80 diferente). Condições experimentais: emulsões 4:6 (Óleo de peixe/tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 /Tween 80), [AO_T] = 1,25 mM, T = 40 ºC.

De notar que variando a percentagem de Tween 80 no controlo não se verificou uma diferença estatisticamente significativa na estabilidade oxidativa das emulsões.

Contrariamente ao inicialmente esperado, o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demora a alcançar o valor de 0,5 % diminuiu com o aumento da percentagem de emulsionante, para alguns dos antioxidantes testados. Embora ocorra um aumento da quantidade do antioxidante na região interfacial com o aumento da quantidade de emulsionante, ocorre igualmente uma diluição do antioxidante que se encontra na região interfacial.

5. Correlação da distribuição com a eficácia antioxidante

Como podemos verificar pela *Figura 160*, a percentagem de antioxidante aumenta na região interfacial com o aumento da fração de emulsionante, verificando-se um máximo para o éster com a cadeia alquílica com 8 carbonos, diminuindo depois a concentração de antioxidante na região interfacial para o éster com a cadeia alquílica com 16 carbonos.

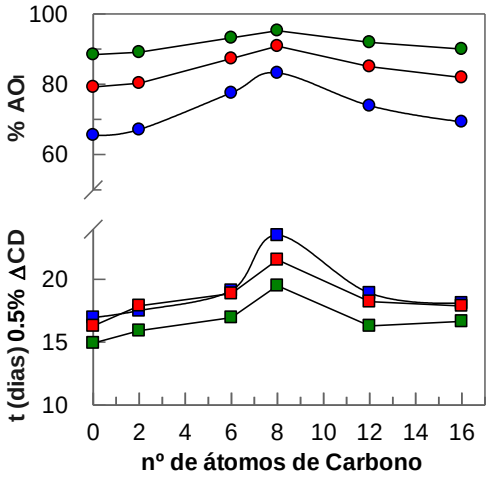


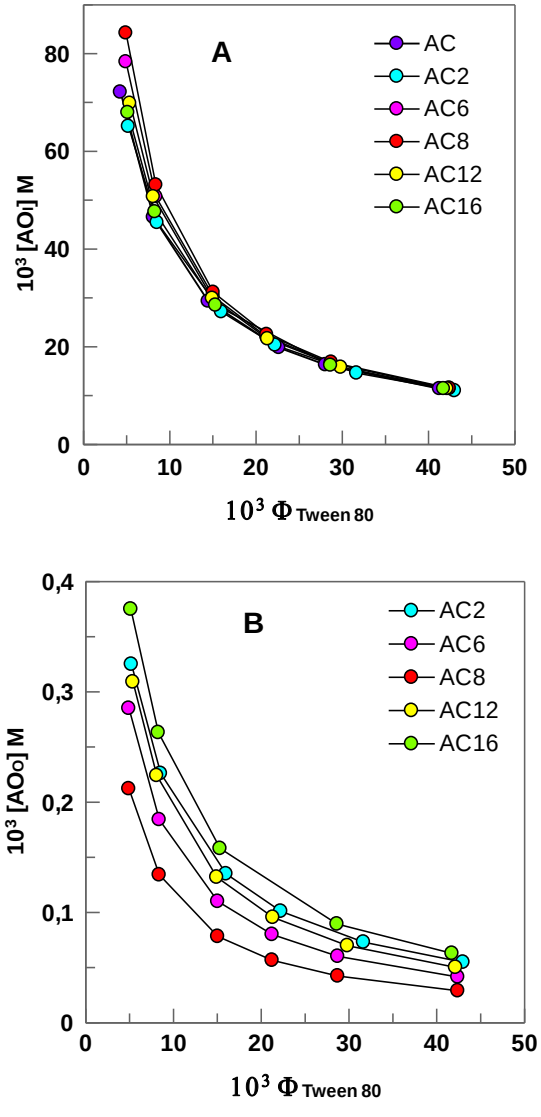
Figura 160 - Correlação da distribuição e da eficácia antioxidante com a hidrofobicidade dos AOs para Φ_I=0,005 -●- -■- ; Φ_I=0,01 -●- -■- e Φ_I=0,02 -●- -■- , numa emulsão 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65/ Tween 80, [AO_T] = 0,5 mM.

Tal como verificado anteriormente para outras série de AOs, os antioxidantes apresentam melhor eficiência a uma percentagem de emulsionante de 0.5% apesar de se encontrarem em menor percentagem na região interfacial, uma vez que aumentado a fração de emulsionante (volume da região interfacial) embora aumente a percentagem de antioxidante na região interfacial ocorre o efeito da diluição. Podemos então concluir que atividade antioxidante dependerá assim, por um lado, de um balanço entre o aumento da quantidade do antioxidante na interface e, por outro, da diluição que ocorre.

Como verificamos pelas distribuições dos AOs a concentração de AO na região interfacial aumenta à medida que Φ_I aumenta até que praticamente todo o AO fica dissolvido nessa região. Como consequência, a percentagem de AO diminui nas regiões oleosa e aquosa. Contudo, os volumes das regiões aquosa, oleosa e interfacial das emulsões são diferentes entre si e dependem das características particulares das emulsões utilizadas: concentração do emulsionante e da relação óleo/água. Portanto, a

concentração efetiva do AO em cada região é modificada pela modificação da fração de emulsionante e pela relação O/A.

As concentrações efetivas em cada região podem ser determinadas a partir das percentagens de antioxidante em cada região e a concentração estequiométrica que é dada pelas *equações 57, 58* e *59*. Na *Figura 161*, encontram-se as variações das concentrações efetivas em cada região de uma emulsão 4:6 óleo de peixe/tampão citrato, 0,04M, pH=3,65.



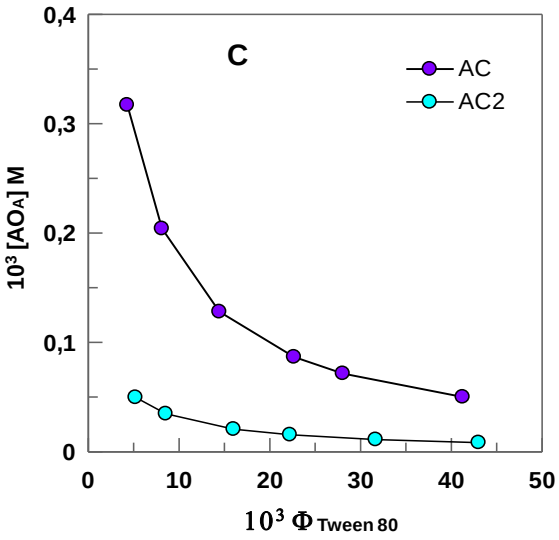


Figura 161 – Variação da concentração efetiva de antioxidante na região interfacial (A), na região oleosa (B) e na região aquosa (C), com a fração de emulsionante. Condições experimentais: emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato 0,04 M, pH = 3,65 /Tween 80), [AO_T] = 0,5 mM.

Para um determinado valor de Φ_I, verifica-se que a concentração efetiva dos AOs na região interfacial é muito maior, por um fator de 22-170 vezes, do que a concentração estequiométrica, enquanto a concentração efetiva na água é menor e no óleo pode ser maior ou menor, dependendo do AO considerado. Por exemplo, em qualquer Φ_I, a concentração efetiva de AC na região aquosa é 1,3 a 10 vezes menor do que a estequiométrica ([AO_T]= $5{,}00\times10^{-4}$ M). Já a concentração efetiva na região oleosa dos AOs mais hidrofóbicos (AC6, AC8, AC12 e AC16) é 6-12 vezes maior do que a estequiométrica, mas a de AC2 é igual ou menor (dependendo de Φ_I). A concentração de AC no óleo é obviamente nula porque não é solúvel no óleo.

Portanto, para qualquer valor [AO_T], a concentração efetiva de AOs nas regiões aquosa, oleosa e interfacial depende da % AO nessa região, da fração de emulsionante Φ_I e da relação O/A. Na região interfacial um aumento em Φ_I significa um aumento da % AO_I mas também do volume da região interfacial, sendo o aumento em volume maior que o aumento da % AO, enquanto nas regiões oleosas e aquosas % AO diminui sempre com o aumento de Φ_I. Deste modo, em todos os casos, há uma diluição efetiva dos AOs nas três regiões da emulsão ao aumentar Φ_I (*Figura 162*).

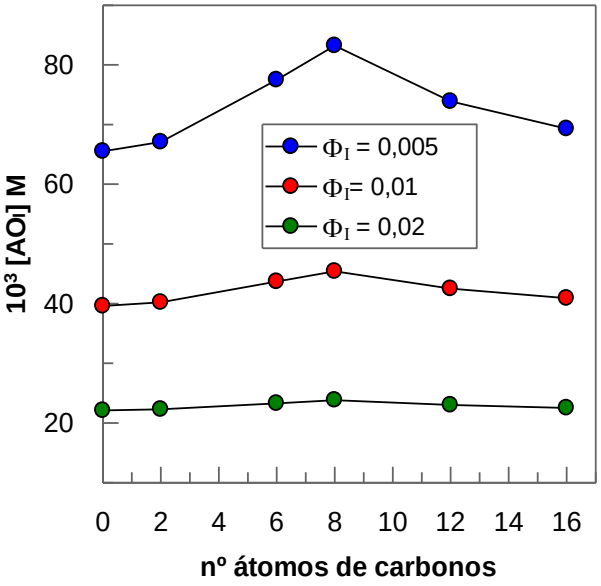


Figura 162 – Efeito da hidrofobicidade dos AO sobre a concentração de AO na região interfacial para o ácido cafeico e seus derivados paras as frações de emulsionante de Φ_I=0,005, 0,01 e 0,02, [AO_T] = 0,5 mM.

Uma vez que apenas as concentrações dos AOs nas regiões do óleo e interfacial são relevantes em termos da inibição da oxidação lipídica, uma vez que os lípidos que fazem parte do óleo de peixe são insolúveis em água, é de se esperar que as reações de oxidação lipídica não ocorram, pelo menos significativamente, na região aquosa e, como consequência, a concentração dos AOs nesta região não contribui para a atividade antioxidante dos compostos.

A fim de verificar se algum tipo de correlação pode ser estabelecida entre a eficácia do antioxidante e suas concentrações efetivas, comparou-se as variações da eficácia antioxidante, a percentagem dos AOs na região interfacial e a concentração em função da cadeia alquilíca dos ésteres do AC (e por conseguinte em função da hidrofobicidade dos AOs), *Figura 163*, para emulsões 4:6 (óleo de peixe/tampão citrato), contendo uma fração de emulsionante de 0,005, 0,01 e 0,02.

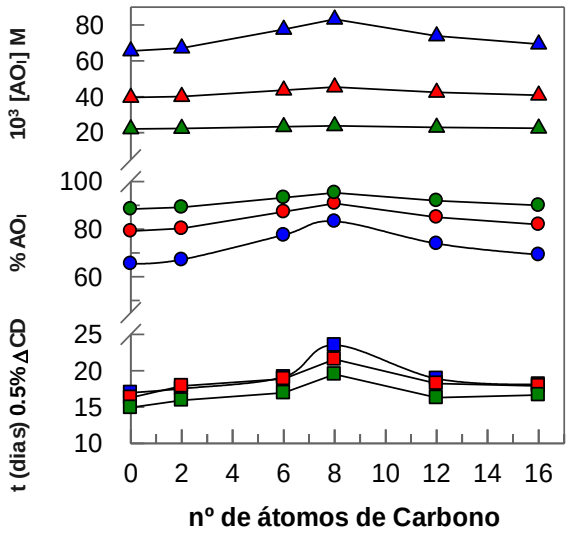
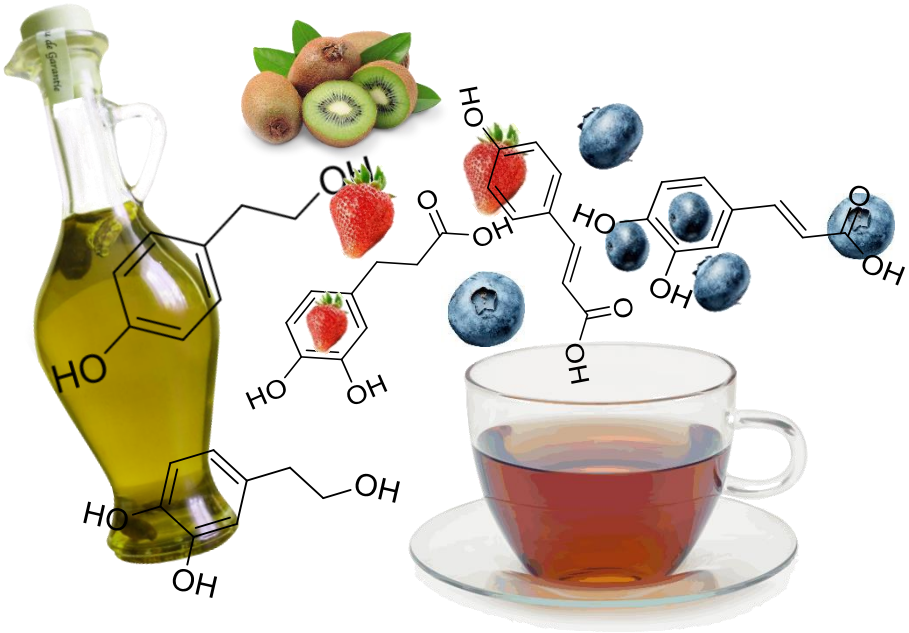


Figura 163 – Tempo necessário para alcançar o conteúdo em dienos conjugados de 0,5%, percentagem de AO na região interfacial, e concentração efetiva de AO na região interfacial, com o número de átomos de carbono, para as frações de emulsionante de Φ_I=0,005 -●- -■- ; Φ_I=0,01 -●- -■- e Φ_I=0,02 -●- -■-, [AO$_T$] = 0,5 mM.

Mais uma vez verificou-se que a atividade antioxidante é paralela à concentração efetiva do AO na região interfacial.

Capítulo 6 – Comparação da eficácia AO de alguns polifenóis



A natureza do óleo e, em particular, o grau de insaturação dos seus ácidos gordos (PUFAs) tem um papel fundamental na estabilidade oxidativa. Em geral, quanto maior o teor de PUFAs do óleo, menor a sua estabilidade. Como já referido anteriormente, no caso dos óleos de peixe, a estabilidade oxidativa destes é tão baixa que se torna difícil muitas vezes avaliar quais os fatores que influenciam a atividade antioxidante de compostos em sistemas emulsionados contendo, este tipo de óleo. De facto, pequenas variações na composição em ácidos gordos ou pequenas variações nas condições experimentais, são suficientes para que ocorram grandes variações na estabilidade oxidativa destes sistemas. Por outro lado, devido à rápida degradação oxidativa dos sistemas emulsionados contendo óleo de peixe, é difícil avaliar as pequenas diferenças na capacidade antioxidante de muitos compostos nestas matrizes.

Assim, de modo avaliar qual a importância de alguns fatores para a atividade antioxidante dos compostos avaliou-se a capacidade antioxidante deste num sistema emulsionado mais estável, tendo como região oleosa azeite. Neste sistema, avaliou-se então a atividade antioxidante de alguns fenolípidos possuindo cadeias alquílicas semelhantes (com 8 e 16 carbonos) e com anéis fenólicos diferentes (derivados dos ácido cafeico, 4-hidroxicinâmicos, diidrocafeico, 4-hidroxihidrocinâmico, do tirosol e hidroxitirosol).

Em estudos anteriores, vimos que, independentemente do tamanho das gotas que compõem a emulsão, a eficácia dos antioxidantes aumenta com o aumento da sua hidrofobicidade para um determinado valor, a partir do qual diminui. A eficiência máxima é encontrada para os derivados dos AOs com uma cadeia alquílica de 8 ou 12 carbonos, dependendo da natureza do antioxidante. Estas observações levaram a analisar a eficácia e distribuição de antioxidantes que, tendo uma hidrofobicidade similar ou igual, possuem diferentes grupos fenólicos reativos (*Figura 164)*.

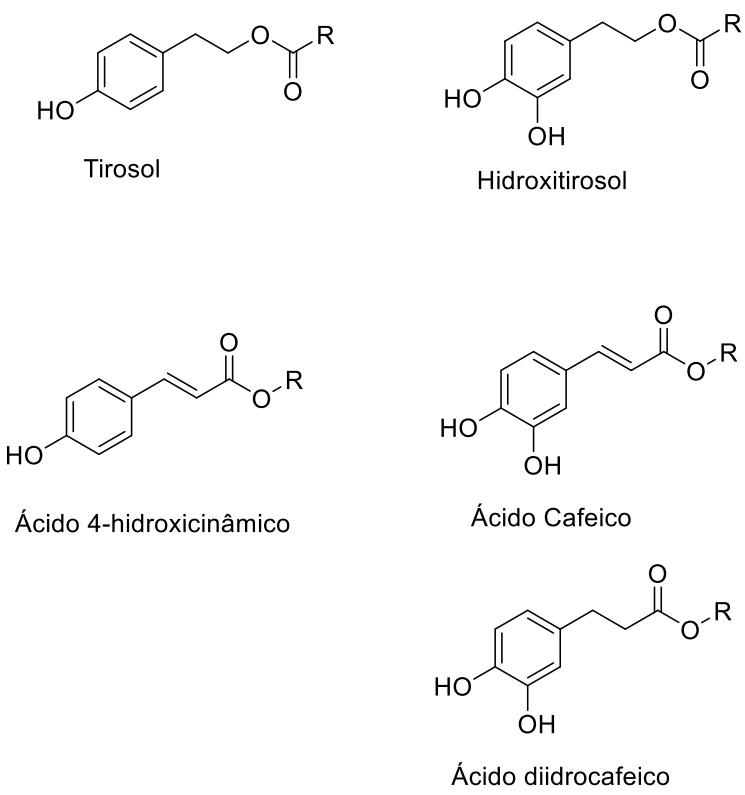


Figura 164 – Estrutura química dos polifenóis estudados.

1. Síntese dos diferentes polifenóis

Sintetizaram-se os vários polifenóis como descrito na *secção III Métodos e Procedimentos.* Os rendimentos para os derivados HT8 e HT16, encontram-se no *Capítulo 3 Tabela 20*, os rendimentos para os cafeiatos de AC8 e AC16 no *Capítulo 5 Tabela 35*. Os rendimentos obtidos para diidrocafeiatos, tirosilos e cinamatos encontram-se na *Tabela 40*.

Tabela 40 – Rendimentos obtidos para os vários fenólipidos.

Antioxidantes	R	η %	Tempo/dias
DH8	C_8H_{17}	80	4
DH16	$C_{16}H_{33}$	60	4
TY8	C_7H_{15}	73	3
TY16	$C_{15}H_{31}$	64	3
4 - OH-C8	C_8H_{17}	66	7
4 - OH-C16	$C_{16}H_{33}$	61	7

Os rendimentos obtidos para os derivados com cadeia alquílica de 16 carbonos são mais baixos devido á sua difícil purificação, uma vez que possuem propriedades tensoativas e aquando da extração líquido-líquido ocorreu a formação de espuma abundante de difícil separação.

2. Reatividade dos diferentes polifenóis

Determinou-se a atividade antirradicalar destes compostos frente ao radical $DPPH^{\bullet}$, e determinou-se o primeiro potencial anódico de cada composto por voltametria cíclica. Na *Tabela 41* encontram-se os resultados do valor de EC_{50} para 5 minutos e o valor do primeiro potencial anódico obtido a pH=3,65 e a pH=7,4.

Tabela 41 – Resultados do primeiro potencial anódico e o valor de EC_{50} para 5 minutos, para os vários compostos polifenólicos.

	***Epa* (V)**			**EC_{50}**
	pH 7.4	**pH 3.65**	**pH 3.65 com Tween 20 1%**	**5 min**
4-HO-CIN	0,612*	0,805	--------	-----
4-HO-C8	0,579	0,760	--------	-----
4-HO-C16	0,566	0,787	--------	-----
TY	0,645*	0,798	--------	-----
TY8	0,561	0,763	--------	-----
TY16	0,583	0,783	--------	-----
HT	0,217	0,411	0,410	0,323
HT8	0,235	0,419	0,392	0,295
HT16	0,222	0,403	0,391	0,331
AC	0,265	0,394	0,411	0,330
AC8	0,263	0,379	0,387	0,293
AC16	0,260	0,378	0,386	0,317
DH	0,157	0,344	--------	0,285
DH8	0,155	0,339	--------	0,295
DH16	0,150	0,349	--------	0,319

**Epa*, potencial anódico *vs* Ag/AgCl.
EC_{50} expresso em mol de antioxidante/ mol de $DPPH^{\bullet}$

Através dos resultados da *Tabela 41* podemos verificar que os valores do primeiro potencial anódico para as famílias com um grupo hidroxilo no anel aromático (tirosol e ácido hidroxicinâmico) apresentam um maior potencial e que os compostos com dois grupos hidroxilo (hidroxitirosol, ácido cafeico e diidrocafeico) apresentam um potencial menor. No caso dos ésteres do ácido diidrocafeico estes apresentam um potencial significativamente menores que os obtidos para os derivados HT e AC, o que nos indica que a cadeia lateral interfere no valor do primeiro potencial anódico. Quando utilizado pH=7,4 os compostos de DH apresentam igualmente um potencial mais baixo que os

restantes ésteres. Na presença de Tween 20 verificamos que este não interfere no valor do potencial anódico. Em relação aos resultados da atividade antirradicalar os compostos com apenas um grupo OH no anel aromático não apresentaram atividade frente ao radical DPPH e os compostos com dois grupos OH no anel aromático mostraram uma capacidade antirradicalar bastante semelhante.

3. Distribuição das várias famílias de polifenóis

Começou-se por ter uma ideia aproximada do valor das constantes de velocidade observada k_{obs} para a reação dos AO com os iões arenodiazónio em emulsões 4:6 formadas por azeite e tampão citrato (0,04 M, pH= 3,65) e Tween 20, variando a fração de emulsionante entre 0.005 e 0.04. Tal como nos capítulos anteriores, as constantes de velocidade k_{obs} foram determinadas empregando um método de derivatização.

Na *Figura 165* encontra-se um exemplo típico de uma cinética obtida com o derivado diidrocafeiato C8 (DH8). Os dados da distribuição do ácido cafeico e hidroxitirosol e seus ésteres foram realizados em estudos anteriores já publicados [248, 290].

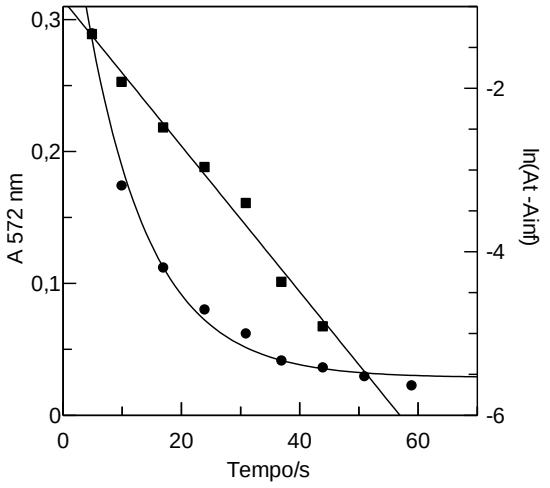


Figura 165 - Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de ln [A_t-A_∞] vs tempo. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/tampão citrato 0,04 M, pH 3,65 / Tween 20), DH_C8, Φ = 0,004963, [16-ArN_2^+] = 2,90x10^{-4} M, [AO] = 4,0x10^{-3} M, [NED] = 0,019 M, T = 25,0ºC.

Na *Figura 166*, encontra-se a variação da k_{obs} em função de Φ_I. Da representação linear de 1/k_{obs} vs Φ_I (*Figura 166*), podem-se obter os parâmetros *a* e *b* através do ajuste à *equação 42*, a partir dos valores do declive e da ordenada na origem (*Tabela 42*).

Para o tirosol, e para o ácido 4-hidroxinâmico não foi possível determinar a constante observada, k_{obs}, uma vez que a reatividade destes com os iões arenodiázonio era muito baixa.

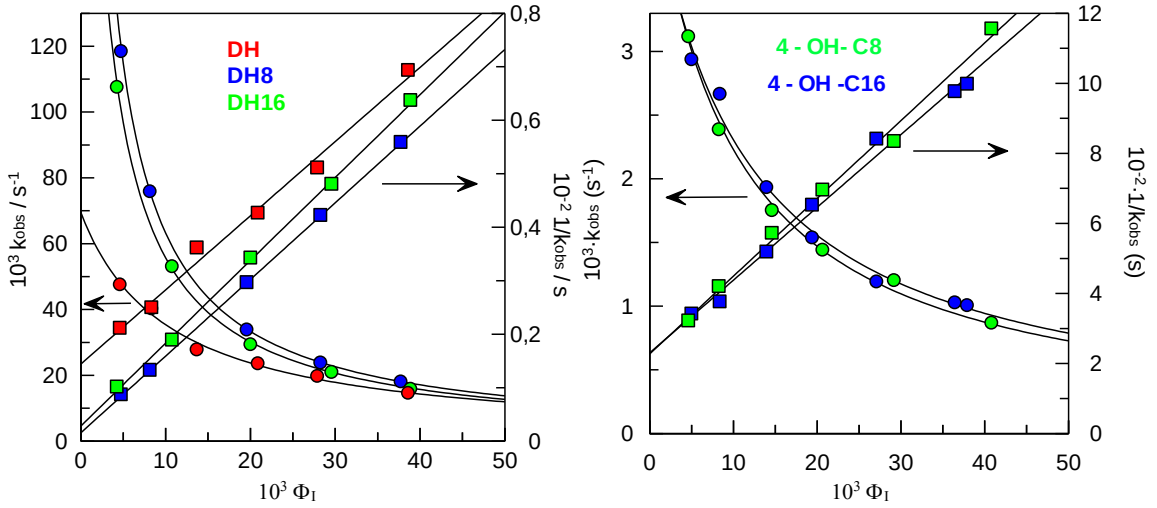


Figura 166 - Representação de k_{obs} e 1/ k_{obs} vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respetivos ajustes às *equações 41 e 42*. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/ tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 20), [16-ArN_2^+] = 2,90x10^{-4} M, [AO_HT] = 3,00x10^{-3} M, [AC] = 3,50x10^{-3} M [DH] = 4,00x10^{-3} M, [4-OH] = 1,50x10^{-3} M [NED] = 0,019 M, T = 25,0ºC.

Tabela 42 – Valores dos parâmetros *a* e *b* obtidos a partir do ajuste dos dados da *Figura 166 à* equação *42*.

Antioxidante	Parâmetro	Emulsão 4:6 (v/v, O/A)
DH	10^2 a	0,072
	b	96,17
DH8	10^2 a	0,0070
	b	920,87
DH16	10^2 a	0,0062
	b	772,15
4-OH-C8	10^2 a	0,0043
	b	97,66
4-OH-C16	10^2 a	0,0048
	b	90,24

A partir dos parâmetros a e b calcularam-se os valores de k_I e P_O^I, *Tabela 43.*

Tabela 43 - Valores de P_O^I e k_I obtidos para a emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato 0,04 M, pH=3,65) / Tween 20), a partir do ajuste dos dados da *Figura 166* à equação *42 e dados retirados de [248, 290]*.

Antioxidante	Emulsão 4:6 (v/v, O/A)	
HT	P_A^I	53 ± 7
	$10^2\ k_I$ ($M^{-1}\,s^{-1}$)	12,3 ± 0,6
HT8	P_O^I	296 ± 85
	$10^2\ k_I$ ($M^{-1}\,s^{-1}$)	27,9 ± 1,3
HT16	P_O^I	52 ± 5
	$10^2\ k_I$ ($M^{-1}\,s^{-1}$)	22,0 ± 2,2
AC	P_A^I	350 ± 27
	$10^2\ k_I$ ($M^{-1}\,s^{-1}$)	10,0 ± 1,1
AC8	P_O^I	502 ± 32
	$10^2\ k_I$ ($M^{-1}\,s^{-1}$)	14,2 ± 2,1
AC16	P_O^I	376
	$10^2\ k_I$ ($M^{-1}\,s^{-1}$)	15,1 ± 0,1
DH	P_A^I	58 ± 13
	$10^2\ k_I$ ($M^{-1}\,s^{-1}$)	18,3 ± 0,9
DH8	P_O^I	368 ± 29
	$10^2\ k_I$ ($M^{-1}\,s^{-1}$)	17,4 ± 0,1
DH16	P_O^I	220 ± 54
	$10^2\ k_I$ ($M^{-1}\,s^{-1}$)	16,1 ± 0,3
4-OH-C8	P_O^I	39 ±
	$10^2\ k_I$ ($M^{-1}\,s^{-1}$)	2,9 ± 0,2
4-OH-C16	P_O^I	36 ± 3
	$10^2\ k_I$ ($M^{-1}\,s^{-1}$)	4,9 ± 0,1

Conhecendo o valor de P_O^I e aplicando as *equações 46* e *47* do modelo da pseudofase simplificado (MCPS), obtém-se a percentagem de antioxidante nas regiões orgânica, aquosa e interfacial da emulsão, para cada valor de Φ_I, (*Figura 167*).

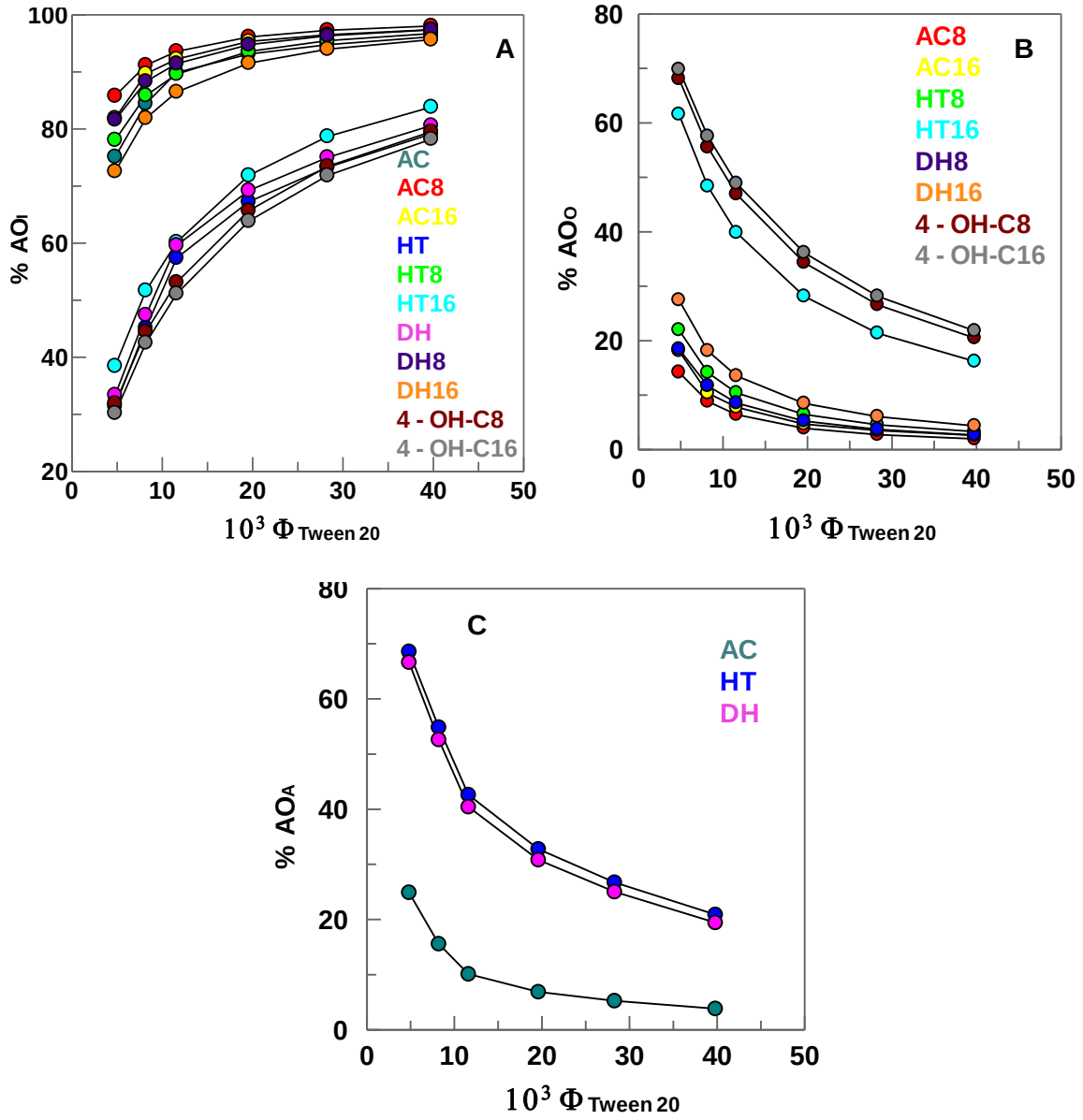


Figura 167 – Concentração dos diferentes AO na região interfacial (A), na região oleosa (B) e região aquosa (C) em função da fração de emulsionante Tween 20, para uma emulsão 4:6 (azeite / tampão citrato, 0,04M, pH=3,65 / Tween 20).

Através da *Figura 167*, verificou-se que o composto em maior percentagem na região interfacial foi o cafeiato de octilo em cerca de 90%. Todos os outros fenolípidos com cadeias contendo 8 e 16 carbonos encontram-se maioritariamente na região interfacial do sistema emulsionado, em percentagem superiores a 70%, á exceção dos fenolipidos com um único grupo hidroxilo no anel aromático (ésteres do 4-hidroxicinâmicos). Para todas as famílias o derivado C8 foi o que apresentou maior percentagem na região interfacial (*Figura168*).

A percentagem de AO na região interfacial não se correlaciona diretamente com o comprimento da cadeia alquílica, ou seja, com a hidrofobicidade do AO, pois os ésteres com 8 carbonos encontram-se em todos os casos em maior percentagem na região interfacial do que os compostos com 16 carbonos *Figura 168*. Por outro lado, a percentagem de todos os compostos na região interfacial aumentou com o aumento da fração de emulsionante o que permite concluir que a fração em volume de emulsionante exerce uma influência significativa sobre a fração de antioxidante que se encontra em cada região. Quanto maior for Φ_I, quer dizer, o volume de emulsionante utilizado na preparação da emulsão maior é a percentagem dos diferentes fenolípidos presente na região interfacial.

Em relação a reatividade das diferentes famílias na região interfacial, os valores de k_I são muito similares para cada série de compostos, o que nos indica que existe uma reatividade intrínseca muito similar dentro das várias famílias de fenolípidos, uma vez que se modificou unicamente a longitude da cadeia alquílica.

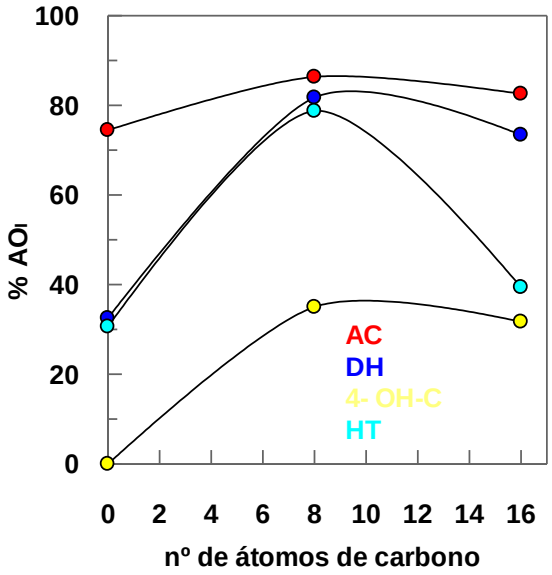


Figura 168 – Percentagem de AO na região interfacial de emulsões 4:6 (azeite /tampão citrato, 0,04M, pH=6,35 /Tween 20) em função do número de átomos de carbono da cadeia alquílica, para cada família, para a fração de emulsionante, Φ_I=0,005.

4. Atividade antioxidante

Estudou-se a atividade antioxidante das várias famílias de fenolípidos em emulsões formadas por azeite e tampão citrato (0,04 M, pH= 3,65), com 0,5 % e 1% de Tween 20 e contendo 0,24 mM de cada um dos antioxidantes. Para tal, submeteram-se

as emulsões ao teste da estufa de Schaal a 60ºC. Estas experiências realizaram-se em triplicado.

A *Figura 169*, representa o tempo que o conteúdo em dienos conjugados das emulsões (azeite / tampão citrato, 0,04M, pH=3,65 / Tween 20) demorou a alcançar o valor de 0,6 % , para 0,5 %, e 1% de emulsionante Tween 20.

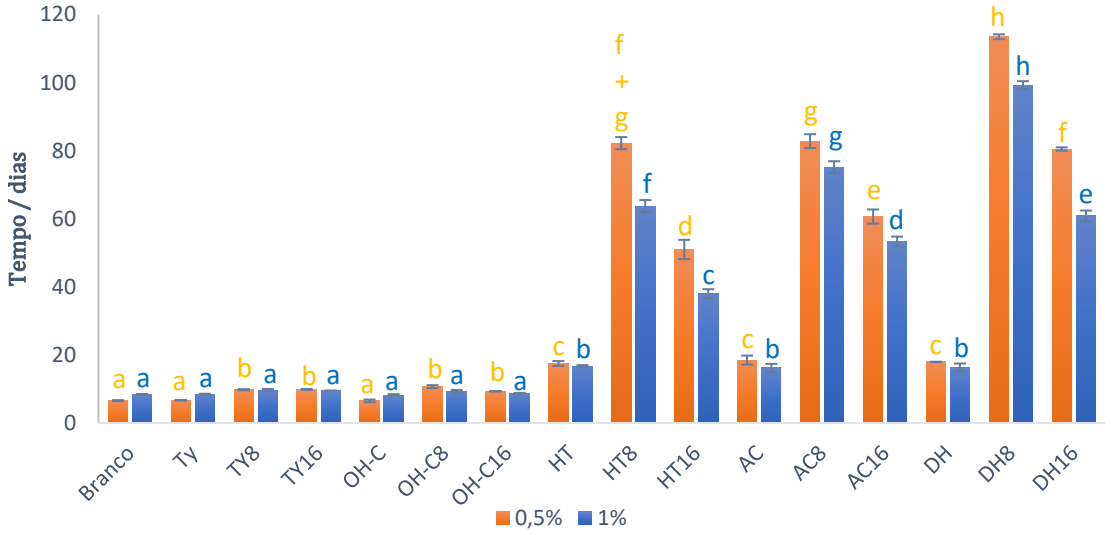


Figura 169 - Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0,5% e 1% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,6%. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes; letras coloridas – compostos diferentes, percentagem de Tween 20 igual; letras pretas – compostos iguais, percentagem de Tween 20 diferente). Condições experimentais: emulsões 4:6 (azeite/tampão citrato, 0,04 M, pH = 3,65 /Tween 20), [AO_T] = 0.24 mM, T = 60 ºC.

De acordo com o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a atingir o valor de 0,6 %, para a percentagem de emulsionante de 0,5 %, a ordem de atividade antioxidante foi: DH8>AC8=HT8=DH16>AC16>HT16>HT=AC=DH>TY8=TY16=OH-C8=OH-C16>TY=OH-C=Branco.

Relativamente à percentagem de emulsionante de 1%, a ordem de eficácia antioxidante foi bastante semelhante à obtida anteriormente para 0,5% de emulsionante: DH8>AC8>HT8>DH16>AC16>HT16>HT=AC=DH>TY8=TY16=OH-C8=OH-C16=TY=OH-C=Branco.

A atividade antioxidante numa emulsão depende da partição e distribuição dos antioxidantes entre as diferentes regiões que a constituem, tendo a concentração de

antioxidante na região interfacial um papel importante no que respeita à estabilidade oxidativa de emulsões *Figura 170*.

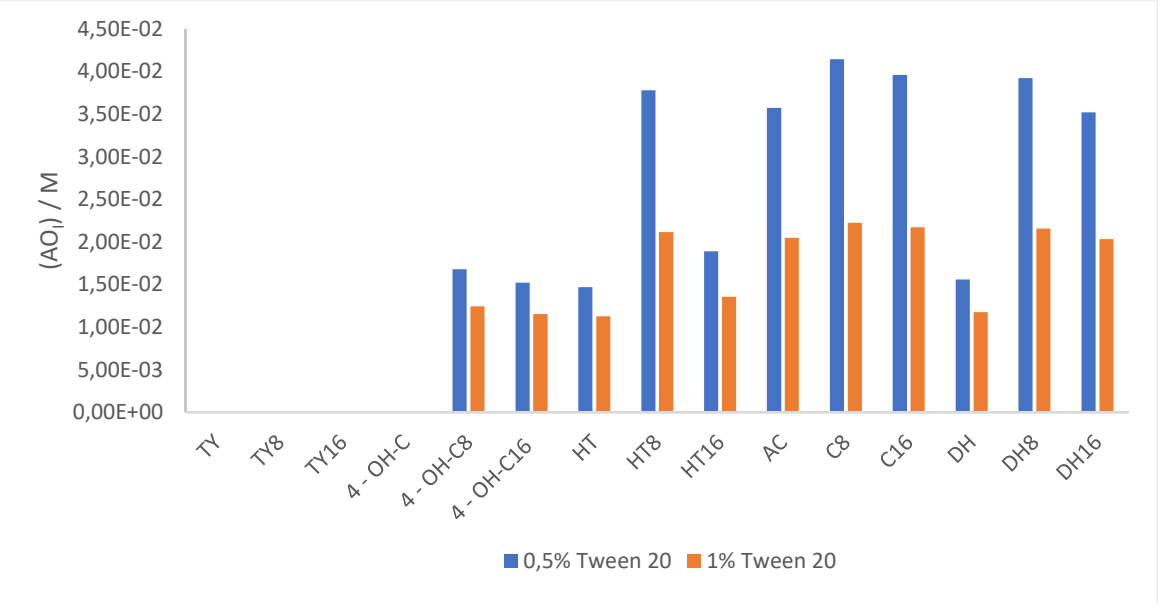


Figura 170 – Concentração efetiva de AO na região interfacial de emulsões (azeite / tampão citrato, 0,04M, pH=3,65 / Tween 20) para a fração de emulsionante de Φ_I=0,005 e Φ_I=0,01, [AO_T] = 0,24mM.

Assim, os antioxidantes que se encontram em maior percentagem na região interfacial, para uma mesma quantidade de emulsionante, parecem exercer uma atividade antioxidante melhor. No caso concreto do DH8, verificou-se a existência de uma menor concentração de antioxidante na região interfacial quando comparado com a concentração efetiva do cafeiato de octilo (AC8). No entanto, apresentou melhor capacidade antioxidante, causada provavelmente pela maior facilidade deste composto em ceder o seu eletrão (*Epa* = 0,339).

Podemos verificar que para todos os compostos a concentração de AO na região interfacial é cerca de 47 -173 vezes superior a concentração estequiométrica de AO na emulsão ([AO_T] = 0,24mM).

Verificou-se mais uma vez, o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a alcançar o valor de 0,6 % diminuiu com o aumento da percentagem de emulsionante. Embora ocorra um aumento da quantidade do antioxidante na região interfacial, com o aumento da quantidade de emulsionante, ocorre igualmente uma diluição do antioxidante que se encontra na região interfacial. O resultado da atividade antioxidante depende assim, do balanço entre o aumento da quantidade do antioxidante na região interfacial e da diluição que ocorre, como já demonstrado anteriormente.

5. Correlação entre as propriedades dos antioxidantes e a capacidade antioxidante em emulsões azeite/água

Realizou-se uma análise de correlação de Pearson entre as propriedades químicas dos vários antioxidantes, nomeadamente primeiro potencial anódico, valor EC_{50} 5 e 60 minutos, concentração de antioxidante em cada uma das regiões do sistema, fração de emulsionante e a capacidade antioxidante em emulsões 4:6 (azeite /tampão citrato, 0,04M, pH=3,65 / Tween 20), *Tabela 44,* de modo a tentar entender a importância de cada propriedade para a atividade antioxidante dos compostos.

Tabela 44- Correlação de Pearson, entre as propriedades químicas e a estabilidade das emulsões.

Correlação de Pearson								
	Aumento da estabilidade obtida pela ação do AO	$[AO_I]$	$[AO_A]$	$[AO_O]$	*Epa*	$(EC_{50})_{5min}$	$(EC_{50})_{60min}$	Φ_I
Aumento da estabilidade obtida pela ação do AO	1	0,776**	-0,449*	-0,184	-0,537**	-0,495*	-0,501	-0,273
$[AO_I]$		1	-0,364	-0,237	-0,426*	-0,398*	-0,402	-,547**
$[AO_A]$			1	-.526*	-0,238	0,138	0,132	-0,085
$[AO_O]$				1	.770**	0,776**	0,776**	-0,183
Epa					1	0,991**	0,991**	0,000
$(EC_{50})_{5min}$						1	1**	-0,003
$(EC_{50})_{60min}$							1	0,000
Φ_I								1

* nível de significância $P < 0,05$
** nível de significância $P < 0,01$

Os fatores que demonstram maior correlação com a capacidade antioxidante foram a concentração de antioxidante na região interfacial (AO_I) seguida da concentração de AO na região aquosa (AO_A) e do valor do potencial anódico. O valor de EC_{50} para 5min apresenta uma elevada correlação com o valor de *Epa* (primeiro potencial anódico).

Confirmou-se deste modo a importância da concentração efetiva dos AOs na região interfacial e do primeiro potencial anódico na previsão da capacidade antioxidante dos compostos. Também se confirmou a importância que a concentração dos AOs existente na região aquosa tem para a diminuição da estabilidade dos sistemas emulsionados. De facto, a localização das moléculas antioxidantes na região aquosa pode, pela redução de espécies metálicas, levar à ocorrência de efeitos pró-oxidantes por parte das moléculas.

Efetuou-se igualmente uma análise de regressão linear Stepwise aos dados para selecionar quais os parâmetros que melhor explicam o aumento da estabilidade das emulsões pela ação dos AOs (*Tabela 45)*.

Tabela 45 - R e valores cumulativos (cum.), parciais (part.) R^2 da análise de regressão linear Stepwise.

Modelo	Preditores	R	Cum. R^2	Part. R^2
1	$[AO_I]$	0,776	0,602	0,602
2	$[AO_I]$ $[AO_A]$	0,809	0,654	0,052
3	$[AO_I]$ *Epa* $[AO_A]$	0,871	0,758	0,104

A concentração de AO na região interfacial, $[AO_I]$, explica cerca de 60% dos resultados da capacidade antioxidante e quando juntamente com a concentração de AO na região aquosa e o *Epa* consegue explicar cerca de 76% dos resultados obtidos. Partindo do modelo 3 obtiveram-se os coeficientes para a elaboração da equação do modelo, que permite prever a eficiência antioxidante de um composto. Os coeficientes do modelo obtidos são todos significativos e a colineridade mostra que o modelo é adequado *Tabela 46*.

Tabela 46 – Coeficientes dos modelos

						Colinearidade	
Modelo		**B**	**Erro**	**t**	**Sig.**	**Tolerância**	**VIF**
1	Constante	-2,8	1,60	-1,745	0,096		
	[AO_I]	351,4	63,84	5,504	0,000	1,000	1,000
2	Constante	1,9	3,14	0,590	0,562		
	[AO_I]	302,7	67,50	4,484	0,000	0,818	1,222
	Epa	-7,8	4,59	-1,693	0,107	0,818	1,222
3	Constante	7,8	3,44	2,261	0,036		
	[AO_I]	202,1	68,38	2,955	0,008	0,589	1,698
	Epa	-13,5	4,45	-3,039	0,007	0,640	1,561
	[AO_A]	-19476,4	7007,95	-2,779	0,012	0,679	1,473

Utilizando os coeficientes do modelo 3, podemos escrever a seguinte equação:

$$\textbf{Aumento da estabilidade oxidativa obtida pela ação de um AO}$$

$$= 7{,}8 + 202{,}1[AO_I] - 13{,}5Epa\ - 19476{,}4[AO_A]$$

Através da equação é possível fazer o calculo da estabilidade prevista. Fazendo a representação da estabilidade prevista e a experimental podemos verificar que a relação entre o valor previsto e o obtido experimental são muito próximos, *Figura 171*.

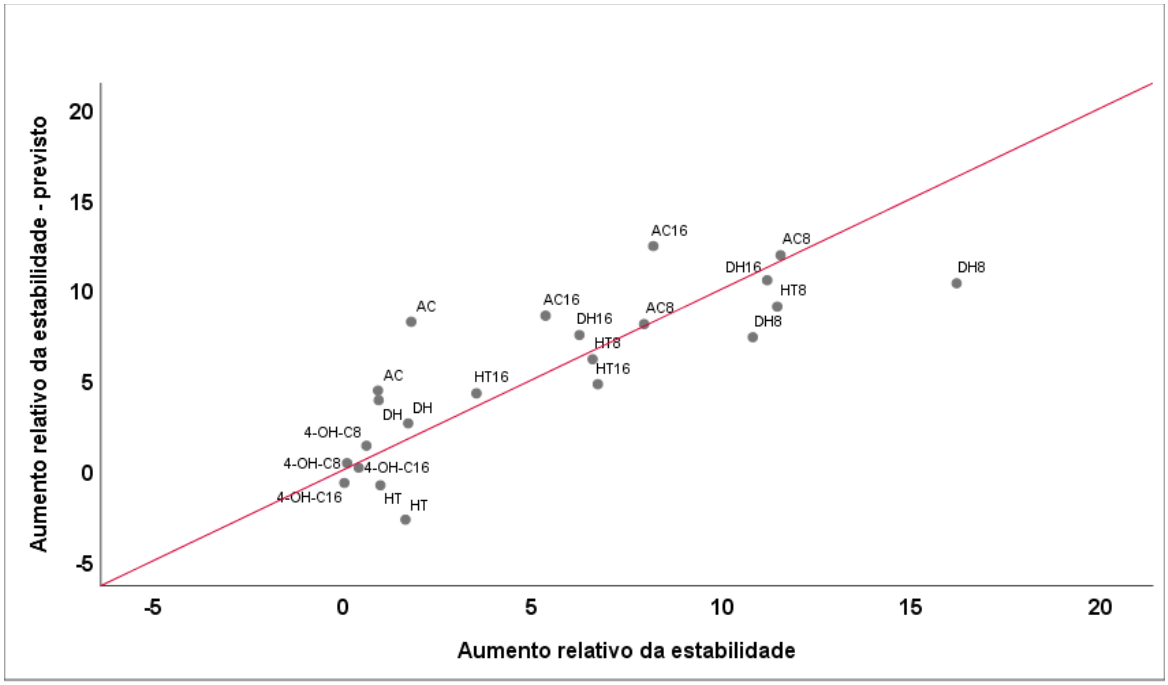


Figura 171 – Aumento relativo da estabilidade prevista e experimental.

V. Conclusões

A avaliação da capacidade antioxidante de moléculas em solução homogénea raramente fornece resultados que possam ser extrapolados para sistemas heterogéneos contendo várias regiões com propriedades de solvatação significativamente diferentes uma vez que, nestes sistemas os componentes distribuem-se pelas várias regiões de acordo com a sua solubilidade relativa. Assim, não se pode utilizar nesta avaliação os dados obtidos em sistemas homogéneos ou em sistemas binários óleo/água para explicar a distribuição e a reatividade de moléculas em sistemas multifásicos como as emulsões.

O principal objetivo desta tese foi melhorar o nosso conhecimento sobre como controlar eficientemente a oxidação de óleos ricos em ácidos gordos ómega-3 em sistemas emulsionados. O óleo de peixe é propenso à oxidação devido ao seu elevado conteúdo em ácidos gordos polinsaturados, mas muito valioso na nutrição dado os importantes benefícios para a saúde que advém do seu consumo. De forma a perceber quais os fatores que contribuem para uma melhor atividade antioxidante e deste modo otimizar a utilização das AOs nestes sistemas emulsionados, preparam-se emulsões contendo óleo de peixe e para controlar a oxidação lipídica e prolongar, tanto quanto possível o prazo de validade das emulsões, avaliamos a atividade antioxidante de quatro séries de potenciais antioxidantes, derivados do ácido gálico, do hidroxitirosol, do ácido clorogénico e do ácido cafeico. Cada série de compostos continha então na sua estrutura um mesmo anel polifenólico mas diferentes hidrofobicidades, resultante da adição de cadeias alquílicas de diferentes tamanho ao polifenol parental.

A "eficiência" antioxidante depende tanto da velocidade intrínseca da reação do antioxidante com os radicais livres quanto da sua concentração no local da reação, a qual pode ser muito diferente da concentração considerando a totalidade da emulsão. Tendo os AOs da mesma série a mesma constante de velocidade de reação com os radicais, poderemos então analisar os efeitos da hidrofobicidade do antioxidante na sua distribuição, na tentativa de estabelecer relações de estrutura - atividade para que através da modificação química de moléculas com atividade antirradicalar, seja feita uma otimização da sua eficiência antioxidante. Por outro lado, o conhecimento de como vários fatores nomeadamente a alteração da concentração de emulsionante ou a alteração da relação O/A ou ainda a alteração do tamanho de gota afetam a distribuição das potenciais moléculas antioxidantes permitirá a utilização mais eficaz de todos os AOs atualmente no mercado.

No entanto, determinar a distribuição dos AOs em sistemas emulsionados é uma tarefa difícil devido à impossibilidade física de separar a região interfacial das regiões

oleosa e aquosa, fazendo com que os métodos clássicos utilizados para determinar a distribuição dos AO em sistemas binários não possam ser empregues em sistemas emulsionados sem destruir os equilíbrios existentes. Como consequência, a distribuição de AOs em emulsões foi avaliada nas emulsões e nanoemulsões intactas, empregando um método cinético desenvolvido pelo nosso grupo de investigação e que explora a reação entre os iões arenodiazónio e os antioxidantes.

No geral, os resultados da distribuição demonstram que existe uma relação direta entre a eficiência antioxidante e as concentrações interfaciais dos AOs, fornecendo uma forte evidência experimental de que o principal local onde as reações de oxidação e de inibição desta ocorrem nos sistemas emulsionados é a região interfacial. Os resultados destacam o papel central da região interfacial e da sua composição (concentração AO interfacial, fração de emulsionante, relação óleo/água) na interpretação da eficiência dos antioxidantes.

Os valores de P_A^O aumentaram nas diferentes séries de antioxidantes com o aumento da cadeia alquílica ligada ao polifenol parental, ou seja, com a hidrofobicidade da molécula. No entanto, as concentrações interfaciais, assim como a eficiência antioxidante, aumentaram para todos as séries estudadas com o aumento da hidrofobicidade dos antioxidantes até um valor máximo (normalmente no derivado C8 ou C12 dependendo da série de AO e da relação O/A empregue), após o qual diminuem. Este comportamento é conhecido como efeito “cut off” e pode ser explicado com base na distribuição dos antioxidantes nas várias regiões do sistema emulsionado. As principais conclusões que podem ser tiradas neste trabalho são:

- A percentagem de antioxidante na região interfacial aumenta com o aumento da fração de emulsionante, de modo que para frações de emulsionante elevadas, todos os AOs poderão ficar apenas localizados naquela região.

- Um aumento da percentagem AO_I com o aumento da fração de emulsionante não é o mesmo que um aumento da concentração interfacial [AO_I] com o aumento da fração de emulsionante. Para os AOs analisados, o aumento da percentagem incorporada de AO na região interfacial não compensa o aumento do volume interfacial e o AO é diluído dentro da região interfacial, ou seja, [AO_I] diminui com o aumenta da fração de emulsionante. Assim, a quantidade de emulsionante a ser utilizada na preparação de sistemas emulsionados deverá ser a menor possível e suficiente para estabilizar fisicamente estes sistemas.

- A eficiência dos AOs correlaciona-se negativamente com a concentração dos AOs na região aquosa, provavelmente devido à existência de efeitos pró-oxidantes por parte dos AOs nesta região, pelo que pequenas concentrações de AO nesta região poderão ter um impacto muito negativo na atividade antioxidante das moléculas.

- As concentrações de AO interfaciais são 20-195 vezes maiores (dependendo da série de AO) do que a concentração de antioxidante estequiométrica (adicionada), dependendo da fração volumétrica de emulsionante, Φ_I, da relação O/A e da cadeia alquílica do antioxidante.

- A análise das distribuições e eficiências da mesma série de AOs homólogos (ácido gálico, hidroxitirosol, ácido clorogénico e ácido cafeico) em emulsões e nanoemulsões proporcionou, pela primeira vez, suporte experimental à hipótese de que a velocidade de reações entre os AOs e os radicais lipídicos dependem das concentrações interfaciais na região interfacial e não da superfície ou tamanho das gotas que constituem a emulsão.

- Demonstrou-se neste trabalho que o tamanho da gota não tem um grande impacto sobre a eficiência e sobre as concentrações interfaciais dos antioxidantes. Estes resultados fornecem suporte experimental às condições de trabalho do modelo cinético da pseudofase.

- Os efeitos da relação O/A nas concentrações interfaciais são complexos e dependem tanto da hidrofobicidade do AO como da fração de emulsionante. Um aumento na relação O/A favorece a incorporação de AOs hidrofílicos na região interfacial dos sistemas emulsionados, mas diminui a incorporação dos antioxidantes hidrofóbicos.

- A eficiência dos AOs correlaciona positivamente com a concentração do AO dentro de cada série de AOs, fornecendo suporte experimental, pela primeira vez, à suposição comumente aceite de que o principal local de reação onde ocorre a reação de inibição é a região interfacial, destacando o seu papel crucial na inibição das reações de oxidação lipídica.

- Finalmente, é de ressaltar que a interpretação dos resultados experimentais com base no modelo cinético da pseudofase fornece uma metodologia única, prática e robusta que permite determinar as concentrações nas regiões interfacial, oleosa e aquosa dos AOs em sistemas emulsionados intactos e analisar os vários parâmetros que controlam a distribuição destes entre as diferentes regiões. Até o momento, é o único método descrito que permite determinar a distribuição de antioxidantes em sistemas emulsionados intactos.

Globalmente, os resultados são relevantes para as indústrias alimentar e farmacêutica devido à importância económica dos produtos dietéticos à base de óleo de peixe e óleos vegetais, ao crescente número de formulações à base de óleo de peixe para nutrição parenteral e ao uso de emulsões e nanoemulsões como sistemas de transporte e liberação de compostos bioativos.

VI. Referências

1. C. Scrimgeour, “Chemistry of Fatty Acids,” *Bailey’s Industrial Oil and Fat Products*. 2005.
2. F. Shahidi and Y. Zhong, “Lipid Oxidation: Measurement Methods,” *Bailey’s Industrial Oil and Fat Products*. 2005.
3. S. Serini, E. Fasano, E. Piccioni, A. R. M. Cittadini, and G. Calviello, “Dietary n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Paradox of Their Health Benefits and Potential Harmful Effects,” *Chem Res Toxicol*, vol. 24, no. 12, pp. 2093–2105, 2011.
4. D. J. McClements, E. A. Decker, Y. Park, and J. Weiss, “Structural Design Principles for Delivery of Bioactive Components in Nutraceuticals and Functional Foods,” *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 49, no. 6, pp. 577–606, 2009.
5. R. P. Mason and S. C. R. Sherratt, “Omega-3 fatty acid fish oil dietary supplements contain saturated fats and oxidized lipids that may interfere with their intended biological benefits,” *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 483, no. 1, pp. 425–429, 2017.
6. M. Asnaashari, R. Farhoosh, and A. Sharif, “Antioxidant activity of gallic acid and methyl gallate in triacylglycerols of Kilka fish oil and its oil-in-water emulsion,” *Food Chem*, vol. 159, pp. 439–444, 2014.
7. E. Arab-Tehrany, M. Jacquot, C. Gaiani, M. Imran, S. Desobry, and M. Linder, “Beneficial effects and oxidative stability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids,” *Trends Food Sci Technol*, vol. 25, no. 1, pp. 24–33, 2012.
8. P. C. Calder, “1 - Nutritional benefits of omega-3 fatty acids,” in *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, C. Jacobsen, N. S. Nielsen, A. F. Horn, and A.-D. M. B. T.-F. E. with O.-3 F. A. Sørensen, Eds. Woodhead Publishing, pp. 3–26, 2013.
9. B. B. Albert, D. Cameron-Smith, M. L. Garg, J. G. B. Derraik, P. L. Hofman, and W. S. Cutfield, “Marine oils: Complex, confusing, confounded?,” *J Nutr Intermed Metab*, vol. 5, pp. 3–10, 2016.
10. T. A. Mori, “OMEGA-3 FATTY ACIDS AND HYPERTENSION IN HUMANS,” *Clin Exp Pharmacol Physiol*, vol. 33, no. 9, pp. 842–846, 2006.
11. F. Shahidi and P. Ambigaipalan, “Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Their Health Benefits,” *Annu Rev Food Sci Technol*, vol. 9, no. 1, pp. 345–381, 2018.
12. M. Singh, “Essential fatty acids, DHA and human brain,” *Indian J Pediatr*, vol. 72, no. 3, pp. 239–242, 2005.
13. O. A. Akerele and S. K. Cheema, “A balance of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is important in pregnancy,” *J Nutr Intermed Metab*, vol. 5, pp. 23–33, 2016.
14. J. M. Coletta, S. J. Bell, and A. S. Roman, “Omega-3 Fatty acids and pregnancy,” *Rev Obstet Gynecol*, vol. 3, no. 4, pp. 163–171, 2010.
15. E. E. Birch, S. Garfield, Y. Castañeda, D. Hughbanks-Wheaton, R. Uauy, and D. Hoffman, “Visual acuity and cognitive outcomes at 4 years of age in a double-blind, randomized trial of long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented infant formula,” *Early Hum Dev*, vol. 83, no. 5, pp. 279–284, 2007.
16. R. Uauy, E. Birch, D. Birch, and P. Peirano, “Visual and brain function measurements in studies of n-3 fatty acid requirements of infants,” *J Pediatr*, vol. 120, no. 4, Part 2, pp. S168–S180, 1992.
17. A.-D. M. Sørensen, *The influence of ingredients or lipophilized antioxidants on the oxidative stability of fish oil enriched food systems*. Kgs. Lyngby: Technical University of Denmark (DTU), 2010.
18. C. Jacobsen, A.-D. M. Sørensen, and N. S. Nielsen, “4 - Stabilization of omega-3 oils and enriched foods using antioxidants,” in *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition*, C. Jacobsen, N. S. Nielsen, A. F. Horn, and A.-D. M. B. T.-F. E. with O.-3 F. A. Sørensen, Eds. Woodhead Publishing, pp. 130–149, 2013.
19. C. Jacobsen, “Omega-3s in food emulsions,” *Overv case Stud*, vol. 19, no. 5, pp. 9–13, 2008.

20. D. J. McClements, *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*, 2015.
21. H. Mollet, and A. Grubenmann, *Formulation technology: emulsions, suspensions, solid forms*, John Wiley & Sons, 2008.
22. P. Kumar, K.L. Mittal, *Handbook of microemulsion science and technology*, 1999.
23. H. D. Silva, M. A. Cerqueira, and A. A. Vicente, "Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions," *J Food Eng*, vol. 167, pp. 89–98, 2015.
24. D. J. McClements and E. A. Decker, "Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems," *J Food Sci*, vol. 65, p. 1270, 2000.
25. D. T , Wasan, A. D., Nikolov, Structure and Stability of Emulsions. In Enciclopedic Handbook of Emulsion Technology, Sjöblom, J., Ed. Marcel Dekker: NY, USA, 2001.
26. D. J. McClements, "Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities," *Soft Matter*, vol. 8, no. 6, pp. 1719–1729, 2012.
27. P. Izquierdo *et al.*, "The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method," *J Colloid Interface Sci*, vol. 285, no. 1, pp. 388–394, 2005.
28. J. M. M. de Oca-Ávalos, R. J. Candal, and M. L. Herrera, "Nanoemulsions: stability and physical properties," *Curr Opin Food Sci*, vol. 16, pp. 1–6, 2017.
29. J. M. Gutiérrez, C. González, A. Maestro, I. Solè, C. M. Pey, and J. Nolla, "Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation," *Curr Opin Colloid Interface Sci*, vol. 13, no. 4, pp. 245–251, 2008.
30. T. Waraho, D. J. McClements, and E. A. Decker, "Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions," *Trends Food Sci Technol*, vol. 22, no. 1, pp. 3–13, 2011.
31. L. S. Romsted and C. Bravo-Díaz, "Modeling chemical reactivity in emulsions," *Curr Opin Colloid Interface Sci*, vol. 18, no. 1, pp. 3–14, 2013.
32. C. Solans, P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar, and M. J. Garcia-Celma, "Nano-emulsions," *Curr Opin Colloid Interface Sci*, vol. 10, no. 3, pp. 102–110, 2005.
33. N. Anton and T. F. Vandamme, "Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences," *Pharm Res*, vol. 28, no. 5, pp. 978–985, 2011.
34. M. M. Fryd and T. G. Mason, "Advanced Nanoemulsions," *Annu Rev Phys Chem*, vol. 63, no. 1, pp. 493–518, 2012.
35. T. Tadros, P. Izquierdo, J. Esquena, and C. Solans, "Formation and stability of nano-emulsions," *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 108–109, pp. 303–318, 2004.
36. N. Anton, J.-P. Benoit, and P. Saulnier, "Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates—A review," *J Control Release*, vol. 128, no. 3, pp. 185–199, 2008.
37. T. G. Mason, J. N. Wilking, K. Meleson, C. B. Chang, and S. M. Graves, "Nanoemulsions: formation, structure, and physical properties," *J Phys Condens Matter*, vol. 18, no. 41, pp. R635–R666, 2006.
38. D. J. Mcclements, "Critical Review of Techniques and Methodologies for Characterization of Emulsion Stability," *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 47, no. 7, pp. 611–649, 2007.
39. D. J. McClements and J. Rao, "Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity," *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 51, no. 4, pp. 285–330, 2011.
40. Sjöblom, J., Emulsions and Emulsion Stability. Taylor & Francis: Boca Raton, Fl, 2006.
41. D. J. McClements and S. M. Jafari, "Chapter 1 - General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation," S. M. Jafari and D. J. B. T.-N. McClements, Eds. Academic Press, pp. 3–20, 2018.
42. A. Gupta, H. B. Eral, T. A. Hatton, and P. S. Doyle, "Nanoemulsions: formation, properties and applications," *Soft Matter*, vol. 12, no. 11, pp. 2826–2841, 2016.

43. S. Friberg, (Ed.), K. Larsson, (Ed.), J. Sjoblom, (Ed.). Food Emulsions. Boca Raton: CRC Press, 2003.
44. E. Nazarzadeh, T. Anthonypillai, and S. Sajjadi, "On the growth mechanisms of nanoemulsions," *J Colloid Interface Sci*, vol. 397, pp. 154–162, 2013.
45. K. Rahn-Chique, A. M. Puertas, M. S. Romero-Cano, C. Rojas, and G. Urbina-Villalba, "Nanoemulsion stability: Experimental evaluation of the flocculation rate from turbidity measurements," *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 178, pp. 1–20, 2012.
46. Y.-T. Hu, Y. Ting, J.-Y. Hu, and S.-C. Hsieh, "Techniques and methods to study functional characteristics of emulsion systems," *J Food Drug Anal*, vol. 25, no. 1, pp. 16–26, 2017.
47. S. Tcholakova, N. D. Denkov, I. B. Ivanov, and B. Campbell, "Coalescence stability of emulsions containing globular milk proteins," *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 123–126, pp. 259–293, 2006.
48. P. Taylor, "Ostwald ripening in emulsions," *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 75, no. 2, pp. 107–163, 1998.
49. D. J. McClements, "Enhanced delivery of lipophilic bioactives using emulsions: a review of major factors affecting vitamin, nutraceutical, and lipid bioaccessibility," *Food Funct*, vol. 9, no. 1, pp. 22–41, 2018.
50. A. I. Bourbon, R. F. S. Gonçalves, A. A. Vicente, and A. C. Pinheiro, "Chapter 16 - Characterization of Particle Properties in Nanoemulsions," S. M. Jafari and D. J. B. T.-N. McClements, Eds. Academic Press, pp. 519–546, 2018.
51. S. Bhattacharjee, "DLS and zeta potential – What they are and what they are not?," *J Control Release*, vol. 235, pp. 337–351, 2016.
52. M. Porras, C. Solans, C. González, A. Martínez, A. Guinart, and J. M. Gutiérrez, "Studies of formation of W/O nano-emulsions," *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*, vol. 249, no. 1, pp. 115–118, 2004.
53. V. Klang and C. Valenta, "Lecithin-based nanoemulsions," *J Drug Deliv Sci Technol*, vol. 21, no. 1, pp. 55–76, 2011.
54. C. M. Maguire, M. Rösslein, P. Wick, and A. Prina-Mello, "Characterisation of particles in solution – a perspective on light scattering and comparative technologies," *Sci Technol Adv Mater*, vol. 19, no. 1, pp. 732–745, 2018.
55. K. L. Guimarães and M. I. Ré, "Lipid Nanoparticles as Carriers for Cosmetic Ingredients: The First (SLN) and the Second Generation (NLC) BT - Nanocosmetics and Nanomedicines: New Approaches for Skin Care," R. Beck, S. Guterres, and A. Pohlmann, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 101–122, 2011.
56. K. Galvão, A. A. Vicente, Sobral, P. J. A., Development, characterization, and stability of O/W pepper nanoemulsions produced by high-pressure homogenization. Food and Bioprocess Technology, 11(2), 355-367, 2018
57. V. Klang, N. B. Matsko, C. Valenta, and F. Hofer, "Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment," *Micron*, vol. 43, no. 2–3, pp. 85–103, 2012.
58. I. Medina, S. Lois, D. Alcántara, R. Lucas, and J. C. Morales, "Effect of Lipophilization of Hydroxytyrosol on Its Antioxidant Activity in Fish Oils and Fish Oil-in-Water Emulsions," *J Agric Food Chem*, vol. 57, no. 20, pp. 9773–9779, 2009.
59. M. Laguerre *et al.*, "Chain Length Affects Antioxidant Properties of Chlorogenate Esters in Emulsion: The Cutoff Theory Behind the Polar Paradox," *J Agric Food Chem*, vol. 57, no. 23, pp. 11335–11342, 2009.
60. M. Laguerre *et al.*, "How to Boost Antioxidants by Lipophilization?," *Biochimie*, vol. 95, p. 20, 2013.
61. M. Laguerre *et al.*, "Relationship between Hydrophobicity and Antioxidant Ability of 'Phenolipids' in Emulsion: A Parabolic Effect of the Chain Length of Rosmarinate Esters," *J Agric Food Chem*, vol. 58, no. 5, pp. 2869–2876, 2010.

62. C. Berton, M.-H. Ropers, M. Viau, and C. Genot, “Contribution of the Interfacial Layer to the Protection of Emulsified Lipids against Oxidation,” *J Agric Food Chem*, vol. 59, no. 9, pp. 5052–5061, 2011.
63. M. Awada *et al.*, “Dietary oxidized n-3 PUFA induce oxidative stress and inflammation: role of intestinal absorption of 4-HHE and reactivity in intestinal cells.,” *J Lipid Res*, vol. 53, no. 10, pp. 2069–80, 2012.
64. D. W.S. Wong., Química de los alimentos: mecanismos y teoría.Zaragoza: Acribia, 1989.
65. F. Shahidi and Y. Zhong, “Antioxidants: Regulatory Status,” *Bailey’s Industrial Oil and Fat Products*. pp.491-512, 2005.
66. M. E. Erdmann *et al.*, “Influence of droplet size on the antioxidant efficacy of oil-in-water emulsions loaded with rosemary in raw fermented sausages,” *Eur Food Res Technol*, vol. 243, no. 8, pp. 1415–1427, 2017.
67. J. Kanner, “Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health,” *Mol Nutr Food Res*, vol. 51, no. 9, pp. 1094–1101, 2007.
68. Q. Faculdade, “Francisco António Mendes da Silva SÍNTESE,” 1998.
69. M. Alaiz, R. Zamora, and F. J. Hidalgo, “Natural antioxidants produced in oxidized lipid/amino acid browning reactions,” *J Am Oil Chem Soc*, vol. 72, no. 12, pp. 1571–1575, 1995.
70. G. Reynhout, “The effect of temperature on the induction time of a stabilized oil,” *J Am Oil Chem Soc*, vol. 68, no. 12, pp. 983–984, 1991.
71. C. V. Nwosu, L. C. Boyd, and B. Sheldon, “Effect of fatty acid composition of phospholipids on their antioxidant properties and activity index,” *J Am Oil Chem Soc*, vol. 74, no. 3, pp. 293–297, 1997.
72. H. Lindberg Madsen and G. Bertelsen, “Spices as antioxidants,” *Trends Food Sci Technol*, vol. 6, no. 8, pp. 271–277, 1995.
73. E. R. Sherwin, “Oxidation and antioxidants in fat and oil processing,” *J Am Oil Chem Soc*, vol. 55, no. 11, pp. 809–814, 1978.
74. D. Madhavi, S. Deshpande, D. Salunkhe, Food Antioxidants. Boca Raton: CRC Press, 1995.
75. E. N. Frankel, “In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids,” *Trends Food Sci Technol*, vol. 4, no. 7, pp. 220–225, 1993.
76. A. Villière, F. Rousseau, C. Brossard, and C. Genot, “Sensory evaluation of the odour of a sunflower oil emulsion throughout oxidation,” *Eur J Lipid Sci Technol*, vol. 109, no. 1, pp. 38–48, 2007.
77. C. Berset, M. Cuvelier. Revue: méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et mesure du pouvoir antioxydant. Sciences des Aliments, 16, pp.219-245, 1996.
78. J. N. Coupland and D. J. McClements, “Lipid oxidation in food emulsions,” *Trends Food Sci Technol*, vol. 7, no. 3, pp. 83–91, 1996.
79. E. N. Frankel, S.-W. Huang, J. Kanner, and J. B. German, “Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions,” *J Agric Food Chem*, vol. 42, p. 1054, 1994.
80. E. N. Frankel, “Chapter 10 - Oxidation in multiphase systems,” in *Oily Press Lipid Library Series*, E. N. B. T.-L. O. (Second E. Frankel, Ed. Woodhead Publishing, pp. 259–297, 2012.
81. C. D. Nuchi, P. Hernandez, D. J. McClements, and E. A. Decker, “Ability of Lipid Hydroperoxides To Partition into Surfactant Micelles and Alter Lipid Oxidation Rates in Emulsions,” *J Agric Food Chem*, vol. 50, no. 19, pp. 5445–5449, 2002.
82. F. Shahidi and Y. Zhong, “Lipid oxidation and improving the oxidative stability,” *Chem Soc Rev*, vol. 39, no. 11, pp. 4067–4079, 2010.
83. Antoniassi, R., Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, 19*(2), 2001.

84. D. Ladikos and V. Lougovois, “Lipid oxidation in muscle foods: A review,” *Food Chem*, vol. 35, no. 4, pp. 295–314, 1990.
85. E. Choe and D. B. Min, “Mechanisms and factors for edible oil oxidation,” *Comp Rev Food Sci Food Saf*, vol. 5, p. 169, 2006.
86. K. Krumova and G. Cosa, “Chapter 1 Overview of Reactive Oxygen Species,” in *Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences*, vol. 1, The Royal Society of Chemistry, pp. 1–21, 2016.
87. K. M. Schaich, “Lipid Oxidation: Theoretical Aspects,” *Bailey’s Industrial Oil and Fat Products*, 2005.
88. B. Li and D. A. Pratt, “Methods for determining the efficacy of radical-trapping antioxidants,” *Free Radic Biol Med*, vol. 82, pp. 187–202, 2015.
89. E. N. Frankel, “Lipid oxidation,” *Prog Lipid Res*, vol. 19, no. 1, pp. 1–22, 1980.
90. S. Bhattacharya, “Reactive Oxygen Species and Cellular Defense System BT - Free Radicals in Human Health and Disease,” V. Rani and U. C. S. Yadav, Eds. New Delhi: Springer India, pp. 17–29, 2015.
91. C. C. Berton-Carabin, M.-H. Ropers, and C. Genot, “Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer,” *Compr Rev Food Sci Food Saf*, vol. 13, no. 5, pp. 945–977, 2014.
92. M. K. Logani and R. E. Davies, “Lipid oxidation: Biologic effects and antioxidants—A review,” *Lipids*, vol. 15, no. 6, pp. 485–495, 1980.
93. E. Choe and D. B. Min, “Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods,” *Compr Rev Food Sci Food Saf*, vol. 8, p. 345, 2009.
94. K. M. Schaich, F. Shahidi, Y. Zhong, and N. A. M. Eskin, “Chapter 11 - Lipid Oxidation,” N. A. M. Eskin and F. B. T.-B. of F. (Third E. Shahidi, Eds. San Diego: Academic Press, pp. 419–478, 2013.
95. D.B. Min, J.M. Boff, , *Lipid oxidation of edible oil.* pp. 335-364, 2002.
96. B. Chen, D. J. McClements, and E. A. Decker, “CHAPTER 3 - Oxidation in Different Food Matrices: How Physical Structure Impacts Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions and Bulk Oils,” A. Logan, U. Nienaber, and X. B. T.-L. O. Pan, Eds. AOCS Press, pp. 129–154, 2013.
97. T. Coultate, *Food*. The Royal Society of Chemistry, 2009.
98. C. Fritsch, Lipid oxidation in terms of lipid distribution in foods, the amount of lipids and other factors. 5, pp. 423-431, 1994.
99. C. Genot, C. Berton, and M.-H. Ropers, “The Role of the Interfacial Layer and Emulsifying Proteins in the Oxidation in Oil-in-Water Emulsions,” in *Lipid Oxidation*, Elsevier, pp. 177–210, 2013.
100. C. Jacobsen, M. B. Let, N. S. Nielsen, and A. S. Meyer, “Antioxidant strategies for preventing oxidative flavour deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: a comparative evaluation,” *Trends Food Sci Technol*, vol. 19, no. 2, pp. 76–93, 2008.
101. C. Jacobsen, “Challenges when developing omega-3 enriched foods,” *Oléagineux, Corps gras, Lipides*, vol. 17, no. 4, pp. 251–258, 2010.
102. C. Jacobsen, “Enrichment of foods with omega-3 fatty acids: a multidisciplinary challenge,” *Ann N Y Acad Sci*, vol. 1190, no. 1, pp. 141–150, 2010.
103. J. R. Mancuso, D. J. McClements, and E. A. Decker, “The Effects of Surfactant Type, pH, and Chelators on the Oxidation of Salmon Oil-in-Water Emulsions,” *J Agric Food Chem*, vol. 47, no. 10, pp. 4112–4116, 1999.
104. J. N. Coupland and D. J. McClements, “Lipid oxidation in food emulsions,” *Trends Food Sci Technol*, vol. 7, no. 3, p. 91, 1996.
105. C. Bravo-Díaz *et al.*, “To Model Chemical Reactivity in Heterogeneous Emulsions, Think Homogeneous Microemulsions,” *Langmuir*, vol. 31, no. 33, pp. 8961–8979, Aug. 2015.

106. A. Galan, S. Losada-Barreiro, and C. Bravo-Díaz, “A Physicochemical Study of the Effects of Acidity on the Distribution and Antioxidant Efficiency of Trolox in Olive Oil-in-Water Emulsions,” *ChemPhysChem*, vol. 17, no. 2, pp. 296–304, 2016.
107. S. Losada-Barreiro, C. Bravo-Díaz, and L. S. Romsted, “Distributions of phenolic acid antioxidants between the interfacial and aqueous regions of corn oil emulsions: Effects of pH and emulsifier concentration,” *Eur J Lipid Sci Technol*, vol. 117, no. 11, pp. 1801–1813, 2015.
108. E. N. Frankel, Lipid Oxidation: Dundee, The Oily Press, 1998.
109. K. M. Schaich, “Chapter 1 - Analysis of Lipid and Protein Oxidation in Fats, Oils, and Foods,” M. Hu and C. B. T.-O. S. and S. L. of F. C. O. and F. Jacobsen, Eds. AOCS Press, pp. 1–131, 2016.
110. M. Antolovich, , et al., Methods for testing antioxidant activity. 127, 1, pp. 183-198, 2002.
111. B. Barriuso, I. Astiasarán, and D. Ansorena, “A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task,” Eur Food Res Technol, vol. 236, no. 1, pp. 1–15, 2013.
112. F. Shahidi and A. Chandrasekara, “ The use of antioxidants in the preservation of cereals and low-moisture foods,” in Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, F. B. T.-H. of A. for F. P. Shahidi, Ed. Woodhead Publishing, pp. 413–432, 2015.
113. M. G. Stover and R. R. Watson, “Chapter 1 - Polyphenols in Foods and Dietary Supplements: Role in Veterinary Medicine and Animal Health,” R. R. Watson, V. R. Preedy, and S. B. T.-P. in H. H. and D. Zibadi, Eds. San Diego: Academic Press, pp. 3–7, 2014.
114. P. K. J. P. D. Wanasundara and F. Shahidi, “Antioxidants: Science, Technology, and Applications,” Bailey’s Industrial Oil and Fat Products, 2005.
115. F. Shahidi and P. Ambigaipalan, “Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review,” *J Funct Foods*, vol. 18, pp. 820–897, 2015.
116. A. M. Pisoschi and A. Pop, “The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review,” *Eur J Med Chem*, vol. 97, pp. 55–74, 2015.
117. L. P. Christensen, “Chapter 13 - The Role of Direct and Indirect Polyphenolic Antioxidants in Protection Against Oxidative Stress,” R. R. Watson, V. R. Preedy, and S. B. T.-P. M. of A. in H. H. and D. Second E. Zibadi, Eds. Academic Press, pp. 147–179, 2018.
118. S. Losada-Barreiro and C. Bravo-Díaz, “Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases,” *Eur J Med Chem*, vol. 133, pp. 379–402, 2017.
119. J. W. Finley, A.-N. Kong, K. J. Hintze, E. H. Jeffery, L. L. Ji, and X. G. Lei, “Antioxidants in Foods: State of the Science Important to the Food Industry,” *J Agric Food Chem*, vol. 59, no. 13, pp. 6837–6846, 2011.
120. R. Mishra, and S.V. Bisht, *Antioxidants and their charecterization.* 4, 8, pp. 274-2746, 2011.
121. D. W. Reische, D.A. Lillard and R.R. Eitenmiller, Chapter 15 “ Antioxidants”, Food Lipid Chemistry, nutrition and Biotechnology, Third edition, CRC Press, 2008.
122. H.-O. Lee and A. Montag, “Antioxidative Wirksamkeit von Tocochromanolen – Rangfolgebestimmung mit „Response Surface Methodology (RSM)”,” *Lipid / Fett*, vol. 94, no. 6, pp. 213–217, 1992.
123. J. Cillard, P. Cillard, and M. Cormier, “Effect of experimental factors on the prooxidant behavior of α-tocopherol,” *J Am Oil Chem Soc*, vol. 57, no. 8, pp. 255–261, 1980.
124. E. M. Marinova and N. V Yanishlieva, “Effect of temperature on the antioxidative action of inhibitors in lipid autoxidation,” *J Sci Food Agric*, vol. 60, no. 3, pp. 313–318, 1992.

125. R. Amorati and L. Valgimigli, “Advantages and limitations of common testing methods for antioxidants,” *Free Radic Res*, vol. 49, no. 5, pp. 633–649, 2015.
126. W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, and C. Berset, “Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity,” *LWT - Food Sci Technol*, vol. 28, no. 1, pp. 25–30, 1995.
127. G. W. Burton and K. U. Ingold, “Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro,” *J Am Chem Soc*, vol. 103, no. 21, pp. 6472–6477, 1981.
128. N. J. Miller, J. Sampson, L. P. Candeias, P. M. Bramley, and C. A. Rice-Evans, “Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls,” *FEBS Lett*, vol. 384, no. 3, pp. 240–242, 1996.
129. G. Litwinienko and K. U. Ingold, “Solvent Effects on the Rates and Mechanisms of Reaction of Phenols with Free Radicals,” *Acc Chem Res*, vol. 40, no. 3, pp. 222–230, 2007.
130. C. Sánchez-Moreno, J. A. Larrauri, and F. Saura-Calixto, “A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols,” *J Sci Food Agric*, vol. 76, no. 2, pp. 270–276, 1998.
131. F. Paiva-Martins and M. H. Gordon, “Interactions of Ferric Ions with Olive Oil Phenolic Compounds,” *J Agric Food Chem*, vol. 53, no. 7, pp. 2704–2709, 2005.
132. F. Lidon, M.M. Silvestre, *Indústrias Alimentares: Aditivos e Tecnologia*. Escolar Editora, pp. 53-54, 2007.
133. A. M. N. Silva, X. Kong, M. C. Parkin, R. Cammack, and R. C. Hider, “Iron(iii) citrate speciation in aqueous solution,” *Dalt Trans*, no. 40, pp. 8616–8625, 2009.
134. M. S. Brewer, “Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications,” *Compr Rev Food Sci Food Saf*, vol. 10, no. 4, pp. 221–247, 2011.
135. E.A. Decker, "Antioxidant mechanisms." Food lipids. CRC Press, pp. 488-509, 2008.
136. F. Shahidi and Y. Zhong, “Revisiting the Polar Paradox Theory: A Critical Overview,” *J Agric Food Chem*, vol. 59, no. 8, pp. 3499–3504, 2011.
137. E. A. Decker, K. Warner, M. P. Richards, and F. Shahidi, “Measuring Antioxidant Effectiveness in Food,” *J Agric Food Chem*, vol. 53, no. 10, pp. 4303–4310, 2005.
138. F. Shahidi and Y. Zhong, “Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion,” *Eur J Lipid Sci Technol*, vol. 112, no. 9, pp. 930–940, 2010.
139. G. O. Adegoke, M. Vijay Kumar, A. G. Gopala Krishna, M. C. Varadaraj, K. Sambaiah, and B. R. Lokesh, “Antioxidants and Lipid Oxidation in Foods - A Critical Appraisal,” *J Food Sci Technol*, vol. 35, no. 4, pp. 283–298, 1998.
140. M. Milovanovic, K. Picuric-Jovanovic, B. Vucelic-Radovic, and Z. Vrbaski, “Antioxidant effects of flavonoids ofAnthriscus sylvestris in lard,” *J Am Oil Chem Soc*, vol. 73, no. 6, pp. 773–776, 1996.
141. J. W. Wong, K. Hashimoto, and T. Shibamoto, “Antioxidant Activities of Rosemary and Sage Extracts and Vitamin E in a Model Meat System,” *J Agric Food Chem*, vol. 43, no. 10, pp. 2707–2712, 1995.
142. H. L. Madsen, G. Bertelsen, and L. H. Skibsted, “Antioxidative Activity of Spices and Spice Extracts,” in *Spices*, vol. 660, American Chemical Society, pp. 14–176, 1997.
143. M.-E. Cuvelier, H. Richard, and C. Berset, “Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary,” *J Am Oil Chem Soc*, vol. 73, no. 5, pp. 645–652, 1996.
144. G. Blekas, M. Tsimidou, and D. Boskou, “Contribution of α-tocopherol to olive oil stability,” *Food Chem*, vol. 52, no. 3, pp. 289–294, 1995.
145. P. Terpinc, T. Polak, N. Šegatin, A. Hanzlowsky, N. P. Ulrih, and H. Abramovič, “Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids,” *Food Chem*, vol. 128, no. 1, pp. 62–69, 2011.
146. I. Medina *et al.*, “Activity of caffeic acid in different fish lipid matrices: A review,” *Food Chem*, vol. 131, no. 3, pp. 730–740, 2012.
147. M. Touaibia, J. Jean-François, and J. Doiron, “Caffeic Acid, a versatile pharmacophore: an overview,” *Mini Rev Med Chem*, vol. 11, no. 8, pp. 695–713, 2011.

148. N. Balasundram, K. Sundram, and S. Samman, “Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses,” *Food Chem*, vol. 99, no. 1, pp. 191–203, 2006.
149. M. F. Andreasen, A.-K. Landbo, L. P. Christensen, Å. Hansen, and A. S. Meyer, “Antioxidant Effects of Phenolic Rye (Secale cereale L.) Extracts, Monomeric Hydroxycinnamates, and Ferulic Acid Dehydrodimers on Human Low-Density Lipoproteins,” *J Agric Food Chem*, vol. 49, no. 8, pp. 4090–4096, 2001.
150. M. Servili and G. Montedoro, “Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality,” *Eur J Lipid Sci Technol*, vol. 104, no. 9-10, pp. 602–613, 2002.
151. J. C. J. M. D. S. Menezes, S. P. Kamat, J. A. S. Cavaleiro, A. Gaspar, J. Garrido, and F. Borges, “Synthesis and antioxidant activity of long chain alkyl hydroxycinnamates,” *Eur J Med Chem*, vol. 46, no. 2, pp. 773–777, 2011.
152. C. F. Koelsch, “A Synthesis of Cinnamic Acids from Methyl Acrylate or Acrylonitrile and Diazonium Salts,” *J Am Chem Soc*, vol. 65, no. 1, pp. 57–58, 1943.
153. S. S. Kulp, “Knoevenagel condensation to alpha-phenylcinnamonitriles: NaBH4 reduction to propanenitriles,” *J Chem Educ*, vol. 65, no. 8, p. 742, 1988.
154. A. Farah, M. Monteiro, C. M. Donangelo, and S. Lafay, “Chlorogenic Acids from Green Coffee Extract are Highly Bioavailable in Humans,” *J Nutr*, vol. 138, no. 12, pp. 2309–2315, 2008.
155. J. Huang, T. de Paulis, and J. M. May, “Antioxidant effects of dihydrocaffeic acid in human EA.hy926 endothelial cells,” *J Nutr Biochem*, vol. 15, no. 12, pp. 722–729, 2004.
156. M. P. Kähkönen *et al.*, “Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds,” *J Agric Food Chem*, vol. 47, no. 10, pp. 3954–3962, 1999.
157. M.-W. Lee *et al.*, “Antioxidative phenolic compounds from the roots ofRhodiola sachalinensis A. Bor,” *Arch Pharm Res*, vol. 23, no. 5, p. 455, 2000.
158. N. Landrault, P. Poucheret, P. Ravel, F. Gasc, G. Cros, and P.-L. Teissedre, “Antioxidant Capacities and Phenolics Levels of French Wines from Different Varieties and Vintages,” *J Agric Food Chem*, vol. 49, no. 7, pp. 3341–3348, 2001.
159. M. N. Peyrat-Maillard, S. Bonnely, and C. Berset, “Determination of the antioxidant activity of phenolic compounds by coulometric detection,” *Talanta*, vol. 51, no. 4, pp. 709–716, 2000.
160. S. Shahrzad and I. Bitsch, “Determination of some pharmacologically active phenolic acids in juices by high-performance liquid chromatography,” *J Chromatogr A*, vol. 741, no. 2, pp. 223–231, 1996.
161. S. Shahrzad and I. Bitsch, “Determination of gallic acid and its metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography,” *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, vol. 705, no. 1, pp. 87–95, 1998.
162. O. I. Aruoma, A. Murcia, J. Butler, and B. Halliwell, “Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives,” *J Agric Food Chem*, vol. 41, no. 11, pp. 1880–1885, 1993.
163. L. Arce, A. Ríos, and M. Valcárcel, “Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system,” *J Chromatogr A*, vol. 827, no. 1, pp. 113–120, 1998.
164. G.-C. Yen, P.-D. Duh, and H.-L. Tsai, “Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid,” *Food Chem*, vol. 79, no. 3, pp. 307–313, 2002.
165. Z. Lu, G. Nie, P. S. Belton, H. Tang, and B. Zhao, “Structure–activity relationship analysis of antioxidant ability and neuroprotective effect of gallic acid derivatives,” *Neurochem Int*, vol. 48, no. 4, pp. 263–274, 2006.
166. I. Kubo, N. Masuoka, P. Xiao, and H. Haraguchi, “Antioxidant Activity of Dodecyl Gallate,” *J Agric Food Chem*, vol. 50, no. 12, pp. 3533–3539, 2002.
167. L.-L. Lu and X.-Y. Lu, “Solubilities of Gallic Acid and Its Esters in Water,” *J Chem Eng Data*,

vol. 52, no. 1, pp. 37–39, 2007.
168. F. Lidon, M.M. Silvestre, *Indústrias Alimentares: Aditivos e Tecnologia*. Escolar Editora, 2007.
169. D. Ryan and K. Robards, "Critical Review. Phenolic compounds in olives," *Analyst*, vol. 123, no. 5, pp. 31R-44R, 1998.
170. M. Brenes, A. García, P. García, J. J. Rios, and A. Garrido, "Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils," *J Agric Food Chem*, vol. 47, no. 9, pp. 3535–3540, 1999.
171. M. Deiana *et al.*, "Hydroxytyrosol glucuronides protect renal tubular epithelial cells against H2O2 induced oxidative damage," *Chem Biol Interact*, vol. 193, no. 3, pp. 232–239, 2011.
172. B. Halliwell, "Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health?," *Cardiovasc Res*, vol. 73, no. 2, pp. 341–347, 2007.
173. M. Pazos, A. Alonso, I. Sánchez, and I. Medina, "Hydroxytyrosol Prevents Oxidative Deterioration in Foodstuffs Rich in Fish Lipids," *J Agric Food Chem*, vol. 56, no. 9, pp. 3334–3340, 2008.
174. M. Baldioli, M. Servili, G. Perretti, and G. F. Montedoro, "Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil," *J Am Oil Chem Soc*, vol. 73, no. 11, pp. 1589–1593, 1996.
175. A. Madrona *et al.*, "Synthesis of hydroxytyrosyl alkyl ethers from olive oil waste waters," *Molecules*, vol. 14, no. 5, pp. 1762–1772, 2009.
176. B. A. Cotrim *et al.*, "Unsaturated Fatty Alcohol Derivatives of Olive Oil Phenolic Compounds with Potential Low-Density Lipoprotein (LDL) Antioxidant and Antiobesity Properties," *J Agric Food Chem*, vol. 60, no. 4, pp. 1067–1074, 2012.
177. M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, and K. Robards, "Methods for testing antioxidant activity," *Analyst*, vol. 127, no. 1, pp. 183–198, 2002.
178. *Portaria nº 928/98 23 de Outubro, Decreto-Lei nº 106/2005- , 1 série A - 29 Junho 2005 Diário da República*, D.D.R.E.D.P. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, Lisboa, Editor.
179. J. O. Ragnarsson and T. P. Labuza, "Accelerated shelf-life testing for oxidative rancidity in foods—A review," *Food Chem*, vol. 2, no. 4, pp. 291–308, 1977.
180. D. Rajalakshmi, and S. Narasimhan, *Food antioxidants: sources and methods of evaluation*, in *Food antioxidants*, CRC Press, pp. 79-172, 1995.
181. D.A. Skoog, et al., *Fundamentos de química analítica*. Vol. 5. Porto Alegre: Reverté. 613, pp. 627, 657, 2002.
182. G. A. Mabbott, "An introduction to cyclic voltammetry," *J Chem Educ*, vol. 60, no. 9, p. 697, 1983.
183. O. Firuzi, A. Lacanna, R. Petrucci, G. Marrosu, and L. Saso, "Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by 'ferric reducing antioxidant power' assay and cyclic voltammetry," *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*, vol. 1721, no. 1, pp. 174–184, 2005.
184. S. Chevion, M. A. Roberts, and M. Chevion, "The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity," *Free Radic Biol Med*, vol. 28, no. 6, pp. 860–870, 2000.
185. A. Simić, D. Manojlović, D. Šegan, and M. Todorović, "Electrochemical Behavior and Antioxidant and Prooxidant Activity of Natural Phenolics," *Molecules* , vol. 12, no. 10. 2007.
186. P. A. Kilmartin, H. Zou, and A. L. Waterhouse, "A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics," *J Agric Food Chem*, vol. 49, no. 4, pp. 1957–1965, 2001.
187. V. Roginsky, T. Barsukova, C. F. Hsu, and P. A. Kilmartin, "Chain-Breaking Antioxidant Activity and Cyclic Voltammetry Characterization of Polyphenols in a Range of Green, Oolong, and Black Teas," *J Agric Food Chem*, vol. 51, no. 19, pp. 5798–5802, 2003.
188. P. T. Kissinger and W. R. Heineman, "Cyclic voltammetry," *J Chem Educ*, vol. 60, no. 9, p.

702, 1983.
189. S. Chevion, M. CHEVION, P. B. CHOCK, and G. R. BEECHER, “Antioxidant Capacity of Edible Plants: Extraction Protocol and Direct Evaluation by Cyclic Voltammetry,” *J Med Food*, vol. 2, no. 1, pp. 1–10, 1999.
190. D. Galato, K. Ckless, M. F. Susin, C. Giacomelli, R. M. Ribeiro-do-Valle, and A. Spinelli, “Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure–antioxidant activity,” *Redox Rep*, vol. 6, no. 4, pp. 243–250, 2001.
191. S. Singh, G. Immanuel, “Extraction of Antioxidants from Fruit Peels and its Utilization in Paneer,” *Journal of Food Processing & Technology*, vol. 5, no. 7. OMICS International., pp. 1–5, 2014.
192. K.A. Williams, Oils, Fats and Fatty Foods. 4th edition, London. 1996.
193. J. I. Gray, “Measurement of lipid oxidation: A review,” *J Am Oil Chem Soc*, vol. 55, no. 6, pp. 539–546, 1978.
194. S. Gómez-Alonso, V. Mancebo-Campos, M. D. Salvador, and G. Fregapane, “Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature,” *Food Chem*, vol. 100, no. 1, pp. 36–42, 2007.
195. F. Paiva-Martins, V. Santos, H. Mangericão, and M. H. Gordon, “Effects of Copper on the Antioxidant Activity of Olive Polyphenols in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsions,” *J Agric Food Chem*, vol. 54, no. 10, pp. 3738–3743, 2006.
196. N. Kaludercic, S. Deshwal, and F. Di Lisa, “Reactive oxygen species and redox compartmentalization ,” *Frontiers in Physiology* , vol. 5. p. 285, 2014.
197. C. Bravo-Díaz, L. S. Romsted, S. Losada-Barreiro, and F. Paiva-Martins, “Using a pseudophase model to determine AO distributions in emulsions: Why dynamic equilibrium matters,” *Eur J Lipid Sci Technol*, vol. 119, no. 12, p. 1600277, 2017.
198. W. L. Porter, “Paradoxical Behavior of Antioxidants in Food and Biological Systems,” *Toxicol Ind Health*, vol. 9, no. 1–2, pp. 93–122, 1993.
199. M. Laguerre *et al.*, “What Makes Good Antioxidants in Lipid-Based Systems? The Next Theories Beyond the Polar Paradox,” *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol. 55, no. 2, pp. 183–201, 2015.
200. I. Medina *et al.*, “Antioxidant Activity of Resveratrol in Several Fish Lipid Matrices: Effect of Acylation and Glucosylation,” *J Agric Food Chem*, vol. 58, no. 17, pp. 9778–9786, 2010.
201. M. Costa, S. Losada-Barreiro, F. Paiva-Martins, and C. Bravo-Díaz, “Optimizing the efficiency of antioxidants in emulsions by lipophilization: Tuning interfacial concentrations,” *RSC Adv*, vol. 6, no. 94, 2016.
202. M. Costa, S. Losada-Barreiro, F. Paiva-Martins, and C. Bravo-Díaz, “Physical evidence that the variations in the efficiency of homologous series of antioxidants in emulsions are a result of differences in their distribution,” *J Sci Food Agric*, vol. 97, no. 2, 2017.
203. R. Silva, S. Losada-Barreiro, F. Paiva-Martins, and C. Bravo-Díaz, “Partitioning and antioxidative effect of protocatechuates in soybean oil emulsions: Relevance of emulsifier concentration,” *Eur J Lipid Sci Technol*, vol. 119, no. 6, p. 1600274, 2017.
204. H. Stöckmann, K. Schwarz, and T. Huynh-Ba, “The influence of various emulsifiers on the partitioning and antioxidant activity of hydroxybenzoic acids and their derivatives in oil-in-water emulsions,” *J Am Oil Chem Soc*, vol. 77, no. 5, pp. 535–542, 2000.
205. E. N. FRANKEL, “Interfacial Lipid Oxidation and Antioxidation,” *J Oleo Sci*, vol. 50, no. 5, pp. 387–391, 2001.
206. S.-W. Huang, E. N. Frankel, R. Aeschbach, and J. B. German, “Partition of Selected Antioxidants in Corn Oil−Water Model Systems,” *J Agric Food Chem*, vol. 45, no. 6, pp. 1991–1994, 1997.
207. K. Schwarz, S.-W. Huang, J. B. German, B. Tiersch, J. Hartmann, and E. N. Frankel, “Activities of Antioxidants Are Affected by Colloidal Properties of Oil-in-Water and

Water-in-Oil Emulsions and Bulk Oils," *J Agric Food Chem*, vol. 48, no. 10, pp. 4874–4882, 2000.

208. C. Jacobsen, K. Schwarz, H. Stöckmann, A. S. Meyer, and J. Adler-Nissen, "Partitioning of Selected Antioxidants in Mayonnaise," *J Agric Food Chem*, vol. 47, no. 9, pp. 3601–3610, 1999.
209. A. Leo, C. Hansch, and D. Elkins, "Partition Coefficients and Their Uses," *Chem Rev*, vol. 71, p. 525, 1971.
210. E. Lissi, M. L. Bianconi, A. T. do Amaral, E. de Paula, L. E. B. Blanch, and S. Schreier, "Methods for the determination of partition coefficients based on the effect of solutes upon membrane structure," *Biochim Biophys Acta - Biomembr*, vol. 1021, no. 1, pp. 46–50, 1990.
211. K. Gunaseelan, L. S. Romsted, E. Gonzalez-Romero, and C. Bravo-Diaz, "Determining Partition Constants of Polar Organic Molecules Between the Oil/Interfacial and Water/Interfacial Regions in Emulsions: A Combined Electrochemical and Spectrometric Method," *Langmuir*, vol. 20, p. 3047, 2004.
212. L.-G. Danielsson and Y.-H. Zhang, "Methods for determiningn-octanol-water partition constants," *TrAC Trends Anal Chem*, vol. 15, no. 4, pp. 188–196, 1996.
213. K. Gunaseelan, L. S. Romsted, M. J. P. Gallego, E. Gonzalez-Romero, and C. Bravo-Diaz, "Determining α-Tocopherol Distributions between the Oil, Water, and Interfacial Regions of Macroemulsions: Novel Applications of Electroanalytical Chemistry and the Pseudophase Kinetic Model," *Adv Colloid Interface Sci*, vol. 123, p. 303, 2006.
214. V. Sánchez-Paz, M. J. Pastoriza-Gallego, S. Losada-Barreiro, C. Bravo-Díaz, K. Gunaseelan, and L. S. Romsted, "Quantitative determination of α-tocopherol distribution in a tributyrin/Brij 30/water model food emulsion," *J Colloid Interface Sci*, vol. 320, no. 1, pp. 1–8, 2008.
215. L. S. Romsted and J. Zhang, "Kinetic Method for Determining Antioxidant Distributions in Model Food Emulsions: Distribution Constants of t-Butylhydroquinone in Mixtures of Octane, Water and a Nonionic Emulsifier," *J Agric Food Chem*, vol. 50, p. 3328, 2002.
216. C. Bravo-Díaz, L. S. Romsted, S. Losada-Barreiro, and F. Paiva-Martins, "Using a pseudophase model to determine AO distributions in emulsions: Why dynamic equilibrium matters," *Eur J Lipid Sci Technol*, vol. 119, no. 12, p. 1600277, 2017.
217. K. Schwarz, E. N. Frankel, and J. B. German, "Partition behaviour of antioxidative phenolic compounds in heterophasic systems," *Lipid / Fett*, vol. 98, no. 3, pp. 115–121, 1996.
218. H. Stöckmann and K. Schwarz, "Partitioning of Low Molecular Weight Compounds in Oil-in-Water Emulsions," *Langmuir*, vol. 15, no. 19, pp. 6142–6149, 1999.
219. M. J. Pastoriza-Gallego, S. Losada-Barreiro, and C. Bravi-Diaz, "Effects of Acidity and Emulsifier Concentration on the Distribution of Vitamin C in a Model Food Emulsion," *J Phys Org Chem*, vol. 25, p. 908, 2012.
220. M. J. Pastoriza-Gallego, V. Sánchez-Paz, S. Losada-Barreiro, C. Bravo-Díaz, K. Gunaseelan, and L. S. Romsted, "Effects of Temperature and Emulsifier Concentration on α-Tocopherol Distribution in a Stirred, Fluid, Emulsion. Thermodynamics of α-Tocopherol Transfer between the Oil and Interfacial Regions," *Langmuir*, vol. 25, no. 5, pp. 2646–2653, 2009.
221. S. Losada-Barreiro, V. S. Paz, C. Bravi-Diaz, and F. P. Martins, "Temperature and Emulsifier Concentration Effects on Gallic Acid Distribution in a Model Food Emulsion," *J Colloid Interface Sci*, vol. 370, p. 73, 2012.
222. R. Mateos, M. Trujillo, G. Pereira-Caro, A. Madrona, A. Cert, and J. L. Espartero, "New Lipophilic Tyrosyl Esters. Comparative Antioxidant Evaluation with Hydroxytyrosyl Esters," *J Agric Food Chem*, vol. 56, no. 22, pp. 10960–10966, 2008.
223. M. H. Gordon, F. Paiva-Martins, and M. Almeida, "Antioxidant Activity of Hydroxytyrosol

Acetate Compared with That of Other Olive Oil Polyphenols," *J Agric Food Chem*, vol. 49, no. 5, pp. 2480–2485, 2001.

224. S. Losada-Barreiro, V. Sánchez-Paz, and C. Bravo-Díaz, "Effects of emulsifier hydrophile–lipophile balance and emulsifier concentration on the distributions of gallic acid, propyl gallate, and α-tocopherol in corn oil emulsions," *J Colloid Interface Sci*, vol. 389, no. 1, pp. 1–9, 2013.
225. P. Lisete-Torres, S. Losada-Barreiro, H. Albuquerque, V. Sánchez-Paz, F. Paiva-Martins, and C. Bravo-Díaz, "Distribution of Hydroxytyrosol and Hydroxytyrosol Acetate in Olive Oil Emulsions and Their Antioxidant Efficiency," *J Agric Food Chem*, vol. 60, no. 29, pp. 7318–7325, 2012.
226. S. Losada-Barreiro, V. Sánchez-Paz, and C. Bravo-Díaz, "Kinetics and Mechanism of the Reaction between an Arenediazonium Ion and Methyl Gallate (=Methyl 3,4,5-Trihydroxybenzoate) in Aqueous Solution: Evidence for Diazo Ether Formation through an O-Coupling Reaction," *Helv Chim Acta*, vol. 90, no. 8, pp. 1559–1573, 2007.
227. A. Dudzik, K. Jaszczuk, S. Losada-Barreiro, and C. Bravo-Díaz, "Kinetic evidence for the formation of diazo ethers in the course of reactions between arenediazonium ions and antioxidants," *New J Chem*, vol. 41, no. 7, pp. 2534–2542, 2017.
228. K. Jaszczuk, A. Dudzik, S. Losada-Barreiro, M. Szymula, J. Narkiewicz-Michalek, and C. Bravo-Díaz, "Kinetics and mechanism of the reaction between 3-methylbenzenediazonium ions and catechol," *J Phys Org Chem*, vol. 29, no. 11, pp. 586–593, 2016.
229. M. J. Pastoriza-Gallego, A. Fernandez-Alonso, S. Losada-Barreiro, V. Sanchez-Paz, and C. Bravo-Diaz, "Kinetics and Mechanism of the Reaction between 4-Hexadecylbenzenediazonium Ions and Vitamin C in Emulsions: Further Evidence of the Formation of Diazo Ether Intermediates in the Course of the Reaction," *J Phys Org Chem*, vol. 21, p. 524, 2008.
230. S. Losada-Barreiro and C. Bravo-Díaz, "Reactivity of 3-Methylbenzenediazonium Ions with Gallic Acid. Kinetics and Mechanism of the Reaction," *Helv Chim Acta*, vol. 92, no. 10, pp. 2009–2023, 2009.
231. H. Zollinger, *Diazo chemistry. I : aromatic and heteroaromatic compounds*, VCH: Weinheim, Germany, 1994.
232. Saunders, K. H.; Allen, R. L. M. Aromatic Diazo Compounds; 3ª ed.; Edward Arnold: Baltimore, MD, USA, 1985.
233. A. Sienkiewicz, M. Szymula, J. Narkiewicz-Michalek, and C. Bravo-Díaz, "Formation of diazohydroxides ArN2OH in aqueous acid solution: polarographic determination of the equilibrium constant KR for the reaction of 4-substituted arenediazonium ions with H2O," J Phys Org Chem, vol. 27, no. 4, pp. 284–289, 2014.
234. Zollinger, H. Color Chemistry; VCH, 1991.
235. Bravo Díaz, C. In Diazohydroxides, diazoethers and related species, in "Patai's Chemistry of Functional Groups: The Chemistry of Hydroxylamines, Oximes and Hydroxamic Acids", Zvi Rappoport, J. F. Liebman, Eds., Vol 2, p. 853.; J. Wiley & Sons: Chichester, UK, 2011.
236. S. L. Barreiro, V. Sánchez-Paz, M. J. P. Gallego, and C. Bravo-Díaz, "Micellar Effects on the Reaction between an Arenediazonium Ion and the Antioxidants Gallic Acid and Octyl Gallate," *Helv Chim Acta*, vol. 91, no. 1, pp. 21–34, Jan. 2008.
237. K. C. Brown and M. P. Doyle, "Reduction of Arenediazonium Salts by Hydroquinone. Kinetics and Mechanism for the Electron-Transfer Step," *J Org Chem*, vol. 53, p. 3255, 1988.
238. L. Brinchi, R. Germani, and G. Savelli, Reactivity control by aqueous amphiphilic self-assembling systems, in Reactions and synthesis in surfactant systems, CRC Press. p. 192-263, 2001.

239. L. S. Romsted, Surfactants in Solution.: New York, 1984.
240. J. Fendler, Membrane Mimetic Chemistry; Wiley: NY, 1982.
241. J. Fendler, H. Fendler, E. F. Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems; Academic Press: New York, 1975.
242. R. Zana, Surfactant Solutions: New Methods for Investigation; Marcel Dekker: New York, 1985.
243. M. J. Pastoriza-Gallego, V. Sanchez-Paz, L. S. Romsted, and C. Bravo-Diaz, "Distribution of tert-Butylhydroquinone in a Corn Oil/C12E6/Water Based Emulsion. Application of the Pseudophase Kinetic Model," *Prog Colloid Polym Sci*, vol. 138, p. 33, 2011.
244. J. Yao and L. S. Romsted, "Arenediazonium Salts: New Probes of the Compositions of Association Colloids. 7. Average Hydration Numbers and Cl- Concentrations in the Surfactant Film of Nonionic C12E5/Octane/Water Macroemulsions: Temperature and NaCl Concentration Effects," *Langmuir*, vol. 16, no. 23, pp. 8771–8779, 2000.
245. L. S. Romsted and J. Yao, "Arenediazonium Salts: New Probes of the Interfacial Compositions of Association Colloids. 4.1-3 Estimation of the Hydration Numbers of Aqueous Hexaethylene Glycol Monododecyl Ether, C12E6, Micelles by Chemical Trapping," *Langmuir*, vol. 12, no. 10, pp. 2425–2432, 1996.
246. F. A. Tomás-Barberán and J. C. Espín, "Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables," *J Sci Food Agric*, vol. 81, no. 9, pp. 853–876, 2001.
247. F. A. M. Silva, F. Borges, C. Guimarães, J. L. F. C. Lima, C. Matos, and S. Reis, "Phenolic Acids and Derivatives: Studies on the Relationship among Structure, Radical Scavenging Activity, and Physicochemical Parameters," *J Agric Food Chem*, vol. 48, no. 6, pp. 2122–2126, 2000.
248. J. Almeida, S. Losada-Barreiro, M. Costa, F. Paiva-Martins, C. Bravo-Díaz, and L. S. Romsted, "Interfacial Concentrations of Hydroxytyrosol and Its Lipophilic Esters in Intact Olive Oil-in-Water Emulsions: Effects of Antioxidant Hydrophobicity, Surfactant Concentration, and the Oil-to-Water Ratio on the Oxidative Stability of the Emulsions," *J Agric Food Chem*, vol. 64, no. 25, 2016.
249. L. J. López Giraldo *et al.*, "Lipase-catalyzed synthesis of chlorogenate fatty esters in solvent-free medium," *Enzyme Microb Technol*, vol. 41, no. 6, pp. 721–726, 2007.
250. J. Velasco and C. Dobarganes, "Oxidative stability of virgin olive oil," *Eur J Lipid Sci Technol*, vol. 104, no. 9-10, pp. 661–676, 2002.
251. F. Paiva-Martins, V. Santos, H. Mangericão, and M. H. Gordon, "Effects of Copper on the Antioxidant Activity of Olive Polyphenols in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsions," *J Agric Food Chem*, vol. 54, no. 10, pp. 3738–3743, 2006.
252. H. Yoshida, "Influence of fatty acids of different unsaturation in the oxidation of purified vegetable oils during microwave irradiation," *J Sci Food Agric*, vol. 62, no. 1, pp. 41–47, 1993.
253. M. Servili, M. Baldioli, R. Selvaggini, A. Macchioni, and G. Montedoro, "Phenolic Compounds of Olive Fruit: One- and Two-Dimensional Nuclear Magnetic Resonance Characterization of Nüzhenide and Its Distribution in the Constitutive Parts of Fruit," *J Agric Food Chem*, vol. 47, no. 1, pp. 12–18, 1999.
254. D. L. Pavia, L.G.M. Kriz ., *Química Orgánica Experimental: Productos Naturales. Compuestos de Interés Farmacológico e Industrial". Ed. Eunibar. Barcelona,* 1978.
255. A. C. Silva *et al.*, "Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 86, no. 1, pp. 158–165, 2011.
256. T. P. Sari *et al.*, "Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin," *Food Hydrocoll*, vol. 43, pp. 540–546, 2015.
257. M. P. Doyle and W. J. Bryker, "Alkyl nitrite-metal halide deamination reactions.- Direct

synthesis of arenediazonium tetrafluoroborate salts from aromatic amines, tert-butyl nitrite, and boron trifluoride etherate in anhydrous media," *J Org Chem*, vol. 44, no. 9, pp. 1572–1574, 1979.

258. C. Bravo-Díaz and E. González-Romero, "Monitoring dediazoniation product formation by high-performance liquid chromatography after derivatization," *J Chromatogr A*, vol. 989, no. 2, pp. 221–229, 2003.
259. K. Miyashita, "Paradox of omega-3 PUFA oxidation," *Eur J Lipid Sci Technol*, vol. 116, no. 10, pp. 1268–1279, 2014.
260. Frankel, E. N. Lipid Oxidation; The Oily Press, PJ Barnes & Associates: Bridgwater, England, 2005.
261. M. Andjelković *et al.*, "Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups," *Food Chem*, vol. 98, no. 1, pp. 23–31, 2006.
262. M. Costa, S. Losada-Barreiro, F. Paiva-Martins, C. Bravo-Díaz, and L. S. Romsted, "A direct correlation between the antioxidant efficiencies of caffeic acid and its alkyl esters and their concentrations in the interfacial region of olive oil emulsions. the pseudophase model interpretation of the 'cut-off' effect," *Food Chem*, vol. 175, 2015.
263. M. Bonnet, M. Cansell, F. Placin, E. David-Briand, M. Anton, and F. Leal-Calderon, "Influence of Ionic Complexation on Release Rate Profiles from Multiple Water-in-Oil-in-Water (W/O/W) Emulsions," *J Agric Food Chem*, vol. 58, no. 13, pp. 7762–7769, 2010.
264. M. Guttoff, A. H. Saberi, and D. J. McClements, "Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: Factors affecting particle size and stability," *Food Chem*, vol. 171, pp. 117–122, 2015.
265. A. H. Saberi, Y. Fang, and D. J. McClements, "Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: Factors affecting particle size using spontaneous emulsification," *J Colloid Interface Sci*, vol. 391, pp. 95–102, 2013.
266. D. J. McClements, "Emulsion Design to Improve the Delivery of Functional Lipophilic Components," *Annu Rev Food Sci Technol*, vol. 1, no. 1, pp. 241–269, Mar. 2010.
267. C. Qian and D. J. McClements, "Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size," *Food Hydrocoll*, vol. 25, no. 5, pp. 1000–1008, 2011.
268. Y. Burakova, J. Shi, and J. R. Schlup, "Impact of oil composition on formation and stability of emulsions produced by spontaneous emulsification," *J Dispers Sci Technol*, vol. 38, no. 12, pp. 1749–1754, 2017.
269. T. J. Wooster, M. Golding, and P. Sanguansri, "Impact of Oil Type on Nanoemulsion Formation and Ostwald Ripening Stability," *Langmuir*, vol. 24, no. 22, pp. 12758–12765, 2008.
270. V. Polychniatou and C. Tzia, "Study of the Emulsifying Ability of Olive Oil Endogenous Compounds in Co-surfactant Free Olive Oil w/o Nanoemulsions with Food Grade Non-ionic Surfactants," *Food Bioprocess Technol*, vol. 9, no. 5, pp. 882–891, 2016.
271. R. G. Kelmann, G. Kuminek, H. F. Teixeira, and L. S. Koester, "Carbamazepine parenteral nanoemulsions prepared by spontaneous emulsification process," *Int J Pharm*, vol. 342, no. 1, pp. 231–239, 2007.
272. L. S. Romsted, "Introduction to Surfactant Self-Assembly," in *Supramolecular Chemistry*, vol. 1, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2012.
273. P. Gruner *et al.*, "Controlling molecular transport in minimal emulsions," *Nat Commun*, vol. 7, no. 1, p. 10392, 2016.
274. A. S. Kabalnov, "Can Micelles Mediate a Mass Transfer between Oil Droplets?," *Langmuir*, vol. 10, no. 3, pp. 680–684, 1994.
275. N. Malassagne-Bulgarelli and K. M. McGrath, "Dynamics of oil transfer in oil-in-water emulsions," *Soft Matter*, vol. 5, no. 23, p. 4804, 2009.
276. M. E. Erdmann, B. Zeeb, H. Salminen, M. Gibis, R. Lautenschlaeger, and J. Weiss,

"Influence of droplet size on the antioxidant activity of rosemary extract loaded oil-in-water emulsions in mixed systems," *Food Funct*, vol. 6, no. 3, pp. 793–804, 2015.

277. S. Mannino, O. Brenna, S. Buratti, and M. S. Cosio, "A New Method for the Evaluation of the 'Antioxidant Power' of Wines," *Electroanalysis*, vol. 10, no. 13, pp. 908–912, 1998.
278. G. Korinth, T. Wellner, K. H. Schaller, and H. Drexler, "Potential of the octanol–water partition coefficient (logP) to predict the dermal penetration behaviour of amphiphilic compounds in aqueous solutions," *Toxicol Lett*, vol. 215, no. 1, pp. 49–53, 2012.
279. X. Liu, B. Testa, and A. Fahr, "Lipophilicity and Its Relationship with Passive Drug Permeation," *Pharm Res*, vol. 28, no. 5, pp. 962–977, 2011.
280. A. J. Leo and C. Hansch, "Linear free energy relations between partitioning solvent systems," *J Org Chem*, vol. 36, no. 11, pp. 1539–1544, 1971.
281. J. Sangster, Octanol-Water Partition coefficients, Fundamentals and Physcial Chemistry; J. Wiley & Sons: Chichester, 1997.
282. S. C. Silvério, O. Rodríguez, J. A. Teixeira, and E. A. Macedo, "Gibbs free energy of transfer of a methylene group on {UCON+(sodium or potassium) phosphate salts} aqueous two-phase systems: Hydrophobicity effects," *J Chem Thermodyn*, vol. 42, no. 8, pp. 1063–1069, 2010.
283. S. Losada Barreiro, C. Bravo-Díaz, F. Paiva-Martins, and L. S. Romsted, "Maxima in Antioxidant Distributions and Efficiencies with Increasing Hydrophobicity of Gallic Acid and Its Alkyl Esters. The Pseudophase Model Interpretation of the 'Cutoff Effect,'" *J Agric Food Chem*, vol. 61, no. 26, pp. 6533–6543, 2013.
284. *Decreto-Lei nº 363/98, Diário da Republica - I SÉRIE-A nº 268 - 19-11-1998, Ministério Da Agricultura, Do Desenvolvimento Rural e Das Pescas, Lisboa*.
285. *Decreto-Lei nº 33/2008- Diário da República, 1.ª série — N.º 39 — 25 de Fevereiro de 2008, Ministério Da Agricultura, Do Desenvolvimento Rural e Das Pescas, Aprovado em Conselho de Ministros, Lisboa*.
286. M. J. González, I. Medina, O. S. Maldonado, R. Lucas, and J. C. Morales, "Antioxidant activity of alkyl gallates and glycosyl alkyl gallates in fish oil in water emulsions: Relevance of their surface active properties and of the type of emulsifier," *Food Chem*, vol. 183, pp. 190–196, 2015.
287. H. T. Osborn and C. C. Akoh, "Effect of emulsifier type, droplet size, and oil concentration on lipid oxidation in structured lipid-based oil-in-water emulsions," *Food Chem*, vol. 84, no. 3, pp. 451–456, 2004.
288. M. Kargar, F. Spyropoulos, and I. T. Norton, "The effect of interfacial microstructure on the lipid oxidation stability of oil-in-water emulsions," *J Colloid Interface Sci*, vol. 357, no. 2, pp. 527–533, 2011.
289. C. Sun and S. Gunasekaran, "Effects of protein concentration and oil-phase volume fraction on the stability and rheology of menhaden oil-in-water emulsions stabilized by whey protein isolate with xanthan gum," *Food Hydrocoll*, vol. 23, no. 1, pp. 165–174, 2009.
290. M. Costa, S. Losada-Barreiro, F. Paiva-Martins, C. Bravo-Díaz, and L. S. Romsted, "A direct correlation between the antioxidant efficiencies of caffeic acid and its alkyl esters and their concentrations in the interfacial region of olive oil emulsions. the pseudophase model interpretation of the 'cut-off' effect," *Food Chem*, vol. 175, 2015.