

Marlene Andreia Pereira Costa

Determinação Quantitativa da Distribuição de Antioxidantes em emulsões óleo/água e Correlação com a sua Capacidade Antioxidante



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
SETEMBRO/2012

Marlene Andreia Pereira Costa

Determinação Quantitativa da Distribuição de Antioxidantes em emulsões óleo/água e Correlação com a sua Capacidade Antioxidante



Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção do grau de Mestre em Química

Composição do Júri:

Maria Clara Ramalho Monteiro Pires Basto, Professora Auxiliar do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (Representante da Comissão Científica do 2º Ciclo de Estudos em Química) – Presidente;

Sonia Losada Barreiro, Investigadora do Departamento de Química Física da Faculdade de Química da Universidade de Vigo;

Nuno Filipe Batista Mateus, Professor Associado do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto;

Maria de Fátima Azevedo Brandão Amaral Paiva Martins, Professora Auxiliar do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (Orientadora).

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO
SETEMBRO/2012



AGRADECIMENTOS

À Professora **Doutora Fátima Paiva-Martins**, orientadora deste projeto, pelo enorme e incansável apoio, pelos seus ensinamentos, paciência e disponibilidade que teve para comigo ao longo deste último ano. Por toda a dedicação que apresentou para que o trabalho corresse muito bem, um enorme obrigado.

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

Aos meus colegas de laboratório, Aníbal Silva, Vasco Almeida e Sandra Costa, por toda a ajuda que deram a integrar-me no laboratório nos primeiros tempos de trabalho.

A todos os meus colegas que dentro e fora do ambiente da faculdade, sempre me ajudaram imenso e apoiaram-me em todas as decisões que tomei ao longo destes anos.

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

RESUMO

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 solubilidades diferentes, mas que possuam atividade antiradicalar semelhante. Deste modo, neste trabalho foram sintetizados vários ésteres do ácido cafeico de álcoois saturados com diferentes tamanhos da cadeia alquila (C1 a C16). Efetuou-se a síntese destes compostos a partir dos monomalonatos derivados dos álcoois por condensação de Knoevenagel modificada por Verley-Doebner com o derivado benzaldeído apropriado. Os rendimentos obtidos situaram-se entre 39 e 88 %, dependendo do composto sintetizado. Verificou-se que a utilização da temperatura de reação de 40°C e 60°C diminuiu o tempo necessário de reação entre o 3,4 dihidroxibenzaldeído e o malonato monohexilo de 15 dias (temperatura ambiente) para 7 e 1 dia, respetivamente.

Os antioxidantes utilizados na estabilização das emulsões alimentares podem encontrar-se não só nas fases oleosa e aquosa, como também na interfase. Neste trabalho utilizou-se um método cinético que não requer o isolamento das fases para estimar as constantes de partição do ácido cafeico e seus ésteres, tendo sido possível obter uma boa estimativa das duas constantes de partição que descrevem a distribuição do antioxidante entre as regiões oleosa / interfásica (P_O^I) e aquosa / interfásica (P_A^I) de emulsões azeite/ Tween 20/ água. Este método é baseado no modelo da pseudofase para emulsões termodinamicamente estáveis, o qual explora a reação entre o ião 4- hexadecilbenzenodiazónio, localizado exclusivamente na interfase, e o antioxidante. A constante de velocidade (k_{obs}) da reação foi monitorizada através de um modelo de derivatização baseada na reação dos iões arenodiazónio, que não reagem com o antioxidante, com um agente copulante adequado (NED), produzindo um corante azóico estável.

Verificou-se que, para os ésteres do ácido cafeico, a hidrofobicidade aumenta com o aumento da cadeia alquila, refletido pelo aumento das constantes de partição P_A^O , em sistemas binários azeite/água.

O ácido cafeico distribui-se apenas nas regiões aquosa e interfásica, apresentando apenas uma constante de partição com um valor de $P_A^I = 349,15$. Os cafeatos de metilo e etilo distribuem-se pelas regiões oleosa, interfásica e aquosa, apresentando duas constantes de partição, P_A^I e P_O^I , tendo-se obtido um valor de $P_A^I = 719,93$ e $3155,71$, e um valor de $P_O^I = 311,73$ e $404,58$, para o derivado cafeiato de metilo e etilo, respetivamente. Os derivados

cafeiato de propilo, octilo e hexadecilo encontram-se distribuídos nas regiões oleosa e interfásica, apresentando apenas uma constante de partição, tendo-se obtido um valor de P_O^I de 454,12, 501,79 e 376,44, respetivamente. Assim, a partir dos valores de P_A^I e P_O^I , foi possível calcular as percentagens do ácido cafeico e seus ésteres em cada fase das emulsões azeite/ Tween20/ água. Dependendo da fração de emulsionante utilizada, a percentagem de ácido cafeico na interfase variou entre 70- 90 %, encontrando-se a restante quantidade de composto apenas na fase aquosa. Relativamente aos cafeiados de metilo e etilo, os valores percentuais na interfase variaram entre 70-95 %, distribuindo-se o remanescente dos compostos na fase aquosa e oleosa. Para os cafeiados de propilo, octilo e hexadecilo, as percentagens na interfase variaram entre 83-98 %, 85-99% e 80-98%, respetivamente, com a restante quantidade de cada composto localizado apenas na fase oleosa. Com o aumento da cadeia alquilo, observou-se uma tendência crescente do valor de P_O^I , sendo este máximo para o cafeiato de octilo, diminuindo ligeiramente para o cafeiato de hexadecilo.

A avaliação da eficiência antioxidante destes compostos efetuou-se através do teste do DPPH e de testes da estufa de Schaal, com e sem iniciador radicalar.

Através do teste do DPPH verificou-se que, em solução metanólica, ao fim de 5 minutos não existem diferenças significativas na atividade antirradicalar do ácido cafeico e seus derivados frente a este radical, consequência da estrutura fenólica comum a todos eles. Esta semelhança na reatividade mostra que a possível diferença na atividade antioxidante destes compostos em emulsões poderá então dever-se à diferente distribuição destes pelas várias fases que as compõem.

Avaliou-se a eficácia antioxidante dos diversos compostos em emulsões através do teste da estufa de Schaal, verificando-se que esta aumentou acentuadamente com a esterificação do ácido cafeico. A capacidade antioxidante aumentou do cafeiato de metilo até ao cafeiato octilo, diminuindo um pouco para os derivados com cadeias alquilo superiores. Assim, a ordem de eficácia, não obedeceu ao paradoxo polar.

Verificou-se que a atividade antioxidante é superior para o composto que apresentou o maior valor de P_O^I .

Contrariamente ao esperado, a estabilidade das emulsões diminuiu com o aumento da percentagem de emulsionante para alguns dos antioxidantes testados. Embora ocorra um aumento da quantidade do antioxidante na interfase com o aumento da quantidade de emulsionante, ocorre igualmente uma diluição do antioxidante que se encontra na interfase. O resultado da atividade antioxidante dependerá assim, por um lado, de um balanço entre o aumento da quantidade do antioxidante na interfase e, por outro, da diluição que ocorre.

ABSTRACT

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 were synthesized some esters of caffeic acid and saturated alcohols with different alkyl chains size (C1 to C16). The synthesis of these compounds was performed from monomalonates obtained previously from alcohols, through Verley-Doebner modification of Knoevenagel condensation, with the appropriate benzaldehyde derivative. Typical yields ranged from 39% to 88% depending on the particular compound. The time required for the reaction between the 3, 4 dihydroxybenzaldehyde and the monohexyl malonate was reduced from 15 days, at room temperature, to 7 and 1 day when 40°C and 60°C was used, respectively.

In this work, a kinetic method that does not require isolation of phases was employed to estimate the partition constants of AO between the oil /interfacial, P_O^I , and the aqueous/interfacial, P_W^I , regions of the oil /tween 20/acidic water emulsions. This method is grounded 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 is monitored by employing a derivatization method based on the rapid reaction of ArN_2^+ ions with a suitable coupling agent such as NED yielding a stable azo dye.

The hydrophobicity of the caffeic acid derivatives increases upon increasing the length of the alkyl chain, as indicated by P_W^O values in binary oil / water systems. The antioxidants can be located in the oil, aqueous and interfacial regions of emulsions.

Caffeic acid is only distributed between the aqueous and interfacial regions, with a single constant partition, $P_W^I = 349.15$. Methyl caffeate and ethyl caffeate were located in the oil, aqueous and interfacial regions, presenting two partition constants, P_W^I and P_O^I , yielding a value of $P_W^I = 719.93$ and 3155.71, and a value of $P_O^I = 311.73$ and 404.58 for methyl and ethyl caffeates, respectively. The more hydrophobic derivatives (propyl, hexadecyl and octyl caffeates) only have a partition between the oil and interfacial regions, and the determined values were $P_O^I = 454.12$, 501.79 and 376.44, respectively.

Depending on the emulsifier volume fraction used, the percentage of caffeic acid in the interfacial region ranges 70-90%, with the remaining amount in the aqueous region. Percentages of methyl caffeate and ethyl caffeate in the interfacial region range 70% - 95%,

while the remaining amount of the compounds were distributed in the aqueous and oil regions. For the propyl, hexadecyl and octyl caffeates, percentages in interfacial region range 83-98%, 85-99% and 80-98% respectively, with the remaining amount in the oil phase.

P_O^I increases on going from methyl caffeate, to octyl caffeate, reaching a maximum value for octyl caffeate, decreasing slightly upon increasing the length of the alkyl chain.

The evaluation of the antioxidant efficiency of these compounds was carried out by the DPPH Test and by the Schaal Oven Test with or without radical initiator.

The results obtained by the DPPH test shows that in methanolic solution, after 5 minutes of reaction, there is no significant difference in the radical scavenging activity of caffeic acid and derivatives, as a consequence of their similar phenolic moiety. This similar radical scavenging activity for caffeic acid derivatives against DPPH radicals in solution demonstrates that the difference in the antioxidant activity of these compounds in emulsions there is likely to be a consequence of the different distribution in the various regions of the emulsion.

The antioxidant efficacy of caffeic acid and their esters in emulsions were also evaluated by the Schaal oven test. It was observed that the antioxidant efficiency increased markedly with the esterification of caffeic acid, from C1 to the C8 derivative, decreasing slightly for the C12-C16. Therefore, the order of effectiveness obtained is not consistent with the predictions of the polar paradox. It was verified that the antioxidants with an higher P_O^I were presented in an higher percentage in the interfacial region of the emulsions, showing a better antioxidant activity.

In contrast with our expectations, the emulsions stability decreased with the increasing emulsifier concentration in the emulsions for some of the tested antioxidants. Although there is an increased amount of antioxidant in the interfacial region with the increasing amount of emulsifier, there is also a dilution of the antioxidant located at the interfacial region. The antioxidant activity will thus depend on the balance between the increasing amount of the antioxidant at the interfacial region on one hand, and on the dilution that occurs on the other hand.

RESUMÉ

Nombreux antioxydants ont des solubilités très élevées dans l'eau, ce qui limite son activité antioxydant dans les systèmes d'émulsion en raison apparemment du fait qu'ils sont en forte proportion dans la phase aqueuse. Ainsi, il est apparu nécessaire de trouver de nouveaux antioxydants avec des caractéristiques de solubilité différentes, mais ayant une activité antiradicalaire similaire. Ainsi, cette étude ont été synthétisés différents esters de l'acide caféique et les alcools saturés à chaîne ayant des tailles différentes (C1 à C16). On a effectué la synthèse de ces composés monomalonates dérivés d'alcools par condensation de Knoevenagel modifié Doebner-Verley avec le dérivé benzaldéhyde approprié. Les rendements obtenus se situaient entre 39 et 88% en fonction du composé synthétisé. Il a été constaté que l'utilisation de la température de réaction de 40 ° C et 60 ° C réduit le temps nécessaire à la réaction entre 3,4 et dihydroxybenzaldehyde malonate monohexyl 15 jours (température ambiante) pendant 7 et 1 jour respectivement.

Les antioxydants utilisés dans la stabilisation des émulsions alimentaires peuvent être trouvées non seulement dans les phases huile et d'eau ainsi que l'interphase.

Dans cette étude nous avons utilisé une méthode cinétique qui ne nécessite pas l'isolement des phases d'estimer la partition constante entre les phases de l'huile antioxydantes, interfaciale et aqueuse. Cette méthode est basée sur l'application de la réaction entre 4 – hexadecilbenzenodiazonio 4-ion, exclusivement situées à l'interface, et un antioxydant. La constante de vitesse (k_{obs}) de la vitesse de réaction a été contrôlée en utilisant une méthode de dérivation sur la base arènediazonium capture d'ions réagissent pas, les transformant et une azoïques colorant violet.

Pour les dérivés de l'acide caféique, on peut voir que les augmentations à l'hydrophobie de la chaîne alkyle en tant que valeur pour leurs constantes de partage P_W^O , dans des systèmes binaires d'huile / eau augmente avec la chaîne alkyle en augmentation.

La valeur obtenue pour l'acide caféique P_W^I était 349,15, pour caffeate de méthyle pour caffeate de éthyl deux constantes de partage, de P_W^I et P_O^I , car ce composé est distribué à travers les trois phases du système, en interphase huileux et aqueux, les $P_W^I = 719,93$ et 2155,71, et la valeur était $P_O^I = 311,73$ et 404,58 pour C1 et C2 respectivement. Pour les dérivés caffeate propyle, hexadécyle octyl et la valeur obtenue était P_O^I 454,12, 501,79 et 376,44 respectivement.

Les pourcentages de l'acide caféique en interphase varie entre 70-90% avec le montant restant d'uniquement composé la phase aqueuse. Le pourcentage de méthyle caffeate en 'interphase varie entre 70-95% avec le montant restante du composé distribué dans la phase aqueuse et huileuse. Pour les dérivés propyle, hexadécyle et octylo, les pourcentages dans l'interphase varie entre 83-98%, 85-99% et 80-98% respectivement, avec le montant restant d'uniquement composé dans la phase huileuse.

A été observée pour les esters de l'acide caféique est une valeur tendance croissante P_O^I de C1, mentir à son cafeiato maximale octyle, cette valeur diminue légèrement à hexadecyl cafeiato.

L'évaluation de l'efficacité antioxydant de ces composés a été réalisée par le test DPPH, et Test Four Schaal avec ou sans démarreur radicale.

Les résultats obtenus par le test DPPH, dans les spectacles solution méthanoïque c'est, au bout de 5 minutes, il n'ya pas de différence significative de l'activité de l'acide caféique et ses dérivés antirradicalar de celle-ci en face de la DDPH hydrophobe, la conséquence de la structure phénolique commun à tous. Une réactivité similaire des dérivés de l'acide caféique rapport aux radicaux DPPH en solution montrent possible que la différence dans l'activité antioxydant de ces composés dans des émulsions peut alors être due à la différence dans la distribution probable des différentes phases qui les composent.

Nous avons évalué l'efficacité antioxydant de différents composés dans des émulsions par essai au four Schaal, la vérification de l'efficacité qui augmente nettement l'estérification de l'acide caféique. Cependant, cette augmentation de puissance de la capacité antioxydant accrue de C1 à C8 et le dérivé diminution légèrement plus élevé pour les produits dérivés avec des chaînes alkyles, si l'ordre d'efficacité n'est pas compatible avec les prédictions obtenu du paradoxe polaire.

Il a été vérifié que les antioxydants également avec une plus grande P_O^I étaient présents dans le plus grand pourcentage dans la région interfaciale des émulsions présentant une meilleure activité antioxydant.

Contrairement aux attentes de la stabilité des émulsions diminue avec augmentation de pourcentage d'émulsifiant pour certains des antioxydants testés. Bien qu'il y ait une quantité accrue d'antioxydants dans l'interphase avec une quantité croissante d'émulsifiant, est également une dilution d'antioxydant qui est en interphase. Le résultat de l'activité antioxydant dépendra de l'équilibre entre donc augmentation de la quantité de l'antioxydant à l'interface d'une part, et la dilution qui se produit de l'autre côté.

Índice

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT.....	VII
RESUMÉ	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XIV
ÍNDICE DE TABELAS.....	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIX
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. OXIDAÇÃO LIPÍDICA	22
1.1.1. Decomposição dos hidroperóxidos.....	25
1.1.2. Factores que influenciam a velocidade de oxidação dos lípidos em alimentos.....	27
1.1.3. Oxidação lipídica em emulsões	28
1.1.4. Avaliação da extensão da oxidação lipídica	30
1.2. ANTIOXIDANTES	31
1.2.1. Ácidos fenólicos	34
1.2.2. Derivados do ácido hidroxicinâmico	35
1.2.2.1. Derivados do ácido cinâmico de cadeia alquilo longa	35
1.2.3. Métodos de avaliação da capacidade antioxidante	38
1.2.3.1. Método do DPPH ^[63]	38
1.2.3.2. Teste da estufa de Schall (“Schaal Oven Test”).....	41
1.3. DISTRIBUIÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM EMULSÕES ALIMENTARES	
MODELO	42
1.3.1. A partição de antioxidantes em emulsões.....	42
1.3.2. Método cinético utilizado para determinar a distribuição de antioxidantes em emulsões.....	44
1.3.2.1. Modelo cinético da pseudofase (MCP)	45
1.3.2.2. Simplificação do modelo cinético da pseudofase (MCPS).....	52
2. OBJECTIVO	56
3. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	58
3.1. SÍNTESE DE DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO DE CADEIAS ALQUILO LONGAS	59
3.1.1. Métodos e reagentes	59
3.1.2. Síntese de monomalonatos	61
3.1.2.1. Caracterização espectroscópica dos monomalonatos:.....	62
3.1.3. Síntese de cinamatos de cadeia alquilo longa.....	65
3.1.3.1. Caracterização espectroscópica dos cinamatos de cadeia alquilo longa	66
3.1.4. Estudo da síntese do cafeiato de hexilo a diferentes temperaturas	73

3.2. PURIFICAÇÃO DA FASE OLEOSA A UTILIZAR NA PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES MODELO.....	73
3.2.1. Remoção de compostos fenólicos.....	74
3.2.2. Remoção de tocoferóis	74
3.2.3. Quantificação dos fenóis totais no azeite preparado ^[124]	75
3.3. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE PARTIÇÃO P_A^O DE ANTIOXIDANTES EM SISTEMAS BINÁRIOS AZEITE/ÁGUA.....	75
3.4. DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS ANTIOXIDANTES EM EMULSÕES MODELO.....	77
3.4.1. Preparação da solução de agente copulante N-1- (1-Naftil) etilenodiamina (NED) ..	77
3.4.2. Síntese do sal de arenodiazónio	77
3.4.3. Preparação de soluções	78
3.4.4. Preparação de emulsões	78
3.4.5. Determinação das constantes de velocidade k_{obs} das emulsões.....	79
3.4.5.1. Estudo das condições experimentais: Estudo do efeito da acidez sobre k_{obs}	80
3.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	80
3.5.1. Método do DPPH ^[63]	80
3.5.2. Teste da estufa de Schaal (“Schaal Oven Test”)	81
3.5.2.1. Método Padrão	81
3.5.2.2. Método utilizando AAPH como iniciador radicalar.....	82
3.5.2.3. Determinação do Conteúdo em Dienos Conjugados.....	82
3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	83
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
4.1. SÍNTESE DE MONOMALONATOS	85
4.2. SÍNTESE DE CINAMATOS DE CADEIA LONGA.....	86
4.2.1. Estudo da síntese do cafeiato de hexilo a diferentes temperaturas.....	87
4.3. ESTUDO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS: ESTUDO DO EFEITO DA ACIDEZ SOBRE k_{obs}.....	89
4.4. DISTRIBUIÇÃO DO ÁCIDO CAFEICO E DOS SEUS DERIVADOS EM SISTEMAS BINÁRIOS AZEITE/ ÁGUA	91
4.4.1. Determinação da Constante de Partição P_A^O	91
4.5. DISTRIBUIÇÃO DO ÁCIDO CAFEICO EM EMULSÕES AZEITE/ TAMPÃO CITRATO (O/A).....	92
4.5.1. Determinação de k_{obs} mediante o método de derivatização e cálculo de P_A^I	92
4.5.2. Análise da distribuição do Ácido Cafeico	94
4.6. DISTRIBUIÇÃO DO CAFEIATO METILO EM EMULSÕES AZEITE/ TAMPÃO CITRATO (O/A).....	95
4.6.1. Determinação de k_{obs} mediante o método de derivatização e cálculo de P_O^I e P_A^I	95

4.6.1.1. Constantes de partição obtidas a partir do valor de P_A^O da mistura binária e da variação k_{obs} vs Φ_I para a emulsão 4:6 ou 1:9.	98
4.6.1.2. Constantes de partição obtidas a partir das variações de k_{obs} vs Φ_I para duas emulsões óleo/ água distintas (1:9 e 4:6)	99
4.6.2. Determinação da distribuição do cafeiato de metilo	101
4.7. DISTRIBUIÇÃO DO CAFEIATO ETILO EM EMULSÕES AZEITE/ TAMPÃO CITRATO (O/A).....	102
4.7.1. Determinação de k_{obs} mediante o método de derivatização e cálculo de P_O^I e P_A^I	102
4.7.2. Determinação da distribuição do cafeiato de etilo.....	105
4.8. DISTRIBUIÇÃO DO CAFEIATO DE PROPILO, OCTILO E HEXADECILO EM EMULSÕES AZEITE/ TAMPÃO CITRATO (O/A)	106
4.8.1. Determinação de k_{obs} mediante o método de derivatização e cálculo de P_O^I	106
4.8.2. Determinação da distribuição do cafeiato de propilo, octilo e hexadecilo	109
4.9. ANÁLISE COMPARATIVA DA DISTRIBUIÇÃO DO ÁCIDO CAFEICO E DOS SEUS DERIVADOS	111
4.10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	113
4.10.1. Método DPPH	113
4.10.2. Teste da Estufa de Schaal (“ Schaal Oven Test “)	116
4.10.2.1. Método Padrão	116
4.10.2.2. Método utilizando AAPH como iniciador radicalar.....	120
5. CONCLUSÕES	122
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	125

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Mecanismo de fotoxidação dos sensibilizadores do tipo I.	24
Figura 1-2: Mecanismo de fotoxidação dos sensibilizadores do tipo II.	25
Figura 1-3: Decomposição dos hidroperóxidos em compostos secundários voláteis ^[29]	26
Figura 1-4: Formação de radicais lipídicos catalisada por metais de transição ^[25]	27
Figura 1-5: Emulsões O/A e A/O.	28
Figura 1-6: Fenómeno de interfase para explicar a ação antioxidante em óleo, em emulsões O/A e emulsões A/O, adaptado de ^[29]	29
Figura 1-7: Estabilização do radical fenoxilo por deslocalização eletrônica (R= grupo alquilo).	32
Figura 1-8: Estrutura química dos derivados do ácido benzóico ^[56]	34
Figura 1-9: Estrutura química dos derivados do ácido cinâmico ^[56]	34
Figura 1-10: Síntese de monomalonatos.	36
Figura 1-11: Síntese de derivados do ácido cinâmico, a partir de monomalonatos.	36
Figura 1-12: Mecanismo de síntese da formação de cinamatos através da condensação de Knoevenagel modificada por Verley-Doebner.	37
Figura 1-13: Estrutura química do radical 2,2-difenil-1 -picril-hidrazilo (DPPH [•])	39
Figura 1-14: Vários caminhos possíveis da reação que ocorre entre o DPPH [•] e o antioxidante.	40
Figura 1-15: Mecanismo da reação do DPPH [•] com o antioxidante.	41
Figura 1-16: Representação esquemática da partição de um antioxidante (AO) numa mistura binária (esquerda) e num sistema multifásico (direita).	43
Figura 1-17: Reação do antioxidante com o sal de arenodiazônio.	44
Figura 1-18: Reação de derivatização utilizada.	45
Figura 1-19: Esquema básico das duas pseudofases que compõem um sistema micelar $D_n = [\text{Emulsionante}_{\text{total}}] - \text{CMC}$, representa a concentração de emulsionante micelizado.	45
Figura 1-20: Representação básica das três regiões de uma emulsão que contém um substrato AO, cuja distribuição vem definida pelas constantes de partição P_O^I e P_A^I	46
Figura 1-21: 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 interfase e os índices O, I e A referem-se às regiões orgânica, interfásica e aquosa, respetivamente.	48

Figura 1-22: 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 interfásica e oleosa.....	52
Figura 1-23: 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 interfásica e aquosa.....	54
Figura 3-1: Síntese de monomalonatos.....	61
Figura 3-2: Estrutura numerada dos monomalonatos.....	62
Figura 3-3: Síntese dos cinamatos de cadeia alquila longa.	65
Figura 3-4: Estrutura numerada dos cinamatos de cadeia alquila longa.	66
Figura 3-5: Procedimento experimental seguido para a obtenção de P_A^0	76
Figura 3-6: Síntese do sal de arenodiazônio.	77
Figura 3-7: Estrutura do ácido cafeico, e as suas constantes de ionização.....	80
Figura 4-1: Síntese dos monomalonatos.....	85
Figura 4-2: Síntese de cinamatos de cadeia longa	86
Figura 4-3: Estrutura do ácido cafeico, e as suas constantes de ionização.....	89
Figura 4-4: Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo. Condições experimentais: emulsão 4:6 [azeite/tampão citrato (0,04 M), pH=3,6 (azul), pH=3,0 (verde) e pH=2,5 (cor-de-rosa) / Tween 20], $\Phi_I=0,0047$, $[16\text{-ArN}_2^+]=3,40 \times 10^{-4}$ M, $[AO]=3,5 \times 10^{-3}$ M, $[NED]=0,019$ M e $T=25^\circ\text{C}$	90
Figura 4-5: Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [A_t - A_\infty]$ vs tempo. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/tampão citrato 0,04 M, pH=3,0/ Tween 20), $\Phi_I=0,0136$, $[16\text{-ArN}_2^+]=3,40 \times 10^{-4}$ M $[AO]=3,5 \times 10^{-3}$ M, $[NED]=0,019$ M e $T=25^\circ\text{C}$	92
Figura 4-6: Representação de k_{obs} e $1/k_{\text{obs}}$ vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respectivos ajustes às equações [1.29] e [1.30]. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/ tampão citrato 0,04 M, pH=3,0) / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+]=3,40 \times 10^{-4}$ M $[AO]=3,5 \times 10^{-3}$ M, $[NED]=0,019$ M e $T=25^\circ\text{C}$	93
Figura 4-7: Variação da percentagem de ácido cafeico nas fases aquosa e interfásica do sistema emulsionado. Condições experimentais emulsão 4:6 (azeite/ tampão citrato 0,04 M, pH=3,0) / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+]=3,40 \times 10^{-4}$ M, $[AO]=3,5 \times 10^{-3}$ M, $[NED]=0,019$ M e $T=25^\circ\text{C}$	94
Figura 4-8: Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [A_t - A_\infty]$ vs tempo. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/tampão	

citrato 0,04 M, pH=3,0/ Tween 20), $\Phi_I=0,0274$, $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,40 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 3,5 \times 10^{-3}$ M, $[NED] = 0,019$ M e $T = 25^\circ\text{C}$.	96
Figura 4-9: Representação de k_{obs} e $1/k_{\text{obs}}$ vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respectivos ajustes às equações [1.11] e [1.12]. Condições experimentais: emulsão 1:9 e 4:6 (azeite/tampão citrato 0,04 M, pH=3,0) / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,40 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 3,5 \times 10^{-3}$ M, $[NED] = 0,019$ M e $T = 25^\circ\text{C}$.	97
Figura 4-10: Variação da percentagem de cafeiato de metilo (C1) nas distintas fases do sistema emulsionado. Condições experimentais, emulsões 4:6 e 1:9 (azeite/tampão citrato 0,04M, pH= 3,0/ Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,4 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 3,5 \times 10^{-3}$ M, $[NED] = 0,019$ M, $T = 25^\circ\text{C}$.	101
Figura 4-11: Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [A_t - A_\infty]$ vs tempo, para o cafeiato de etilo. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/tampão citrato 0,04 M, pH=3,0/ Tween 20), $\Phi_I=0,019$, $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,40 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 3,5 \times 10^{-3}$ M, $[NED] = 0,019$ M e $T = 25^\circ\text{C}$.	102
Figura 4-12: Representação de k_{obs} e $1/k_{\text{obs}}$ vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respectivos ajustes às equações [1.11] e [1.12]. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/ tampão citrato, 0,04 M, pH=3,0), $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,40 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 3,5 \times 10^{-3}$ M, $[NED] = 0,019$ M e $T = 25^\circ\text{C}$.	103
Figura 4-13: Variação da percentagem de cafeiato de etilo (C2) nas distintas fases do sistema emulsionado. Condições experimentais, emulsões 4:6 e 1:9 (azeite/tampão citrato 0,04M, pH=3,0/Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,4 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 3,5 \times 10^{-3}$ M, $[NED] = 0,019$ M, $T = 25^\circ\text{C}$	105
Figura 4-14: Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [A_t - A_\infty]$ vs tempo, para o cafeiato de propilo. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/tampão citrato 0,04 M, pH=3,0/ Tween 20), $\Phi_I=0,0092$, $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,4 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 3,5 \times 10^{-3}$ M, $[NED] = 0,019$ M e $T = 25^\circ\text{C}$.	107
Figura 4-15: Representação de k_{obs} e $1/k_{\text{obs}}$ vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respectivos ajustes às equações [1.22] e [1.25], para o C3, C8 e C16. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/ tampão citrato 0,04 M, pH=3,0) / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,4 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 3,5 \times 10^{-3}$ M, $[NED] = 0,019$ M e $T = 25^\circ\text{C}$.	108
Figura 4-16: Variação da percentagem do cafeiato de propilo (vermelho), octilo (azul) e hexadecilo (amarelo) nas fases orgânica e interfásica do sistema emulsionado. Condições experimentais emulsão 4:6 (azeite/ tampão citrato 0,04 M, pH=3,0) / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,4 \times 10^{-4}$ M, $[AO] = 3,5 \times 10^{-3}$ M, $[NED] = 0,019$ M e $T = 25^\circ\text{C}$.	109

Figura 4-17: Variação da percentagem do ácido cafeico e dos seus derivados nas fases orgânica, aquosa e interfásica do sistema emulsionado. Condições experimentais emulsão 4:6 (azeite/ tampão citrato 0,04 M, pH=3,0) / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,4 \times 10^{-4}$ M, $[\text{AO}] = 3,5 \times 10^{-3}$ M, $[\text{NED}] = 0,019$ M e $T = 25^\circ\text{C}$	111
Figura 4-18: Variação da absorvância do radical DPPH ($\lambda = 515$ nm) na presença de diferentes concentrações do cafeiato de propilo -●- 0,063 mol de AO/ mol DPPH, -■- 0,099 mol de AO/mol DPPH, -▲- 0,132 mol de AO/ mol DPPH, -■- 0,165 mol de AO/ mol DPPH, -■- 0,198 mol de Ao/ mol DPPH, -●- 0,231 mol de AO/ mol DPPH e -▲- 0,264 mol de AO/ mol DPPH	113
Figura 4-19: 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).....	114
Figura 4-20: Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0,5% 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 (Azeite: Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,0/ Tween 20), $[\text{AO}] = 0,6$ mM.....	116
Figura 4-21: 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 e letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais, e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: emulsões 4:6 (Azeite/ Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,0/ Tween 20), e $[\text{AO}] = 0,6$ mM.	117
Figura 4-22: 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 (Azeite/ Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,0/ Tween 20) e $[\text{AO}] = 0,6$ mM.	119
Figura 4-23: Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0,5 %de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 1 %. 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 (Azeite/ Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,6/ Tween 20) e $[\text{AO}] = 0,6$ mM.	120

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3-1: Gradiente de eluentes utilizado na análise dos cinamatos por HPLC.	59
Tabela 4-1: Resultados experimentais das sínteses dos monomalonatos	85
Tabela 4-2: Resultados experimentais das sínteses dos cinamatos.....	87
Tabela 4-3: Síntese do cafeiato de hexilo a diferentes temperaturas.	88
Tabela 4-4: Percentagem dos diferentes antioxidantes presentes na fase aquosa e orgânica de uma mistura binária azeite/água e o valor da constante de partição P_A^O e P_O^A	91
Tabela 4-5: Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da <i>Figura 4-6</i> à equação [1.30].	93
Tabela 4-6: Valores de P_A^I e k_I obtidos para a emulsão 4:6 a partir do ajuste dos dados da <i>Figura 4-6</i> à equação [1.30].	94
Tabela 4-7: Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da <i>Figura 4-9</i> à equação [1.12].	97
Tabela 4-8: Valores de P_O^I , P_A^I e k_I obtidos a partir da determinação espectrofotométrica de P_A^O e de vários ensaios (k_{obs} , Φ_I) para emulsões 4:6 e 1:9 (azeite: água), $T = 25^\circ\text{C}$	98
Tabela 4-9: Valores de a , b , P_A^I , P_O^I , k_I e P_A^O obtidos a partir de duas razões óleo/água diferentes (4:6 e 1:9).	100
Tabela 4-10: Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da <i>Figura 4-12</i> à equação [1.12].	104
Tabela 4-11: Valores de P_O^I , P_A^I e k_I obtidos a partir da determinação espectrofotométrica de P_A^O e de vários ensaios (k_{obs} , Φ_I) para uma emulsão 4:6 (azeite: água), $T = 25^\circ\text{C}$	105
Tabela 4-12: Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da <i>Figura 4-15</i> à equação [1.25].	108
Tabela 4-13: Valores de P_O^I e k_I obtidos para a emulsão 4:6 a partir do ajuste dos dados da <i>Figura 4-15</i> à equação [1.25].	109
Tabela 4-14: Valores de P_O^I , P_A^I , k_I e P_A^O , obtidos para o ácido cafeico e seus derivados.	111
Tabela 4-15: Valores de EC_{50} obtidos para diferentes tempos de reação.	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs- Absorvância

AAPH- Dicloridrato de 2,2'-azo-bis- (2-amidinopropano) (2,2'-azobis-2-methyl propanimidamide, dihydrochloride)

Ar[•]-radical aril

AO- Antioxidante

A/O- Emulsão água em óleo

O/A- Emulsão óleo em água

CD- Dienos Conjugados

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

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

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

P_A^O- Constante de partição de um antioxidante entre as regiões aquosa e oleosa

HPLC- Cromatografia líquida de alta eficiência

TLC- Cromatografia em camada fina

IP- Índice de peróxidos

NED- N-1 (1-Naftil) etilenodiamina

PUFA- Ácido gordo monoinsaturado (Monounsaturated Fatty Acid)

UV-Vis- Espectrofotometria do Ultravioleta Visível

MCP- Modelo cinético da pseudofase

MCPS- modelo cinético da pseudofase simplificado

CA- Ácido Cafeico

BHA- Butilhidroxianisol

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

¹H-RMN- Ressonância Magnética Nuclear de Protão

¹³C-RMN- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13

ESI-MS- Espectroscopia Ionização de Massa Electrospray

1. INTRODUÇÃO

1.1. OXIDAÇÃO LIPÍDICA

Os lípidos desempenham um papel importante no que respeita à qualidade de certos produtos alimentares, particularmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis (ex. sabor, cor, textura). Por outro lado, conferem valor nutritivo aos alimentos, constituindo uma fonte de energia metabólica, de vitaminas lipossolúveis (ex. A, D, E e K) e de ácidos gordos essenciais (ex. ácidos linoleico, linolénico e araquidónico) ^[1]. Alguns destes aspetos aplicam-se igualmente a outro tipo de produtos como os cosméticos e os medicamentos.

A oxidação lipídica é um fenómeno espontâneo e inevitável, constituindo a principal causa de deterioração dos corpos gordos (lípidos e matérias gordas) e todos os produtos que a partir deles são formulados (ex. alimentos, cosméticos, medicamentos). Quando afastados do seu contexto de proteção natural, os lípidos sofrem alterações do tipo oxidativo no decurso 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. 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 ^[2-9].

Os fenómenos de oxidação dos lípidos dependem de mecanismos reacionais diversos e 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 interfase entre os lípidos e o oxigénio (fase lipídica contínua, dispersa ou em emulsão), 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 ^[10-12].

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

- a) Reações hidrolíticas (ranço hidrolítico ou lipólise);
- b) Reações com o oxigénio atmosférico (autooxidação e fotooxidação);
- c) Oxidação pelas lipoxigenases.

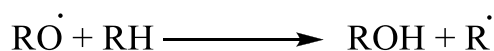
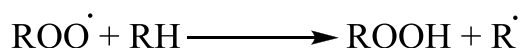
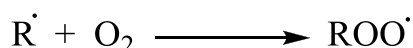
- **Autoxidação**

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 $^3\text{O}_2$ 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 ^[13-18].

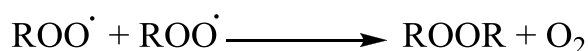
A etapa de iniciação pode surgir através da perda de um radical hidrogénio ($\text{H}^\bullet$) no carbono α de ácidos gordos insaturados (RH), numa reação catalisada por metais, aquecimento ou luz, esquematizada em seguida ^[19]:



Na etapa de propagação, os radicais livres dos ácidos gordos ($\text{R}^\bullet$) reagem com oxigénio molecular para formar radicais livres peroxilo ($\text{ROO}^\bullet$). Por sua vez, estes reagem com novos ácidos gordos para produzir hidroperóxidos e mais radicais livres, desencadeando o mecanismo de propagação, representado nas equações seguintes ^[20]:



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 ^[19-23]:



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 foto-oxidação e a oxidação enzimática também podem alimentar estas reações de auto-oxidação.

- **Fotoxidação**

A fotoxidação lipídica ocorre na presença da luz, de foto-sensibilizadores e do oxigénio atmosférico, produzindo-se oxigénio singlete ($^1O_2$) que reage diretamente com os lípidos insaturados com a formação de hidroperóxidos ^[15]. Este tipo de oxidação não é inibido por antioxidantes primários. Pigmentos como a clorofila e a rivo flavina, contidos em alimentos, servem de foto-sensibilizadores.

Existem dois tipos de sensibilizadores a considerar na foto-oxidação: Tipo I e Tipo II.

- *Sensibilizadores do tipo I:* são aqueles que, quando ativados pela luz ($^3Sens^*$), reagem diretamente com ao substrato lipídico (RH) através do átomo de hidrogénio, ou por transferência eletrónica formando radicais, os quais reagem com o oxigénio (*Figura 1-1*) ^[24].

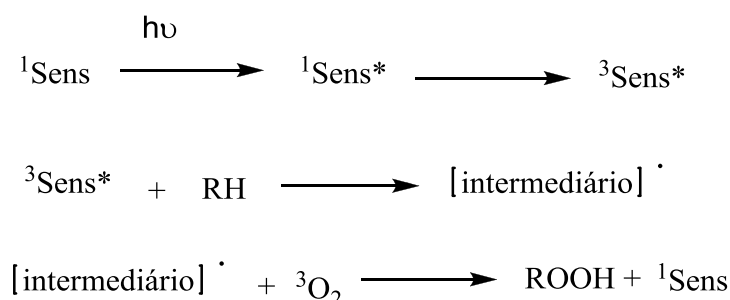


Figura 1-1: Mecanismo de fotoxidação dos sensibilizadores do tipo I.

- *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 (*Figura 1-2*)

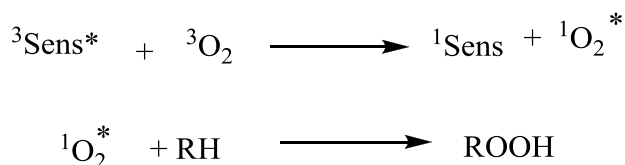


Figura 1-2: Mecanismo de fotoxidação dos sensibilizadores do tipo II.

Fatores como a estrutura do sensibilizador, a concentração e a estrutura do substrato disponível para a oxidação, são fundamentais ^[24].

Os hidroperóxidos formados na fotoxidação são decompostos pelos mesmos mecanismos daqueles formados na autooxidação. No entanto, a produção de hidroperóxidos não conjugados não é observada nesta última.

1.1.1. DECOMPOSIÇÃO DOS HIDROPERÓXIDOS

Os hidroperóxidos denominam-se produtos primários da oxidação. Estes compostos não têm repercussão direta no aroma dos alimentos, pois são inodoros e insípidos. No entanto, dado que são muito instáveis, facilmente se decompõem originando compostos voláteis (aldeídos, álcoois e acetonas) e não voláteis (compostos poliméricos) - produtos secundários da oxidação - principais responsáveis pelo odor a ranço ^[19]. Com a formação destes compostos, a qualidade dos alimentos decresce consideravelmente ^[24]. A *Figura 1-3* é um esquema representativo da decomposição dos hidroperóxidos em compostos voláteis.

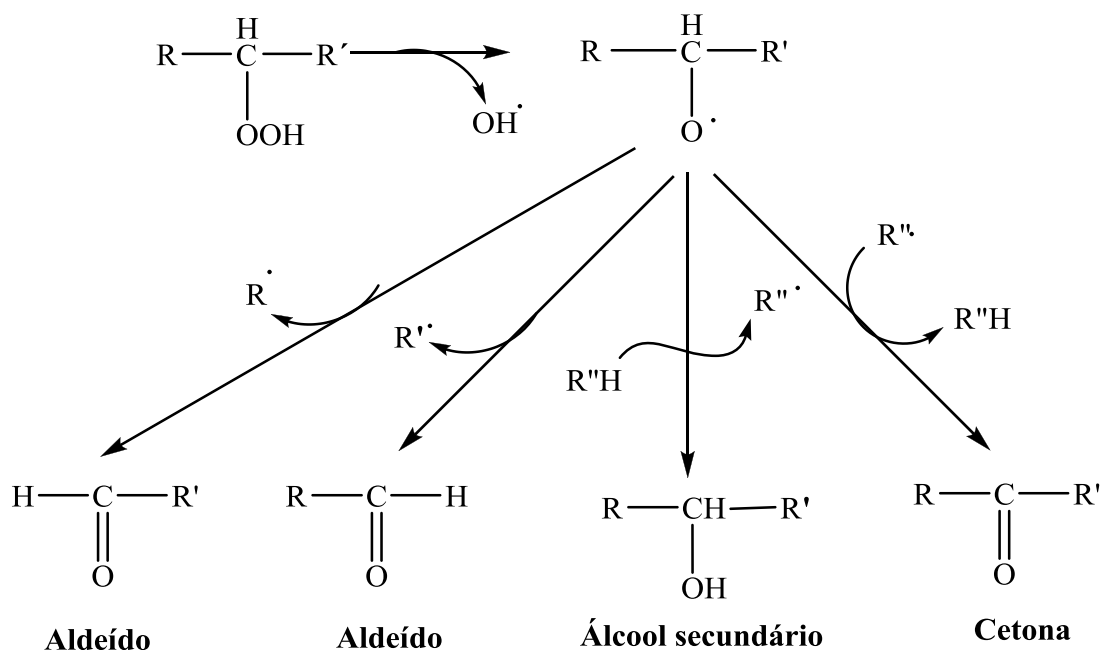


Figura 1-3: Decomposição dos hidroperóxidos em compostos secundários voláteis ^[29].

Com a rutura homolítica da ligação O-O do hidroperóxido, originam-se radicais alcoxilo ($\text{RO}^\bullet$) e hidroxilo ($\text{HO}^\bullet$) muito instáveis. Consoante o local onde ocorre a posterior rutura da cadeia do radical pode formar-se um aldeído volátil de cadeia curta, ou ficar 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 ^[21].

Os álcoois secundários formam-se quando o radical alcoxilo ataca um átomo de hidrogénio de outro ácido gordo insaturado ($\text{R}''\text{H}$), formando-se um novo radical ($\text{R}''^\bullet$).

Outra possibilidade é a reação entre os radicais livres, terminando a reação em cadeia e dando lugar ao aparecimento de cetonas ^[21].

Os metais de transição como o ferro e o cobre, presentes nos óleos e gorduras, também catalisam a decomposição dos hidroperóxidos. Esta decomposição origina novos radicais livres (*Figura 1-4*).

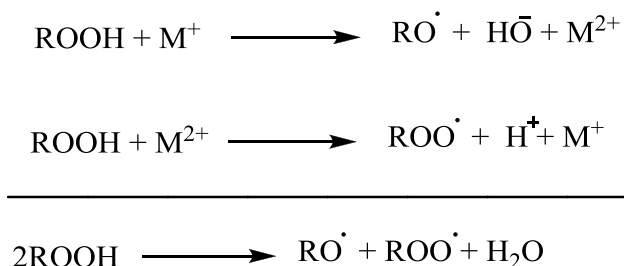


Figura 1-4: Formação de radicais lipídicos catalisada por metais de transição ^[25].

1.1.2. FACTORES 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 e o meio onde esta se encontra.

O número e a natureza das insaturações presentes, o tipo de interfase entre os lípidos e o oxigénio atmosférico, a exposição à luz e ao calor, a presença de pré-oxidantes (ex. iões metálicos de transição) ou de antioxidantes, são fatores determinantes para a estabilidade oxidativa dos lípidos ^[13,16].

Sendo a velocidade de autooxidação 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 relativamente as gorduras de origem animal que, por sua vez, apresentam níveis de ésteres de ácidos gordos saturados mais elevados. No entanto, verifica-se que os óleos tendem a oxidar mais lentamente porque contêm quantidades significativas de tocoferóis, os quais atuam como antioxidantes naturais ^[17].

O mecanismo de oxidação varia com a temperatura. Assim, a temperaturas elevadas as reações de polimerização e ciclização são importantes, mas à temperatura 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 ^[26]. 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 $^3\text{O}_2$ (oxigénio no seu estado fundamental), originando oxigénio singleto ($^1\text{O}_2$) que reage as ligações olefínicas. A prevenção da fotoxidação durante o armazenamento dos alimentos é importante para assegurar a sua elevada estabilidade oxidativa [22].

1.1.3. OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM EMULSÕES

Uma emulsão é um sistema em que dois líquidos imiscíveis (ex. óleo e água) se dispersam um no outro formando pequenas gotículas (*Figura 1-5*). Se o sistema consiste em gotículas de água dispersas num óleo, trata-se de uma emulsão água em óleo (A/O) (ex. margarinas); se pelo contrário, consiste em gotas de óleo dispersas em água, então estamos perante uma emulsão óleo em água (O/A) (ex. sopa).

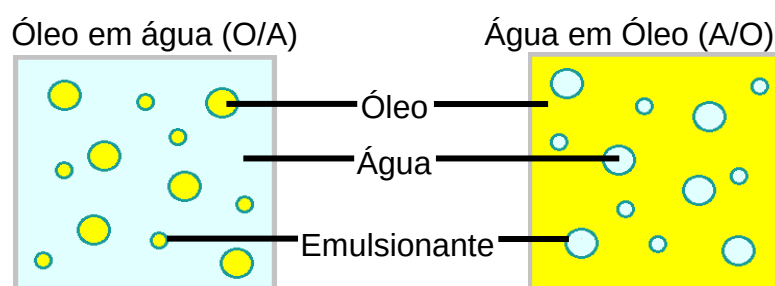


Figura 1-5: Emulsões O/A e A/O.

As emulsões são termodinamicamente instáveis porque requerem energia para aumentar a área de superfície entre as fases oleosa e aquosa. Quando a gordura entra em contato com a água, existe uma grande tensão interfacial entre as fases óleo/água. Para se estabilizar estas emulsões é necessário a utilização de um agente emulsionante. Os agentes emulsionantes atuam na interfase óleo/água, reduzindo esta tensão interfacial e permitindo a

formação de uma emulsão com menor energia interna, aumentando, portanto, sua estabilidade.

A oxidação lipídica em emulsões é bastante complexa e afetada pelo fenômeno interfacial, assim como pelos constituintes antioxidantes e pró-oxidantes presentes tanto nas duas fases, como na sua interfase. Assim, diversos fatores tais como, a presença de metais e outras substâncias, o pH, a pressão de O₂, o tamanho das gotículas, a concentração e a natureza dos emulsionantes, afetam a velocidade de oxidação das emulsões ^[27]. A composição da fase aquosa é outro fator importante na oxidação de emulsões. Assim, os “ingredientes” existentes nesta fase podem atuar como antioxidantes e como pró-oxidantes, dependendo das suas propriedades químicas, das condições ambientais e das suas interações com os componentes lipídicos.

Os antioxidantes que são eficazes nos óleos vegetais são também, normalmente, eficazes em emulsões. No entanto, estes podem exibir afinidades complexas entre as interfases ar-óleo e óleo-água, o que afeta significativamente a sua atividade antioxidante em diferentes sistemas lipídicos ^[28]. Em emulsões O/A, os antioxidantes hidrofílicos são, geralmente, menos eficazes do que antioxidantes lipofílicos, ao contrário do que acontece nas emulsões A/O ou em óleos, em que os antioxidantes hidrofílicos apresentam maior eficácia. Assim, os antioxidantes lipofílicos, como o α -tocoferol e o palmitato de ascorbilo, mostraram ser mais eficazes em emulsões O/A do que só em óleos, enquanto o oposto se verifica para os antioxidantes hidrofílicos, trolox e ácido ascórbico ^[12]. Este aparente paradoxo foi denominado por “Paradoxo Polar” ^[29]. Estas diferenças observadas na eficácia dos antioxidantes foram explicadas pelas suas afinidades à interfase ar-óleo, ao óleo e à interfase O/A das emulsões (*Figura 1-6*).

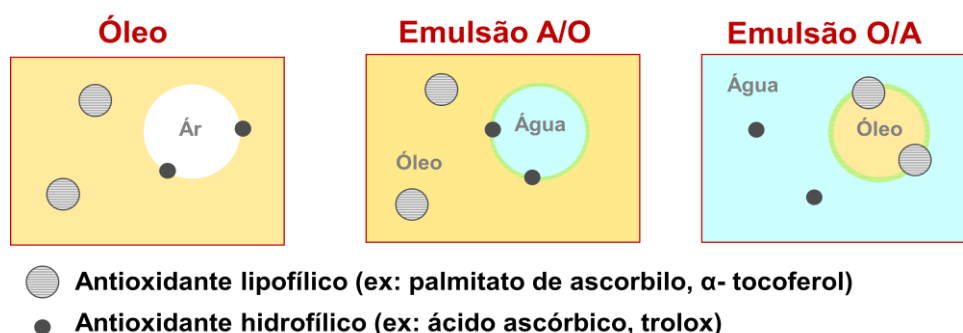


Figura 1-6: Fenômeno de interfase para explicar a ação antioxidante em óleo, em emulsões O/A e emulsões A/O, adaptado de ^[29].

Em sistemas compostos simplesmente por óleo, os antioxidantes hidrofílicos, como os fenóis polares, julgam-se estar orientados para a interfase ar-óleo e, por isso, mostraram conferir uma maior proteção face à oxidação, comparativamente aos lipofílicos, como os tocoferóis, que se encontram em solução e dispersos no óleo. Em contraste, nas emulsões O/A, os antioxidantes mais lipofílicos (mas também com propriedades anfifílicas), como o tocoferol, deverão estar orientados na interfase O/A conferindo uma maior proteção à fase oleosa face à oxidação. Já os antioxidantes hidrofílicos dissolvem-se e diluem-se na fase aquosa. Assim, a formação e decomposição dos hidroperóxidos em emulsões deverá ser dependente das concentrações dos antioxidantes, tanto na fase oleosa e aquosa como na interfase ^[28].

1.1.4. AVALIAÇÃO DA EXTENSÃO DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA

A avaliação do estado de oxidação de óleos e gorduras é bastante importante a nível industrial. Trata-se de um meio que permite 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 ^[12, 15].

Uma das dificuldades na avaliação do grau de oxidação reside na escolha do momento mais adequado para se efetuar essa determinação. Esta não deve ser pontual, isto é, restrita a um determinado momento, mas deve ser efetuada ao longo do tempo de forma a ser representativa da duração de vida do produto ^[30].

Existem vários métodos para medir a extensão de 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.

A determinação do índice de peróxidos (IP) e dos dienos conjugados (CD) são dois dos métodos mais usuais na determinação dos hidroperóxidos.

A oxidação dos PUFA ocorre com a formação de hidroperóxidos, contendo ligações duplas conjugadas (dienes 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) ^[30].

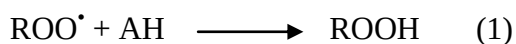
1.2. ANTIOXIDANTES

As gorduras, os óleos e os alimentos com base lipídica deterioram-se tanto por aquecimento como durante o seu armazenamento prolongado. Os principais processos de deterioração devem-se a reações de oxidação e decomposição dos produtos de oxidação, que provocam o aparecimento de aromas e gostos desagradáveis, originando portanto uma importante diminuição do valor nutricional do alimento e da qualidade sensorial do mesmo [31,32]. 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 inibir ou retardar a oxidação lipídica: impedir o acesso ao oxigénio, diminuição da temperatura, inativação das enzimas que catalisam a oxidação, redução da pressão de oxigénio, correto empacotamento, etc. [33,34]. O método de proteção mais eficaz contra a oxidação lipídica é, sem dúvida alguma, o uso de substâncias específicas capazes de inibir as reações de oxidação. A denominação correta destas substâncias é inibidores de oxidação lipídica, conhecidos vulgarmente por antioxidantes. Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes em sistemas lipídicos em pequenas quantidades, impedem ou retardam a sua oxidação, por inibição dos radicais livres ou por interação com estes.

De acordo com a sua natureza, os antioxidantes podem ser classificados em dois grupos:

- Antioxidantes primários ou chain-breaking: os quais reagem com os radicais lipídicos altamente energéticos, convertendo-os em produtos termodinamicamente mais estáveis através da doação do seu hidrogénio aos radicais alquilperóxido ($\text{ROO}^\bullet$) ou alquilo ($\text{RO}^\bullet$) formados durante a iniciação da oxidação lipídica (1 e 2).



Os fenóis são um exemplo deste tipo de antioxidantes. O fenol por si só é inativo, mas a substituição com grupos alquilo nas posições 2,4 ou 6 aumenta a densidade eletrónica no grupo hidroxilo por um efeito indutivo, aumentando deste modo a sua reatividade com o

radical lipídico. O radical fenoxilo assim formado é estabilizado pela deslocalização do elétron desemparelhado no anel aromático como mostra a *Figura 1-7*.

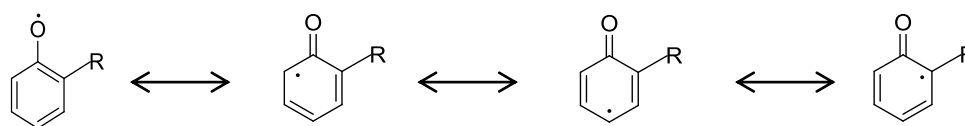
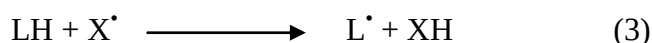


Figura 1-7: Estabilização do radical fenoxilo por deslocalização eletrônica (R= grupo alquilo).

O efeito antioxidante está diretamente relacionado com a estabilidade por ressonância dos radicais fenoxilo.

Os antioxidantes primários reagem com os radicais lipídicos, convertendo-os em produtos mais estáveis, como podemos observar pelas equações que se seguem (3-7):



Os lípidos polinsaturados (LH) podem formar radicais livres ($\text{L}^{\bullet}$) quando se oxidam na presença de um iniciador ($\text{X}^{\bullet}$) (3) (ver oxidação lipídica). Estes radicais alquilo reagem muito rapidamente com o oxigênio, formando radicais peroxilo ($\text{LOO}^{\bullet}$) (4) que, por sua vez, reagem com outras moléculas lipídicas, originando hidroperóxidos (LOOH) (5). Os antioxidantes (AH) inibem a oxidação reagindo com os radicais peroxilo terminando, deste modo, a propagação da cadeia (6), e com radicais alcóxido ($\text{LO}^{\bullet}$) para inibir a sua decomposição e deste modo a formação de compostos indesejáveis, como os aldeídos (7).

Assim, os antioxidantes primários competem com o substrato lipídico, dando origem a um radical ($\text{A}^{\bullet}$) com relativa estabilidade, que pode originar posteriormente produtos não radicalares. O poder antioxidante dos compostos depende de vários fatores, nomeadamente, da sua estrutura, concentração e da temperatura^[35,36]. Assim, existem antioxidantes eficazes a

baixas concentrações, mas que podem exercer uma ação pró-oxidante na presença de elevadas concentrações ^[37]. A sua atividade antioxidante também diminui com o aumento da temperatura ^[38].

- Antioxidantes secundários ou preventivos: reduzem a velocidade do processo de iniciação da oxidação, impedindo ou retardando a formação de radicais livres, resultantes da decomposição dos hidroperóxidos, através de vários mecanismos tais como a complexação de metais e absorção de radiação UV ^[39,40].

A maior parte dos antioxidantes usados comercialmente são compostos fenólicos de origem natural (ex. tocoferóis) ou sintética (ex. BHT, BHA), 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, independentemente da alta estabilidade, baixo custo e outras vantagens tecnológicas ^[41,42].

A realização de diversos trabalhos com extratos de plantas tem permitido isolar e identificar novos compostos com propriedades antioxidantes, a maior parte dos quais apresenta estruturas fenólicas (ex. ácidos fenólicos, flavonoides) ^[43-46]. 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 ^[47].

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

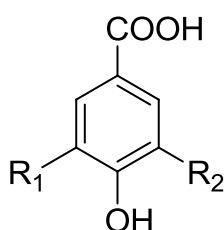
Os ácidos fenólicos do tipo benzóico e cinâmico encontram-se amplamente distribuídos no reino vegetal, fazendo parte do seu sistema antioxidante endógeno ^[48]. Estes compostos encontram-se sobretudo na forma de ésteres de ácidos orgânicos ou de glicosídeos, e raramente como ácidos livres ^[49-54]. Como consequência dessa ubiquidade encontram-se também presentes em muitos alimentos, influenciando de modo significativo algumas das

suas propriedades, nomeadamente as características organolépticas, 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.

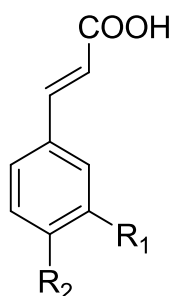
1.2.1. ÁCIDOS FENÓLICOS

Os ácidos fenólicos possuem uma estrutura química básica C_6-C_1 (ácidos benzóicos) ou C_6-C_3 (ácidos cinâmicos) ^[55]. Estes compostos, como o ácido vanílico, sirínico (*Figura 1-8*), *p*-cumárico, cafeico e cinâmico (*Figura 1-9*), são antioxidantes naturais hidrofílicos que ocorrem em frutos, vegetais, especiarias e ervas.



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

Figura 1-8: Estrutura química dos derivados do ácido benzóico ^[56]



R ₁	R ₂	ÁCIDO FENÓLICO
H	H	Ácido cinâmico
H	OH	Ácido <i>p</i> -cumárico
OH	OH	Ácido cafeico

Figura 1-9: Estrutura química dos derivados do ácido cinâmico ^[56].

1.2.2. DERIVADOS DO ÁCIDO HIDROXICINÂMICO

O maior grupo dos ácidos fenólicos (*Figura 1-9*) são os derivados do ácido hidroxicinâmico que são encontrados em quase todas as plantas.

Os ácidos hidroxicinâmicos são de particular interesse devido à sua potencial atividade biológica, tendo sido já demonstrado que podem possuir efeitos antialérgicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antiviral, anticarcinogénicos entre outras.

As funções biológicas de ácidos hidroxicinâmicos estão intrinsecamente dependentes do número e orientação relativa dos substituintes hidroxilo do anel, bem como da presença de cadeias laterais alquil-éster e da sua natureza química e orientação espacial ^[57]. Grupos hidroxilos presentes nos ácidos cinâmicos são muitas vezes associados à sua atividade antioxidante.

No entanto, os ácidos fenólicos têm normalmente solubilidade relativamente baixa em meio aprótico. 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 ^[58].

1.2.2.1. DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO DE CADEIA ALQUILO LONGA

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

A síntese de cinamatos de cadeia alquilo longa pode ser efetuada através da reação condensação de Knoevenagel modificada por Verley-Doebner ^[58].

Nesta via sintética é necessário sintetizar monomalonatos derivados dos álcoois gordos apropriados (*Figura 1-10*), por simples aquecimento dos álcoois gordos com o ácido de Meldrum (2, 2-dimetil-1, 3-dioxano-4, 6-dione) em tolueno.

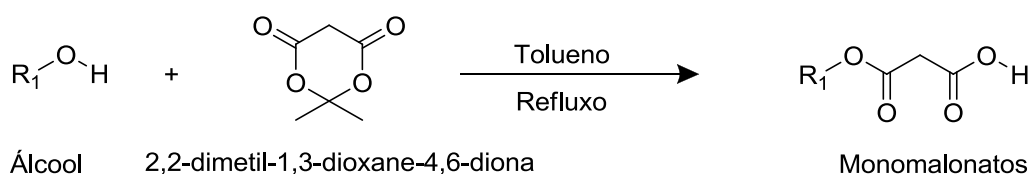


Figura 1-10: Síntese de monomalonatos.

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 1-11*).

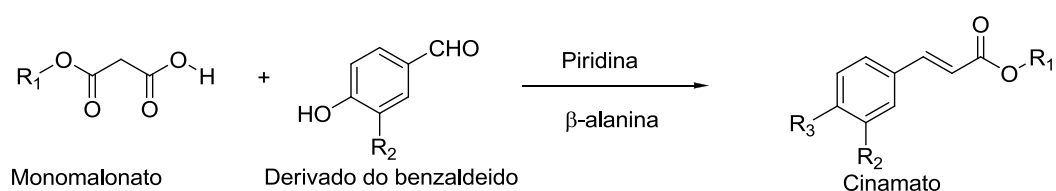


Figura 1-11: Síntese de derivados do ácido cinâmico, a partir de monomalonatos.

O mecanismo proposto para a condensação de Knoevenagel modificada por Verley-Doebner ^[59-61] encontra-se descrito na *Figura 1-12*.

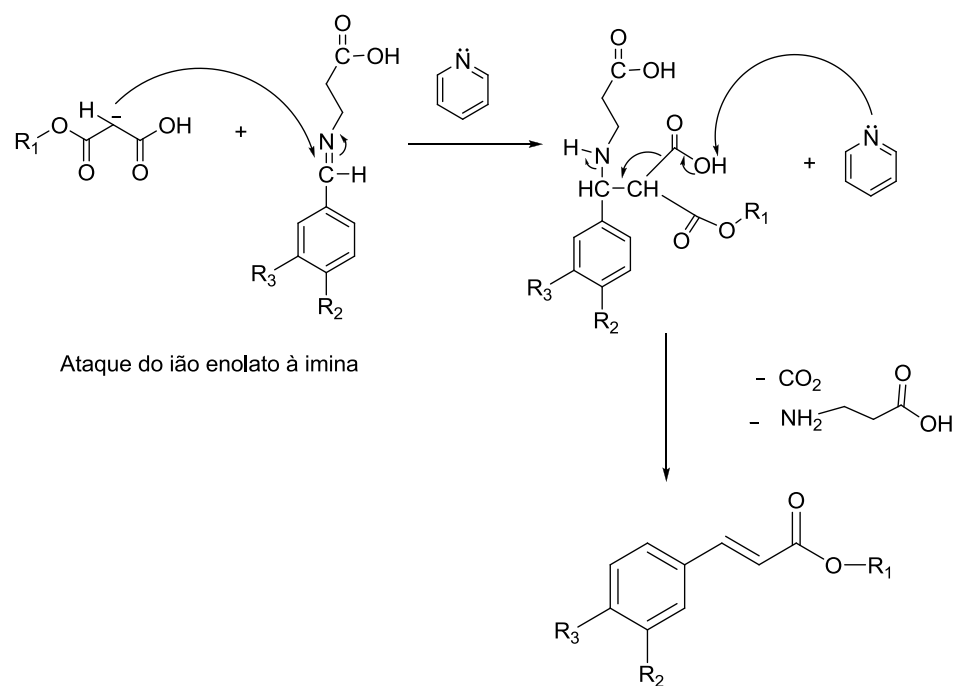
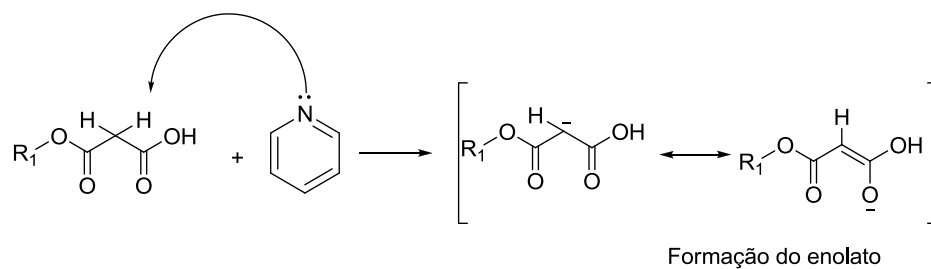
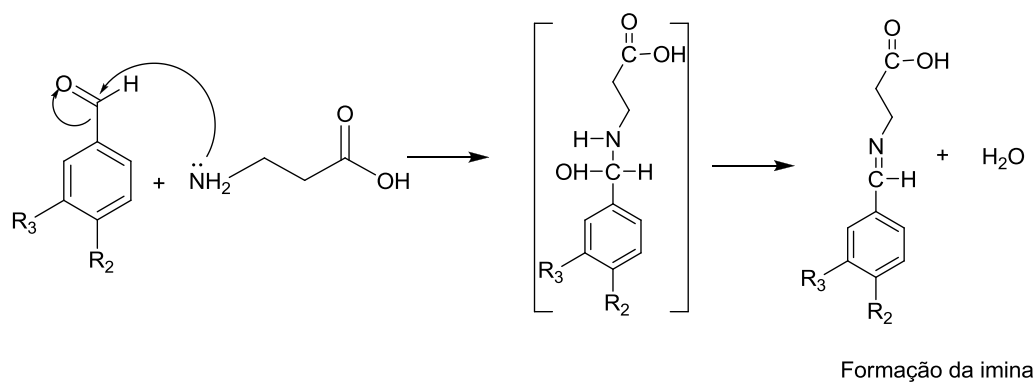


Figura 1-12: Mecanismo de síntese da formação de cinamatos através da condensação de Knoevenagel modificada por Verley-Doebner.

1.2.3. MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

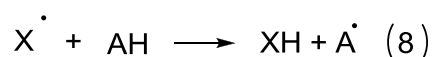
Os métodos para a avaliação da capacidade antioxidante dos compostos nos processos de autooxidação de materiais orgânicos são extremamente importantes quer na Biologia, quer em Química ^[62].

Vários métodos *in vitro* têm vindo a ser desenvolvidos para 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 aos radicais livres, muitas vezes não levam em conta numerosos fatores como sejam a localização física do antioxidante 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. Deste modo, o método escolhido para avaliação da atividade antioxidante dos compostos sintetizados foi o Schall Oven Test aplicado a emulsões.

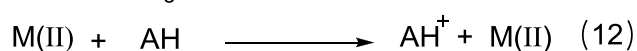
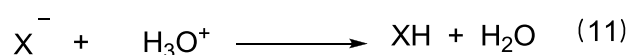
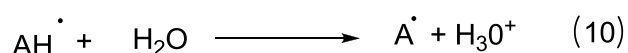
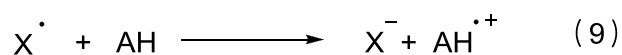
No entanto, uma vez que o objetivo deste trabalho é tentar correlacionar a atividade antioxidante em emulsões com a sua localização, utilizou-se igualmente um método que permite avaliar a reatividade dos antioxidantes frente a radicais livres em solução:

1.2.3.1. MÉTODO DO DPPH ^[63]

Os antioxidantes podem exercer 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 resultado final é o mesmo. As reações de TAH e TE podem ocorrer muitas vezes paralelamente, 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 (EDL) e o potencial de ionização (PI), a solubilidade, o coeficiente de partição e o solvente ^[63-64]. Nos métodos baseados na TAH é medida a capacidade de um antioxidante para neutralizar radicais livres através da doação de um átomo de hidrogénio (eqção1). A reatividade antioxidante baseia-se na competição cinética. Este tipo de reação é independente do solvente e do pH, sendo normalmente rápida.



Os métodos baseados na TE detetam a capacidade que um determinado composto tem para transferir um elétron e, deste modo, reduzir qualquer composto seja ele ião metálico ou um radical ^[35] (Equações 9 a 12).



Este tipo de reações ocorrem normalmente a uma velocidade mais lenta, requerendo assim mais tempo para a sua conclusão, sendo dependente do pH. No entanto, é de salientar que qualquer que seja o caminho reacional, os produtos finais da reação do antioxidante com o radical livre serão iguais.

O método do DPPH[•] é o método mais utilizado para avaliar a capacidade antiradicalar dos compostos através da sua reatividade com um radical livre estável, o 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (Figura 1-13).

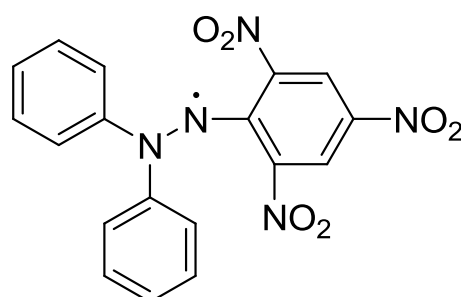


Figura 1-13: Estrutura química do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH[•]).

Acreditou-se durante muito tempo que o teste do DPPH $\cdot$ era um método baseado na TAH (1), mas investigações recentes mostraram outro ponto de vista. Tendo como base a análise cinética da reação entre fenóis (ArOH) e o DPPH $\cdot$ [65], Foti e os seus colaboradores sugeriram que a reação em causa se comporta como uma reação de TE (2). Estes autores descobriram que o passo determinante da velocidade para esta reação consiste num processo de TE rápido, dos aniões fenóxido para o DPPH $\cdot$. Assim, a remoção do átomo de hidrogénio do antioxidante pelo DPPH $\cdot$ é um processo reacional menos importante em solventes que possam formar fortes pontes de hidrogénio (metanol e etanol). Assim, considera-se que, embora o método que utiliza o DPPH $\cdot$ seja classificado como reação de TE, este radical pode ser igualmente neutralizado por TAH [66], (Figura 1-14).

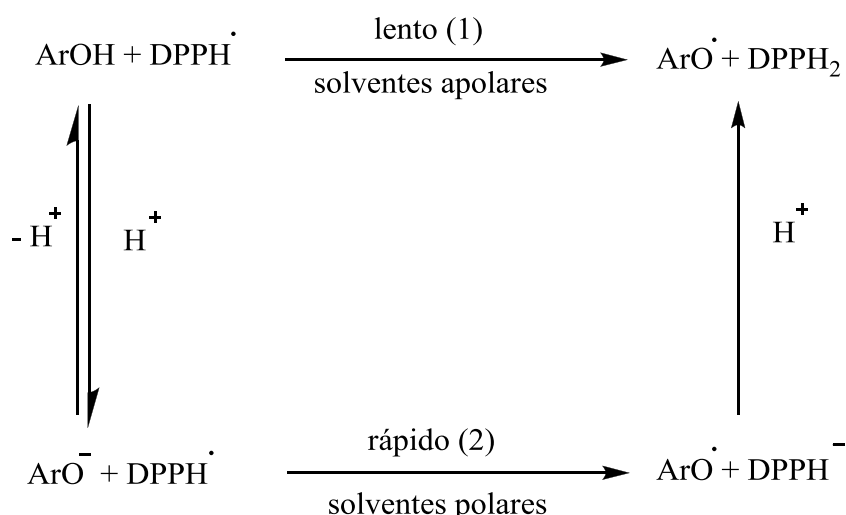


Figura 1-14: Vários caminhos possíveis da reação que ocorre entre o DPPH $\cdot$ e o antioxidante.

O radical DPPH $\cdot$ apresenta um máximo de absorção a 515 nm (soluções metanólicas do radical possuem uma cor violeta forte). Contudo, após redução por um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R $\cdot$) observa-se uma diminuição da absorvância a esse comprimento de onda (descoloração), de acordo com o número de eletrões captados, ou seja, quando o eletrão desemparelhado do átomo de azoto do DPPH $\cdot$ recebe um átomo de hidrogénio, proveniente do composto antioxidante, ocorre mudança de cor (Figura 1-15).



Figura 1-15: Mecanismo da reação do DPPH[•] com o antioxidante.

Para expressar a atividade antiradicalar utiliza-se o EC₅₀, ou seja, a concentração necessária para o antioxidante captar 50% dos radicais iniciais do DPPH[•].

1.2.3.2. TESTE DA ESTUFA DE SCHALL (“SCHAAL OVEN TEST”)

O teste da estufa (“Schaal Oven Test”) é um dos métodos mais utilizados na avaliação da capacidade antioxidante e baseia-se em reações de TAH. Neste teste, as amostras de óleo/gordura contendo diferentes antioxidantes a uma mesma concentração são submetidas à temperatura de 60 °C, e o seu estado de oxidação é examinado a intervalos de tempo regulares, mediante a avaliação sensorial ou da medida do conteúdo em produtos da oxidação [67,68]. 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, assim como de hidrocarbonetos, entre outros (ex. teste da *p* –anisidina) [69]. Os resultados fornecidos por este teste apresentam normalmente boa correlação com a avaliação efetuada nas condições normais de armazenamento dos óleos e gorduras [70-72]. Este método tem vindo mais recentemente a ser aplicado a emulsões [73].

Devido a presença de uma fase aquosa e de uma interfase 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 para os radicais DPPH^{*} anteriormente descrito na *Seção 1.2.3.1*. Assim, espera-se que possam ocorrer os dois tipos de mecanismos, TAH e TE, dependendo da localização do antioxidante a quando da reação com o radical livre.

1.3. DISTRIBUIÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM EMULSÕES ALIMENTARES MODELO

1.3.1. A PARTIÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM EMULSÕES

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:

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

No entanto, a distribuição de um soluto em sistemas multifásicos 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 interfásica (altamente anisotrópica), entre as regiões oleosa e aquosa (fases contínuas). Por este fato, os antioxidantes e outros componentes da emulsão, distribuem-se entre as três regiões mencionadas [74]. Para se definir a distribuição de um antioxidante ou de outros componentes numa emulsão composta pelas regiões interfásica, aquosa e oleosa, *Figura 1-16*, requerem-se duas constantes de partição: a correspondente às regiões oleosa e interfásica, P_O^I , e a outra entre as regiões aquosa e interfásica, P_A^I . Assim o quociente P_A^O , constante de partição, será dado por [75-78]:

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

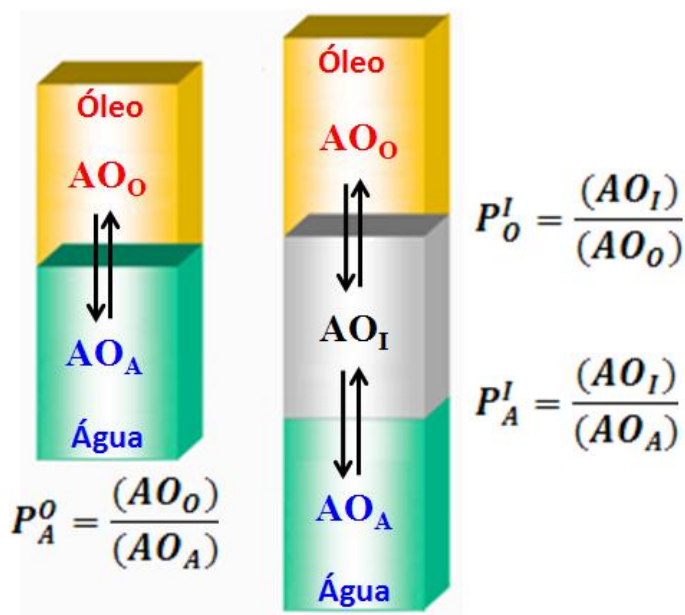


Figura 1-16: Representação esquemática da partição de um antioxidante (AO) numa mistura binária (esquerda) e num sistema multifásico (direita).

A região interfásica não pode ser fisicamente separada das outras duas regiões, o que significa que P_o^I e P_A^I não podem ser calculadas independentemente a partir da determinação da concentração do antioxidante em cada uma das fases ^[79-81]. Deste modo, a determinação da distribuição de antioxidantes em emulsões requer que a determinação das constantes de partição seja feita na própria emulsão.

Têm sido efetuadas numerosas tentativas para determinar a distribuição dos antioxidantes em emulsões alimentares modelo através do isolamento das regiões aquosa e oleosa, com posterior análise da concentração de antioxidante em cada uma das regiões ^[81-87]. Contudo, não se encontra nenhum método disponível aceite para determinar a fração de antioxidante na região interfacial de emulsões o/a. 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 ^[80-82,85,87]. De um modo geral, pode-se afirmar que os solutos se distribuem entre duas fases 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, temperatura, composição e natureza das fases, etc. ^[80].

Sanchez *et al.* ^[89] desenvolveram um método cinético para estimar as constantes de partição de antioxidantes entre as regiões oleosa e interfásica e entre as regiões aquosa e

interfásica 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 hexadecilbenzenodiazônio, 16-ArN_2^+ , e os antioxidantes ^[75,78,89,90,92].

1.3.2. MÉTODO CINÉTICO UTILIZADO PARA DETERMINAR A DISTRIBUIÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM EMULSÕES

O modelo cinético utilizado para determinar a distribuição dos antioxidantes em emulsões baseia-se na determinação da constante de velocidade, k_{obs} , da reação entre o catião de arenodiazônio 16-ArN_2^+ e um antioxidante para diferentes frações de volume do agente emulsionante (*Figura 1-17*).

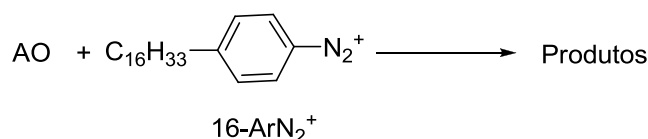


Figura 1-17: Reação do antioxidante com o sal de arenodiazônio.

Está comprovado ^[93-104] que os catiões arenodiazônio reagem facilmente com compostos fenólicos ^[105-107] através de dois mecanismos principais: um por transferência eletrônica, que dá lugar à formação de produtos de redução, e outro por substituição eletrofílica, que dá lugar geralmente à formação de compostos azóicos.

A monitorização desta reação é feita através de uma reação de derivatização que permite a formação instantânea de um corante azóico estável e cuja concentração é proporcional à concentração dos iões arenodiazônio presentes na emulsão, que não reagem ^[76,108-109] (*Figura 1-18*).

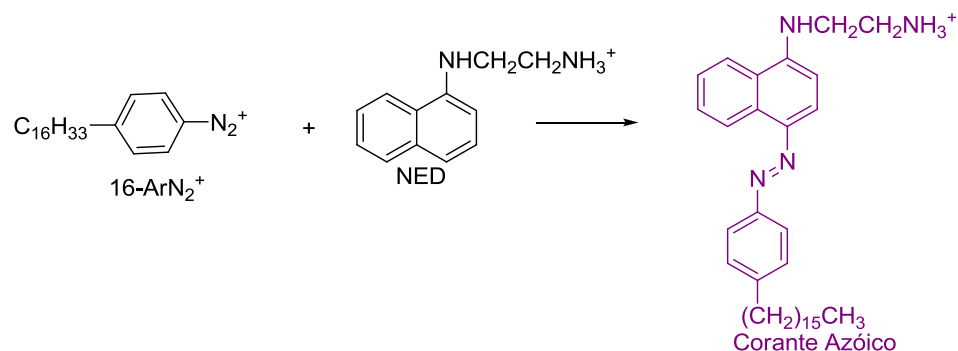


Figura 1-18: Reação de derivatização utilizada.

1.3.2.1. MODELO CINÉTICO DA PSEUDOFASE (MCP)

O modelo cinético da pseudofase (MCP), na sua concepção original [110-114], foi desenvolvido para sistema micelares e basicamente, pressupõe a existência de duas pseudofases distintas (*Figura 1-19*): a pseudofase micelar e a pseudofase aquosa.

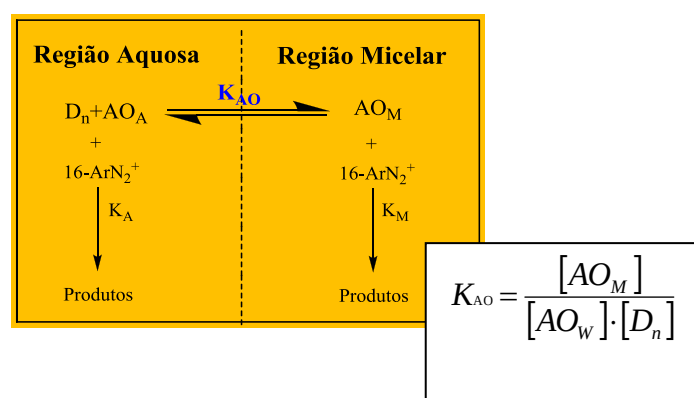


Figura 1-19: Esquema básico das duas pseudofases que compõem um sistema micelar $D_n = [\text{Emulsionante}_{\text{total}}] - \text{CMC}$, representa a concentração de emulsionante micelizado.

Qualquer antioxidante (AO) distribui-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 do antioxidante ao agregado micelar, K_{AO} . Este modelo pressupõe que a distribuição dos antioxidantes é rápida na escala de tempo da sua reatividade química, o que na prática pressupõe considerar que, no caso de existir alguma

reação química, o antioxidante encontra-se em equilíbrio dinâmico durante o percurso da mesma. Como consequência, o antioxidante pode reagir em ambas as pseudofases, sendo a velocidade global da reação a soma das velocidades em cada região.

Qualquer emulsão, na sua forma mais simples, é constituída por três regiões diferentes: a região aquosa, a oleosa e a interfásica (*Figura 1-20*).

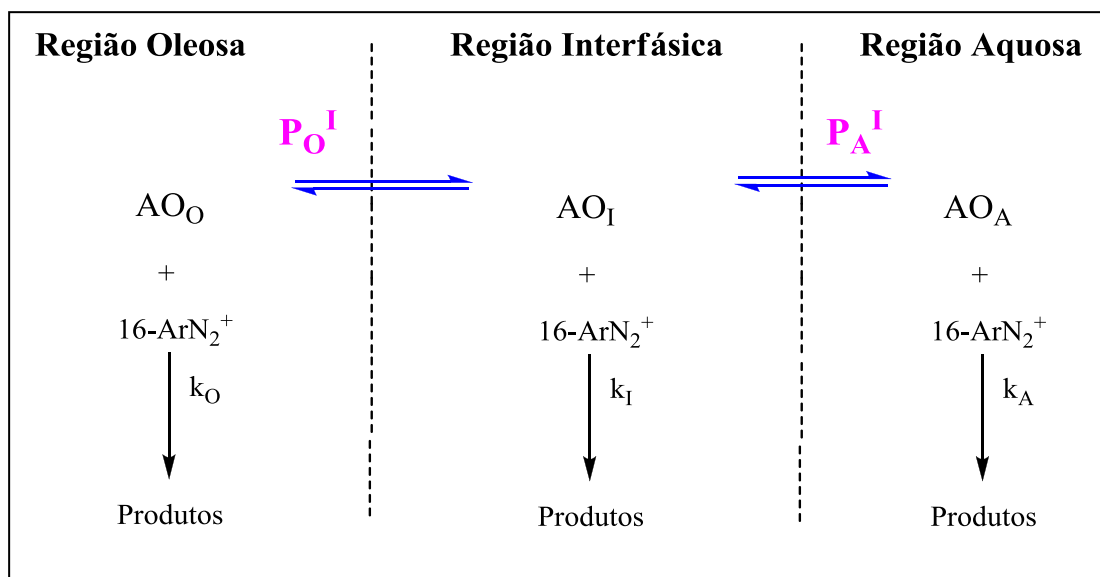


Figura 1-20: Representação básica das três regiões de uma emulsão que contém um substrato AO, cuja distribuição vem definida pelas constantes de partição P_O^I e P_A^I .

O volume da região interfásica é muito menor que o volume das outras regiões e será formado essencialmente pelo emulsionante usado, água e óleo. A região interfásica é, em consequência, altamente anisotrópica. A aplicação das ideias básicas do MCP a sistemas emulsionados pressupõe a aplicação das seguintes hipóteses:

- A velocidade de reação de qualquer antioxidante nas diferentes regiões da emulsão não está limitada pela velocidade de transporte entre as referidas regiões. Esta hipótese supõe, na prática, considerar que os antioxidantes se encontram em equilíbrio dinâmico durante o decorrer de qualquer reação química a que estejam sujeitos.

- A distribuição do antioxidante entre as várias regiões só depende da sua solubilidade relativa em cada uma delas (sempre e quando não se atinja o limite de solubilidade) e é independente de a emulsão ser o/a ou a/o e do tamanho das gotas que compõem a emulsão.

Assim, a distribuição de um antioxidante num sistema emulsionado descreve-se através de duas constantes de partição, uma entre as regiões oleosa-interfásica, P_O^I , e a outra entre as regiões aquosa-interfásica, P_A^I [109], definidas através do quociente entre as concentrações do antioxidante nas várias fases, como mostram as equações [1.1] e [1.2]

$$P_O^I = \frac{(AO_I)}{(AO_O)} \quad [1.1] \qquad P_A^I = \frac{(AO_I)}{(AO_A)} \quad [1.2]$$

onde os parêntesis indicam concentrações em moles por litro no volume da região considerada, e os índices I, O, A representam as regiões interfásica, oleosa e aquosa, respetivamente. Assumindo que todo o emulsionante utilizado se encontra na interfase, os valores numéricos dos volumes destas regiões são idênticos aos valores numéricos dos volumes de azeite, água e emulsionante utilizados na preparação da emulsão [115-120].

De acordo com o modelo cinético, a velocidade de reação entre os iões 16-ArN_2^+ e o antioxidante pode expressar-se pelo somatório das velocidades em cada uma das regiões da emulsão, como mostra a equação [1.3]:

$$\begin{aligned} v &= k \cdot [16 - \text{ArN}_{2T}^+] \cdot [AO_T] = \\ &= k_O \cdot (16 - \text{ArN}_{2O}^+) \cdot (AO_O) \cdot \Phi_O + k_I \cdot (16 - \text{ArN}_{2I}^+) \cdot (AO_I) \cdot \Phi_I + k_A \cdot (16 - \text{ArN}_{2A}^+) \cdot (AO_A) \cdot \Phi_A \end{aligned} \quad [1.3]$$

onde k representa a constante de velocidade, as expressões com parêntesis retos [...] referem-se às concentrações em mol L⁻¹ no volume total da emulsão e as expressões com parêntesis curvos (...) mencionam concentrações em mol L⁻¹ em cada uma das regiões, o índice T indica a quantidade estequiométrica ou total, os índices O, I e A referem-se às regiões orgânica,

interfásica e aquosa respectivamente, Φ é a fração de volume de cada fase e AO é o antioxidante.

Os iões 16-ArN_2^+ são insolúveis tanto em água como em óleo e como o seu local reativo se situa na interfase da emulsão, então a sua concentração nas regiões orgânica e aquosa é desprezável e, em consequência, a reação com o AO terá lugar preferencialmente na região interfásica (*Figura 1-21*).

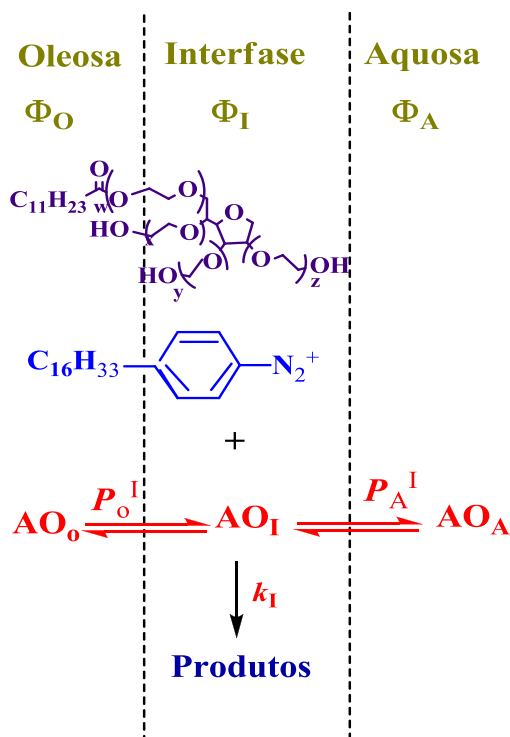


Figura 1-21: Representação esquemática de uma emulsão: Φ indica a fração de volume para cada uma das regiões, AO é o antioxidante, P é a constante de partição, k_I é a constante de velocidade para a reação dos iões 16-ArN_2^+ na interfase e os índices O, I e A referem-se às regiões orgânica, interfásica e aquosa, respetivamente.

Deste modo a *equação [1.3]* pode ser simplificada à *equação [1.4]*:

$$v = k \cdot [16 - \text{ArN}_2^+] \cdot [\text{AO}_T] = k_I \cdot (16 - \text{ArN}_2^+) \cdot (\text{AO}_I) \cdot \Phi_I \quad [1.4]$$

A fração de volume de emulsionante é dada por:

$$\Phi_I = \frac{V_I}{V_O + V_I + V_A} \quad [1.5]$$

onde, V_I , V_A e V_O representam o volume das regiões interfásica, 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:

$$\Phi_O + \Phi_I + \Phi_A = 1 \quad [1.6]$$

O balanço de massas do antioxidante e dos iões arenodiazónio é dado pelas *equações* [1.7] e [1.8]:

$$[AO_T] = \Phi_O(AO_O) + \Phi_I(AO_I) + \Phi_A(AO_A) \quad [1.7] \quad [16 - ArN_{2T}^+] = \Phi_I(16 - ArN_{2I}^+) \quad [1.8]$$

Combinando as *equações* [1.1], [1.2] e [1.7], chega-se à seguinte expressão:

$$(AO_I) = [AO_T] \cdot \frac{P_O^I P_A^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_O^I P_A^I + \Phi_A P_O^I} \quad [1.9]$$

Combinando as *equações* [1.4], [1.8] e [1.9] e tendo presente que se trabalha em condições de pseudo-primeira ordem ($[AO] \gg [16 - ArN_2^+]$), a constante de velocidade observada virá dada pela *equação* [1.10].

$$k_{obs} = k [AO_T] = k_I (AO_I) = \frac{[AO_T] k_I P_A^I P_O^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_A^I P_O^I + \Phi_A P_O^I} \quad [1.10]$$

Matematicamente, a *equação [1.10]* é equivalente á *equação [1.11]*, e o inverso de k_{obs} corresponde à *equação [1.12]*, onde a e b vêm dados pelas *equações [1.13]* e *[1.14]*:

$$k_{obs} = a/(1+b \Phi_I) \quad [1.11]$$

$$1/k_{obs} = 1/a + b/a \Phi_I \quad [1.12]$$

$$b = \frac{P_A^I P_O^I (1 + \Phi_A/\Phi_O)}{P_A^I + \Phi_A/\Phi_O P_O^I} - 1 \quad [1.13]$$

$$a = \frac{[AO]_T k_I P_A^I P_O^I (1 + \Phi_A/\Phi_O)}{P_A^I + \Phi_A/\Phi_O P_O^I} \quad [1.14]$$

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 [1.13]* contém unicamente as constantes de partição e a *equação [1.14]* contém, para além das constantes de partição, a constante de velocidade na interfase 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 [1.13]* 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 [1.1]* e *[1.2]*, representa o valor da constante de partição entre as fases aquosa e oleosa (P_A^O), *equação [1.15]*.

$$P_A^O = \frac{P_A^I}{P_O^I} = \frac{(AO_I)/(AO_A)}{(AO_I)/(AO_O)} = \frac{(AO_O)}{(AO_A)} \quad [1.15]$$

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-azeite na ausência de emulsionante, requerendo apenas o conhecimento de um valor de b (equação 1.13), 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 biomolecular para a reação que tem lugar entre 16-ArN_2^+ e o antioxidante na interfase, utilizando a equação [1.14].

A percentagem de antioxidante presente em cada uma das fases pode ser obtida a partir das equações [1.16] - [1.18].

$$\%AO_I = \frac{100\Phi_I P_A^I P_O^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_A^I P_O^I + \Phi_A P_O^I} \quad [1.16]$$

$$\%AO_O = \frac{100\Phi_O P_A^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_A^I P_O^I + \Phi_A P_O^I} \quad [1.17]$$

$$\%AO_A = \frac{100\Phi_A P_O^I}{\Phi_O P_A^I + \Phi_I P_A^I P_O^I + \Phi_A P_O^I} \quad [1.18]$$

1.3.2.2. SIMPLIFICAÇÃO DO MODELO CINÉTICO DA PSEUDOFASE (MCPS)

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 outra.

Nestes casos, o modelo da pseudofase anteriormente descrito pode simplificar-se ^[108] pressupondo que a concentração de AO numa das regiões é praticamente nula, o que simplifica bastante o tratamento matemático e interpretação dos resultados, uma vez que só é necessário uma constante de partição.

Assim, supondo que a distribuição tem lugar fundamentalmente entre regiões oleosa e interfásica (ou seja, a solubilidade do AO na região aquosa seja nula), a concentração total de AO, definida na *equação* [1.7] reduz-se a *equação* [1.19]:

$$[AO_T] = (AO_I)\Phi_I + (AO_O)\Phi_O \quad [1.19]$$

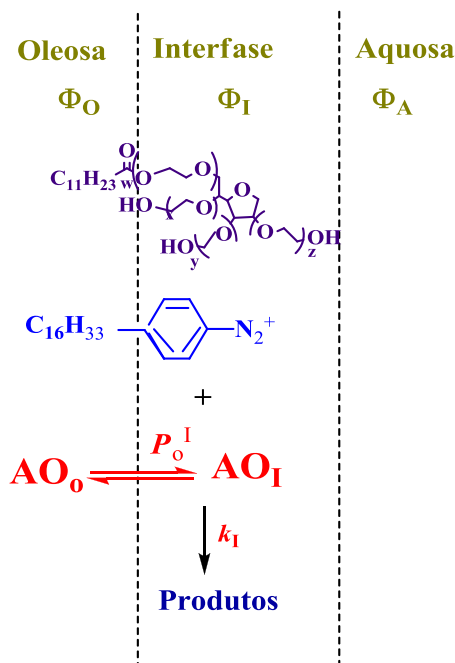


Figura 1-22: Representação esquemática da região interfacial de uma emulsão com base no modelo cinético da pseudofase que mostra a partição do antioxidante, AO, entre as regiões interfásica e oleosa.

Substituindo a *equação [1.2]* na *equação [1.19]* obtém-se a *equação [1.20]*:

$$(AO_I) = \frac{[AO_T]P_O^I}{\Phi_I P_O^I + \Phi_O} \quad [1.20]$$

Substituindo esta *equação [1.8]* obtém-se a expressão que relaciona a constante de velocidade observada com a constante de partição do AO entre as regiões oleosa-interfásica, *equação [1.21]*

$$k_{obs} = \frac{k_I [AO_T] P_O^I}{\Phi_I P_O^I + \Phi_O} \quad [1.21]$$

Matematicamente, a *equação [1.21]* é equivalente à *equação [1.22]*:

$$k_{obs} = \frac{k_I [AO_T] \frac{P_O^I}{\Phi_I}}{1 + \phi_I \frac{P_O^I}{\Phi_O}} = \frac{ab}{1 + b\Phi_I} \quad [1.22]$$

onde os parâmetros a e b são definidos pelas *equações [1.23]* e *[1.24]*:

$$b = \frac{P_O^I}{\Phi_O} \quad [1.23] \quad a = k_I [AO_T] \quad [1.24]$$

A *equação [1.22]* prevê que a variação de $1/k_{obs}$ em função de Φ_I (*equação [1.25]*) é linear, com uma ordenada na origem igual a $1/ab$ e um declive igual a $1/a$.

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{1}{ab} + \frac{1}{a} \Phi_I \quad [1.25]$$

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

$$P_O^I = \Phi_o(\text{declive})/(\text{ordenada na origem}) \quad [1.26]$$

A fração de antioxidante presente na fase oleosa e a interfase do sistema emulsionado vem dada pelas equações [1.27] e [1.28], respetivamente.

$$\% AO_o = \frac{100 \Phi_o}{\Phi_I P_O^I + \Phi_o} \quad [1.27]$$

$$\% AO_I = \frac{100 \Phi_I P_O^I}{\Phi_I P_O^I + \Phi_o} \quad [1.28]$$

Para os casos em que a distribuição tenha lugar fundamentalmente nas regiões aquosa-interfásica (*Figura 1-23*), ou seja, aqueles casos em que a concentração de AO na fase oleosa é desprezável, pode-se obter seguindo o mesmo procedimento, uma expressão que relaciona a constante de velocidade observada com a constante de partição do AO entre as regiões aquosa-interfásica, equação [1.29]. Esta equação pode ser linearizada chegando assim a equação [1.30].

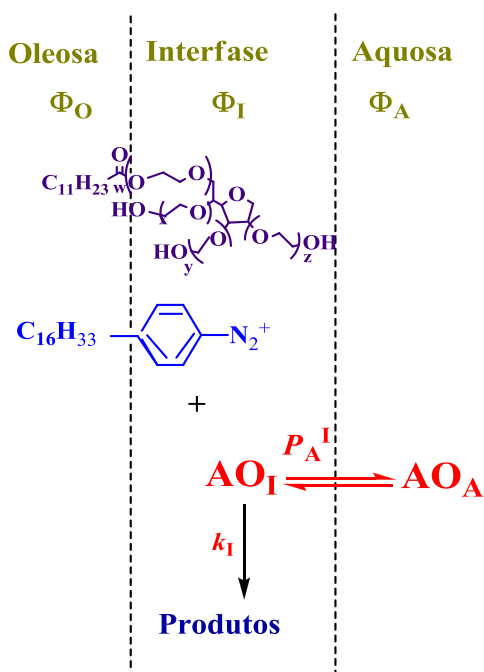


Figura 1-23: Representação esquemática da região interfacial de uma emulsão com base no modelo cinético da pseudofase que mostra a partição do antioxidante, AO, entre as regiões interfásica e aquosa.

$$k_{obs} = \frac{k_I [AO_T] P_A^I}{\Phi_I P_A^I + \Phi_A} \quad [1.29]$$

$$\frac{1}{k_{obs}} = \frac{\Phi_A}{k_I [AO_T] P_A^I} + \frac{\Phi_I}{k_I [AO_T]} \quad [1.30]$$

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

$$P_A^I = \Phi_A (\text{declive}) / (\text{ordenada na origem}) \quad [1.31]$$

Desta forma, a percentagem de AO nestas regiões virá dada pelas equações [1.32] e [1.33].

$$\% AO_A = \frac{100 \Phi_A}{\Phi_I P_A^I + \Phi_A} \quad [1.32]$$

$$\% AO_I = \frac{100 \Phi_I P_A^I}{\Phi_I P_A^I + \Phi_A} \quad [1.33]$$

2. OBJECTIVO

A necessidade de aumentar o tempo de prateleira e a segurança de alimentos com sistemas emulsionados (margarinas, maioneses, molhos, etc.) tem levado à constante utilização de antioxidantes. Os antioxidantes utilizados na estabilização das emulsões alimentares podem encontrar-se, não só nas fases oleosa e aquosa, como também na interfase. A atividade antioxidante de uma molécula num sistema emulsionado vai depender de vários fatores, nomeadamente a temperatura, pH, estrutura do antioxidante e da distribuição desse antioxidante pelas várias fases da emulsão.

Após síntese de alguns ésteres do ácido cafeico, pretendeu-se estudar a distribuição destas moléculas pelas várias fases de emulsões do tipo óleo/água (O/A). O conhecimento da distribuição destes compostos em sistemas emulsionados é particularmente importante pelo fato de poder afetar em grande medida a sua atividade antioxidante.

Este trabalho teve como objetivo aplicar um método cinético na determinação da distribuição dos compostos sintetizados, em emulsões azeite/Tween 20/água, e relacionar esta distribuição com a atividade antioxidante dos mesmos.

3. MÉTODOS E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.1. SÍNTESE DE DERIVADOS DO ÁCIDO CINÂMICO DE CADEIAS ALQUILO LONGAS

3.1.1. Métodos e reagentes

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

O sistema de HPLC usado na análise dos compostos sintetizados, era constituído por um cromatógrafo Merck - Hitachi, numa coluna C18 (dimensões -250 mm $\times$ 4,6 mm), Waters Sphersisorb ODS2 5 μm (Supelco Inc.) acoplada a um detetor UV-Vis Merck-Hitachi L-4200 e por uma bomba Merck - Hitachi L-6200 Intelligent Pump. Os compostos foram detetados a comprimentos de onda de 280 nm e eluídos à temperatura ambiente com um fluxo de 1 mL min^{-1} . Utilizou-se como fase móvel uma mistura de metanol/acetonitrilo (1:1) (eluente A) e uma mistura de água/ácido acético (97:3; pH~3,1) (eluente B). As análises tiveram duração de 45 minutos, o volume de solução injetada na coluna foi de 20 μL e o gradiente de eluente utilizado foi o seguinte:

Tabela 3-1: Gradiente de eluentes utilizado na análise dos cinamatos por HPLC.

Tempo / (min)	Eluente A / (%)	Eluente B / (%)
0	95	5
25	70	30
35	30	70
40	0	100
50	0	100

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

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

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

- UV/Vis
- Com iodo;
- Solução de Mostain (100 mm mL H₂SO₄ 10%, 5,0 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O, 0,22 g Ce(SO₄)₂.4H₂O).

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 µL.min⁻¹. A temperatura do capilar foi de 180°C e a voltagem foi de 3V, e os espectros foram obtidos em modo de iões positivos.

Os espectros de ¹H-RMN e ¹³C-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 do método DPPH, utilizou-se um espectrómetro PowerWave XS, Bio-Tek[®]

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

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

3.1.2. 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* ^[58] (Figura 3-1).

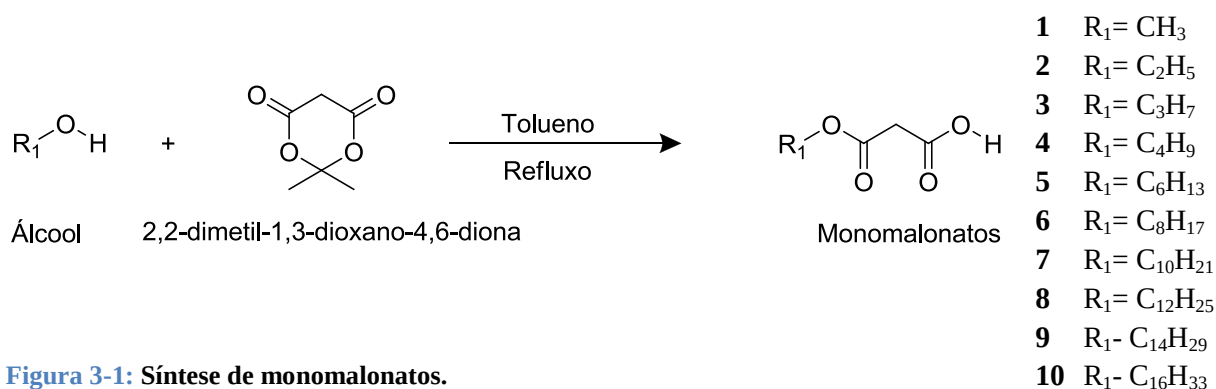


Figura 3-1: Síntese de monomalonatos.

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. Extraíu-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 extraíu-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, ^1H -RMN e ^{13}C -RMN.

3.1.2.1. Caracterização espectroscópica dos monomalonatos:

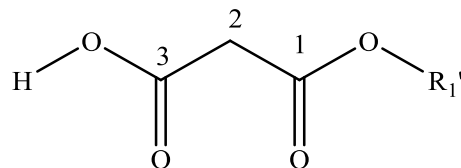


Figura 3-2: Estrutura numerada dos monomalonatos.

3.1.2.1.1. Malonato de monopropilo (3)

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

3.1.2.1.2. Malonato de monobutilo (4)

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0,90 (t, $J=7,4$ Hz, 3H, H-4'); 1,36 (bs, 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).

3.1.2.1.3. Malonato de monohexilo (5)

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0,88 (t, $J=6,8$ Hz, 3H, H-6'); 1,32 (bs, 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): δ 13,9 (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).

3.1.2.1.4. Malonato de monooctanoilo (6)

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0,88 (t, $J=7,0$ Hz, 3H, H-8'); 1,27 (bs, 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).

3.1.2.1.5. Malonato de monodecilo (7)

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0,85 (t, $J=7,0$ Hz, 3H, H-10'); 1,24 (bs, 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).

3.1.2.1.6. Malonato de monododecilo (8)

^1H RMN (CD-Cl_3 , 400 MHz): δ 0,89 (t, $J=6,8$ Hz, 3H, H-12'); 1,26 (bs, 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).

3.1.2.1.7. Malonato de monotetradecilo (9)

^1H 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 ^[58].

3.1.2.1.8. Malonato de monohexadecilo (10)

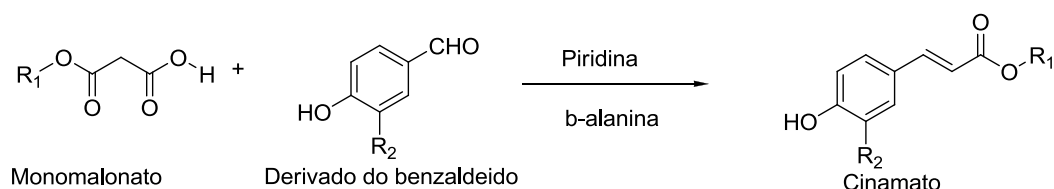
^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0,88 (t, $J=6,8$ Hz, 3H, H-16'); 1,26 (bs, 26H, H-15'-3'); 1,65 (m, 2H, H-2'); 3,44 (s, 2H, H-2), 4,17 (t, $J=6,8$ Hz, 2H, H-1').

^{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 ^[58].

3.1.3. SÍNTESE DE CINAMATOS DE CADEIA ALQUILO LONGA

Os cinamatos foram sintetizados de acordo com o procedimento descrito por Menezes *et al* ^[58] (Figura 3-3).



H1	$\text{R}_1 = \text{C}_8\text{H}_{17}; \text{R}_2 = \text{H}$
H2	$\text{R}_1 = \text{C}_{10}\text{H}_3; \text{R}_2 = \text{H}$
H3	$\text{R}_1 = \text{C}_{12}\text{H}_{25}; \text{R}_2 = \text{H}$
H4	$\text{R}_1 = \text{C}_{14}\text{H}_{29}; \text{R}_2 = \text{H}$
C1	$\text{R}_1 = \text{CH}_3; \text{R}_2 = \text{OH}$
C2	$\text{R}_1 = \text{C}_2\text{H}_5; \text{R}_2 = \text{OH}$
C3	$\text{R}_1 = \text{C}_3\text{H}_7; \text{R}_2 = \text{OH}$
C4	$\text{R}_1 = \text{C}_4\text{H}_9; \text{R}_2 = \text{OH}$
C6	$\text{R}_1 = \text{C}_6\text{H}_{13}; \text{R}_2 = \text{OH}$
C8	$\text{R}_1 = \text{C}_8\text{H}_{17}; \text{R}_2 = \text{OH}$
C10	$\text{R}_1 = \text{C}_{10}\text{H}_{21}; \text{R}_2 = \text{OH}$
C12	$\text{R}_1 = \text{C}_{12}\text{H}_{25}; \text{R}_2 = \text{OH}$
C14	$\text{R}_1 = \text{C}_{14}\text{H}_{29}; \text{R}_2 = \text{OH}$
C16	$\text{R}_1 = \text{C}_{16}\text{H}_{33}; \text{R}_2 = \text{OH}$

Figura 3-3: Síntese dos cinamatos de cadeia alquilo longa.

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 °C, durante um determinado período de tempo, de acordo com a *Tabela 4-2*.

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 ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e MS.

3.1.3.1. Caracterização espectroscópica dos cinamatos de cadeia alquilo longa

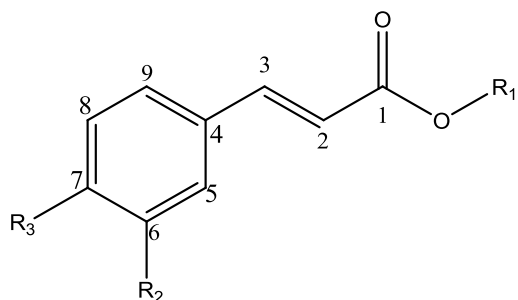


Figura 3-4: Estrutura numerada dos cinamatos de cadeia alquilo longa.

3.1.3.1.1. Trans-3- (4-hidroxifenil) propenoato de octilo (H1)

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 0,87 (t, J=6,8 Hz, 3H, H-8'); 1,27 (bs, 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).

¹³C RMN (CDCl₃; 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).

3.1.3.1.2. Trans-3- (4-hidroxifenil) propenoato de decanoílo (H2)

¹H RMN (CDCl₃, 400 MHz): δ 0,87 (t, J=6,8 Hz, 3H, H-10'); 1,26 (bs, 14H, H-9'-3'); 1,69 (m, 2H, H-2'); 4,9 (t, J= 6,8 Hz, 2H, H-1'), 6,29 (d, J= 16,0 Hz, 1H, H-2), 6,85 (d, J=8,4 Hz, 1H- H-6, 8), 7,42 (d, J=8,8 Hz, 2H, H-5, 9); 7,62 (d, J=16,0 Hz, 1H, H-3).

^{13}C RMN (CDCl_3 ; 100 MHz): δ 13,9 (C-10'); 22,5 (C-9'); 25,8 (C-3'); 28,5 (C-2'); 29,3 (C-4',7'); 29,6 (C-5',6'); 31,6 (C-8'); 64,6 (C-1'); 115,7 (C-6,8); 126,9 (C-4); 129,8 (C-5, 9); 144,3 (C-3); 157,7 (C-7); 167, 7 (C-1).

3.1.3.1.3. Trans-3- (4-hidroxifenil) propenoato de dodecilo (H3)

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0,88 (t, $J=6,8$ Hz, 3H, H-12'); 1,27 (bs, 18H, H-11'-3'); 1,71 (m, 2H, H-2'); 4,21 (t, $J=6,8$ Hz, 2H, H-1'), 6,31 (d, $J=16,0$ Hz, 1H, H-2), 6,87 (d, $J=8,4$ Hz, 1H- H-6, 8), 7,43 (d, $J=8,4$ Hz, 2H, H-5, 9); 7,64 (d, $J=16,0$ Hz, 1H, H-3).

^{13}C RMN (CDCl_3 ; 100 MHz): δ 13,6 (C-12'); 22,2 (C-11'); 25,4 (C-3'); 28,2 (C-2'); 29,1 (C-4',9'); 29,6 (C-5'-8'); 31,4 (C-10'); 64,4 (C-1'); 115,4 (C-6,8); 126,5 (C-4); 129,5 (C-5, 9); 144,2 (C-3); 157,5 (C-7); 167,5 (C-1).

3.1.3.1.4. Trans-3- (4-hidroxifenil) propenoato de tetradecilo (H4)

^1H RMN (CDCl_3 , 400 MHz): δ 0,88 (t, $J=6,8$ Hz, 3H, H-14'); 1,27 (bs, 22H, H-13'-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-14'); 22,7 (C-13'); 25,9 (C-3'); 28,7 (C-2'); 29,2 (C-4',11'); 29,6 (C-5'-10'), 31,9 (C-12'); 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].

Os compostos H1, H2, H3 e H4, não foram testados.

3.1.3.1.5. Trans-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de metilo ou cafeiato de metilo (C1)

^1H RMN (CD_3COCD_3 , 400 MHz): δ 3,7 (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 ($\text{M} + \text{H}$)⁺

Resultados espectroscópicos de acordo com os descritos na literatura ^[121].

3.1.3.1.6. Trans-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de etilo ou cafeiato de etilo (C2)

^1H 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 ($\text{M} + \text{H}$)⁺

3.1.3.1.7. **Trans-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de propilo ou cafeiato de propilo (C3)**

^1H 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 ($\text{M}^+ \text{H}$)⁺

Resultados espectroscópicos de acordo com os descritos na literatura ^[121].

3.1.3.1.8. **Trans-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de butilo ou cafeiato de butilo (C4)**

^1H RMN (CD_3COCD_3 , 400 MHz): δ 0,93 (t, $J=7,4$ Hz, 3H, H-4'); 1,19 (bs, 2H, H-3'); 1,66 (m, 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 ($\text{M}^+ \text{H}$)⁺

3.1.3.1.9. Trans-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de hexilo ou cafeiato de hexilo (C6)

$^1\text{H RMN}$ (CD_3COCD_3 , 400 MHz): δ 0,88 (t, $J=7,0$ Hz, 3H, H-6'); 1,32 (bs, 6H, H-5'-3'); 1,66 (m, 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).

$^{13}\text{C RMN}$ (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 ($\text{M}^+ \text{H}$)⁺

3.1.3.1.10. Trans-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de octilo ou cafeiato de octilo (C8)

$^1\text{H RMN}$ (CD_3COCD_3 , 400 MHz): δ 0,87 (t, $J=6,8$ Hz, 3H, H-8'); 1,28 (bs, 10H, H-7'-3'); 1,66 (m, 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).

$^{13}\text{C RMN}$ (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 ($\text{M}^+ \text{H}$)⁺

3.1.3.1.11. Trans-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de decanoilo ou cafeiato de decanoilo (C10)

^1H RMN (CD_3COCD_3 , 400 MHz): δ 0,87 (t, $J=6,8$ Hz, 3H, H-10'); 1,29 (bs, 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 ($\text{M} + \text{H}$)⁺

3.1.3.1.12. Trans-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de dodecilo ou cafeiato de dodecilo (C12)

^1H RMN (CD_3COCD_3 , 400 MHz): δ 0,86 (t, $J=7,0$ Hz, 3H, H-12'); 1,27 (bs, 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 ($\text{M} + \text{H}$)⁺

3.1.3.1.13. **Trans-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de tetradecilo ou cafeiato de tetradecilo (C14)**

¹H RMN (CD₃COCD₃, 400 MHz): δ 0,88 (t, J=6,6 Hz, 3H, H-14'); 1,29 (bs, 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).

¹³C RMN (CD₃COCD₃; 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 ^[58].

3.1.3.1.14. **Trans-3- (3,4-dihidroxifenil) propenoato de hexadecilo ou cafeiato de hexadecilo (C16)**

¹H RMN (CD₃COCD₃, 400 MHz): δ 0,86 (t, J=6,8 Hz, 3H, H-16'); 1,41 (bs, 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).

¹³C RMN (CD₃COCD₃; 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 ^[58].

3.1.3.2. Estudo da síntese do cafeiato de hexilo a diferentes temperaturas

De acordo com o protocolo descrito na bibliografia para a síntese dos derivados do ácido dihidrocinâmico ^[58], a temperatura a utilizar deveria ser a temperatura ambiente. No entanto, este protocolo de síntese requeria um tempo de reação de 15 dias. De modo a diminuir este tempo de reação efetuou-se um estudo prévio da temperatura de reação, utilizando temperaturas superiores, 40 °C e 60 °C.

As reações foram monitorizadas por HPLC durante 7 dias.

3.2. PURIFICAÇÃO DA FASE OLEOSA A UTILIZAR NA PREPARAÇÃO DAS EMULSÕES MODELO

Neste trabalho utilizou-se como fase oleosa o azeite.

Os principais constituintes do azeite são os ácidos gordos sob a forma de triacilglicerois (TAGs). Os ácidos gordos presentes no azeite em quantidades apreciáveis são os ácidos oléico, palmítico, palmitoleico, esteárico, linoleico e linolénico. O alto teor em ácido oleico (55 – 83 %), confere ao azeite elevada estabilidade, em comparação com outros óleos vegetais, e leva a que este seja considerado uma gordura essencialmente monoinsaturada ^[122].

O azeite contém igualmente α , β , γ e δ tocoferóis em quantidades variáveis (normalmente 100 a 200 ppm), bem como outros compostos fenólicos como o hidroxitirosol e o 3,4-DHPEA-EDA, cuja concentração total poderá ir até cerca de 1000 ppm. De modo a que estes compostos não interferiram com as experiências da determinação da distribuição dos antioxidantes, bem como com a avaliação da sua atividade antioxidante em emulsões

preparadas com azeite, tornou-se necessário proceder á remoção destes antioxidantes do seguinte modo:

- a) Removeram-se os compostos fenólicos através de extração líquido-líquido com uma solução fortemente alcalina;
- b) Removeram-se os tocoferóis passando o azeite por uma coluna de alumina sob pressão de azoto.

3.2.1. Remoção de compostos fenólicos

Removeram-se os compostos fenólicos presentes no azeite comercial através de uma extração líquido-líquido ^[73]. 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 °C) até á remoção dos tocoferóis.

3.2.2. Remoção de tocoferóis

Os tocoferóis presentes no azeite comercial foram removidos segundo o procedimento descrito por *Yoshida* ^[123]. 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 200°C durante 24 horas.

Os tocoferóis foram removidos passando o azeite pela coluna cromatográfica com alumina ativada. Realizou-se a eluição sob pressão de azoto e recolheu-se o azeite num matraz.

Uma amostra do azeite (25 g) obtido foi sujeita à quantificação dos polifenóis totais por HPLC de modo a verificar a total ausência destes compostos no azeite purificado. Armazenou-se o restante azeite a -20°C até utilização.

3.2.3. Quantificação dos fenóis totais no azeite preparado ^[124]

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, esta foi lavada 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 °C, 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 watman de 0,2 µm e analisou-se esta por HPLC.

3.3. DETERMINAÇÃO DA CONSTANTE DE PARTIÇÃO P_A^O DE ANTIOXIDANTES EM SISTEMAS BINÁRIOS AZEITE/ÁGUA

Uma das vias para determinar as constantes de partição que governa a distribuição de um antioxidante (AO) num sistema emulsionando, baseia-se na determinação espectrofotométrica da constante de partição entre a região aquosa e a região orgânica, P_A^O , de uma mistura binária que não contém emulsionante. A constante de partição P_A^O de um antioxidante numa mistura binária representa o quociente entre a constante de partição entre a fase orgânica e interfásica, P_O^I , e a fase aquosa e interfásica, P_A^I , de uma emulsão. Assim, obtém-se experimentalmente o valor da razão entre estas duas constantes de partição. Para a determinação de P_A^O (Figura 3-5), preparou-se uma mistura binária 4:6 ($V_{\text{Total}} = 10$ mL) de azeite purificado e solução aquosa (Tampão citrato 0,04 M e pH=3,0). 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 na mistura binária. Termostatizou-se a mistura a 25 °C e agitou-se com um homogeneizador *Polytron PT 1600 E* a uma velocidade de 20 000 r.p.m. Transferiu-se a mistura para o tubo de centrifuga e procedeu-se à separação das fases por centrifugação durante 45 minutos.

Preparou-se outra mistura binária 4:6 (azeite, 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) e leu-se a absorvância da fase oleosa a um comprimento de onda 331 nm, e da fase aquosa a 322 nm.

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 ou uma mistura butanol:etanol (50:50, v/v), dependendo da solubilidade do antioxidante.

Efetuuou-se esta determinação para todos os antioxidantes estudados em triplicado.

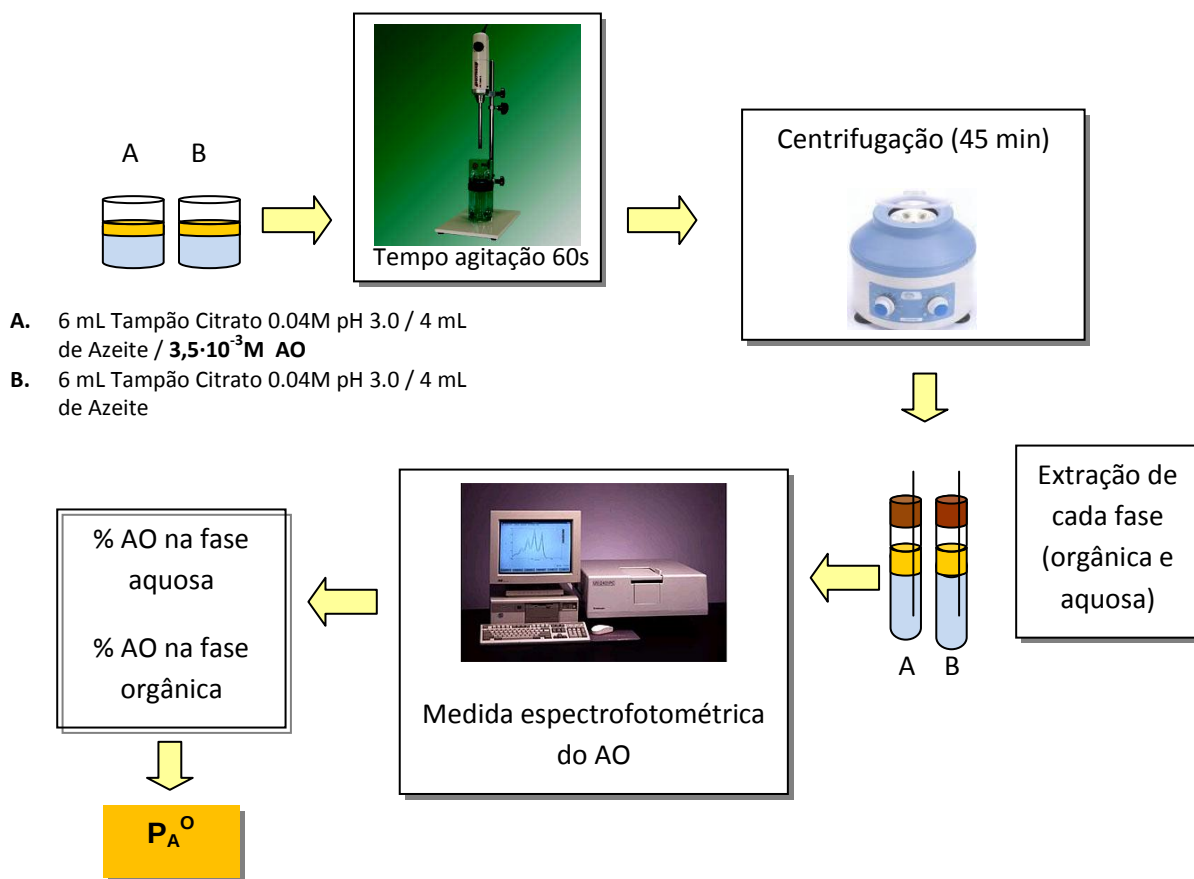


Figura 3-5: Procedimento experimental seguido para a obtenção de P_A^O .

3.4. DETERMINAÇÃO DA DISTRIBUIÇÃO DOS ANTIOXIDANTES EM EMULSÕES MODELO

3.4.1. Preparação da solução de agente copulante N-1- (1-Naftil) etilenodiamina (NED)

Preparou-se a solução de agente copulante dissolvendo-se 4,93 g N-1- (1-naftil) etilenodiamina (NED) em 500 mL de etanol, e perfazendo posteriormente o volume 1 L com butanol, obtendo-se uma solução de 0,0190 M. Armazenou-se esta solução num recipiente de plástico e na ausência da luz para minimizar a sua fotodecomposição.

3.4.2. Síntese do sal de arenodiazônio

Dado que o sal de arenodiazônio a utilizar não existe comercialmente, foi necessário efetuar a sua síntese de acordo com o procedimento descrito por Doyle ^[125].



Figura 3-6: Síntese do sal de arenodiazônio.

Para sintetizar o sal arenodiazônio colocaram-se num gobelé 4,5 mL de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ que se manteve em banho de gelo-acetona a $-15\text{ }^\circ\text{C}$. De seguida, dissolveram-se 2,45 g de 4-hexadecilanilina (0,008 mol) num volume mínimo de tetrahidrofurano (THF) e adicionou-se esta solução ao $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ 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. 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.

Obtiveram-se 2,57 g de um sólido cristalino de cor rosada (rendimento de 75 %) que foi armazenado em condições adequadas de humidade, luminosidade e temperatura com o objetivo de minimizar a sua decomposição.

3.4.3. Preparação de soluções

Preparou-se a solução tampão citrato, determinando a quantidade necessária de ácido cítrico e a quantidade necessária de hidróxido de sódio (99%) para se obter o pH pretendido. Verificou-se o pH das soluções preparadas por potenciometria.

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

3.4.4. Preparação de emulsões

Pesaram-se $3,5 \times 10^{-5}$ mol de antioxidante diretamente nos frascos onde se prepararam as emulsões.

Preparou-se 10 mL de cada emulsão, misturando azeite purificado com tampão citrato (0,04 M e pH= 2.50, 3,0 e 3.6) numa proporção de 1:9 e 4:6 (O/A), com diferentes frações de emulsionante, Tween 20, ($\Phi = 0,005 - 0,040$).

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. Introduziu-se esta mistura numa célula termostaticada a uma temperatura de 25 °C e em agitação constante para minimizar a separação das fases.

3.4.5. Determinação das constantes de velocidade k_{obs} das emulsões

Depois de preparada a emulsão, transferiu-se esta para uma célula termostatizada fechada, a uma temperatura de 25 °C 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-ArN₂⁺ 0,17 M à emulsão.

No momento em que se adiciona a alíquota de 16-ArN₂⁺ 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 azóico. Determinou-se a absorvância da solução contendo o corante obtido para cada tempo de reação a um comprimento de onda de 572 nm. Obteve-se o valor de k_{obs} para a decomposição dos iões arenodiazônio 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.

3.4.5.1. Estudo das condições experimentais: Estudo do efeito da acidez sobre k_{obs}

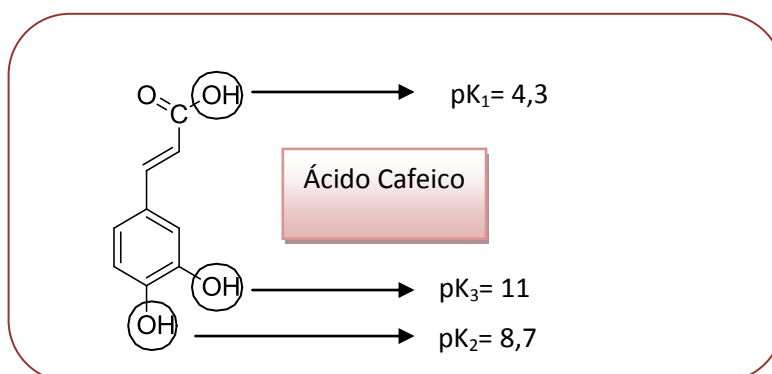


Figura 3-7: Estrutura do ácido cafeico e as suas constantes de ionização.

O ácido cafeico tem três grupos OH ionizáveis, cujas constantes de ionização são $pK_{a1} = 4,3$ ($-\text{COOH}$), $pK_{a2} = 8,7$ para o grupo hidroxilo na posição 4 e $pK_{a3} = 11$ para o grupo hidroxilo na posição 3 ^[126]. Assim, a acidez do meio pode desempenhar um papel importante na distribuição dos antioxidantes no sistema emulsionado (fase aquosa, interfásica e orgânica), mas também na velocidade da reação do antioxidante com o sal arenodiazônio.

Analisou-se o efeito do pH, a $\text{pH} = 2,0$, $\text{pH} = 3,0$ e $\text{pH} = 3,6$, na velocidade da reação em emulsões contendo uma fração de emulsionante de 0,0047, para os cafeiados de propilo, octilo e hexadecilo. Para isso utilizou-se o método da derivatização descrito anteriormente.

3.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.5.1. Método do 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), devido a reação com o antioxidante.

A atividade antioxidante define-se a partir do parâmetro EC_{50} , que representa a concentração necessária para o antioxidante captar 50% dos radicais iniciais do DPPH.

Efetuuou-se a determinação dos valores do EC_{50} para o ácido cafeico e seus derivados hidrofóbicos, medindo espectroscopicamente o desaparecimento do radical DPPH ($\lambda=515$ nm) utilizando diferentes concentrações de antioxidante.

Numa placa BD Falcon de 96 poços (8×12) de poliestireno, colocaram-se 250 μ L da solução metanólica de DPPH (0,096 mM) e adicionaram-se 50 μ L 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.

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

3.5.2.1. Método Padrão

Prepararam-se emulsões de 10 mL 6:4 com tampão citrato (0,04 M e pH= 3,0), azeite purificado e uma determinada quantidade (0,5 %, 1 % e 2%) de emulsionante Tween 20. Prepararam-se estas emulsões em triplicado, em frascos previamente tratados com HCl 37 % para evitar contaminações com metais. De seguida, adicionaram-se às emulsões uma alíquota de 50 μ L de solução antioxidante 12 mM em metanol. Prepararam-se também emulsões sem a adição de antioxidante (amostras controlo). Por último, para formar as emulsões, aplicou-se agitação constante durante 1 minuto com um homogeneizador Polytron PT 1600 E, a uma velocidade de 20 000 r.p.m., e colocaram-se na estufa a 60 °C para acelerar o processo de oxidação lipídica.

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

3.5.2.2. Método utilizando AAPH como iniciador radicalar

O AAPH (dicloridrato de 2,2'-azo-bis- (2-amidinopropano)) é um composto azo, solúvel em água e amplamente utilizado que, a temperaturas superiores a 37° C, se decompõe em radicais livres do tipo peroxilo, a uma velocidade constante. O AAPH é instável a temperaturas altas, quebrando homoliticamente em dois radicais. Estes radicais, por sua vez, reagem instantaneamente com o oxigénio dissolvido no meio da reação, levando a formação de radicais peroxilo.

Para tal, prepararam-se emulsões constituídas por 9 mL de tampão citrato (0,04 M e pH= 3,6), 1 mL de azeite purificado e uma determinada quantidade (0,5 %) de emulsionante Tween 20. Estas emulsões foram preparadas em triplicado, em frascos previamente tratados com HCl 37 % para evitar contaminações com metais. De seguida, adicionou-se às emulsões uma alíquota de 50 µL de solução antioxidante 12 mM em metanol e 1 mL de solução AAPH 10 mM em água. Também se utilizaram emulsões sem a adição de antioxidante (amostras controlo). Por último, para formar as emulsões, aplicou-se agitação constante durante 1 minuto com um homogeneizador Polytron PT 1600 E, a uma velocidade de 20 000 r.p.m., e colocaram-se na estufa a 60 °C para acelerar o processo de oxidação lipídica.

Periodicamente retiraram-se alíquotas de 100 µL de cada amostra, analisando-se de seguida o conteúdo em dienos conjugados.

3.5.2.3. 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 (50 ou 100 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 absorvidade molar do hidroperóxido do ácido linoleico (280 g/mol, ϵ = 26000), segundo a equação:

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

Sendo: $Abs_{233\text{ nm}}$ - a absorvância da solução;

C_{azeite} - Concentração de azeite na solução em g/ L;

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. SÍNTESE DE MONOMALONATOS

Sintetizaram-se vários monomalonatos, a partir da reação do álcool gordo apropriado (*Tabela 4-1*) e o ácido de Meldrum, de acordo com o procedimento descrito por Menezes *et al* [58].

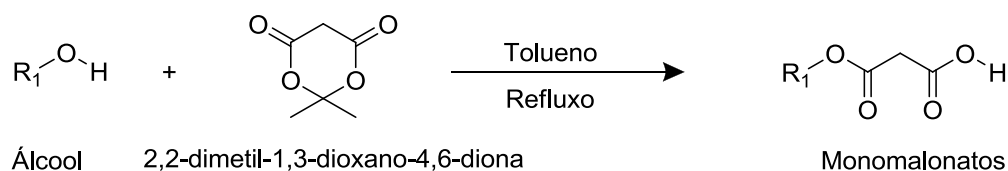


Figura 4-1: Síntese dos monomalonatos.

Os rendimentos obtidos após purificação foram de 54% a 90 % (*Tabela 4-1*)

Tabela 4-1: Resultados experimentais das sínteses dos monomalonatos.

Monomalonato	R ₁	m _{obtida} /g	η %
1	CH ₃	1,276	54 %
2	C ₂ H ₆	1,305	49 %
3	C ₃ H ₇	2,369	81,1
4	C ₄ H ₉	2,900	90,6
5	C ₆ H ₁₃	3,211	85,5
6	C ₈ H ₁₇	2,877	66,6
7	C ₁₀ H ₂₁	3,701	76,0
8	C ₁₂ H ₂₅	4,205	77,5
9	C ₁₄ H ₂₉	3,730	62,4
10	C ₁₆ H ₃₃	3,750	57,2

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 pode dever-se ao fato de o metanol e o etanol evaporarem durante o decorrer da reação, dado que apresentam pontos de ebulição de 65 °C e 78 °C respectivamente, mais baixos que o ponto de ebulição do tolueno (110 °C).

4.2. SÍNTESE DE CINAMATOS DE CADEIA LONGA

Sintetizaram-se vários derivados do ácido cinâmico 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* ^[58].

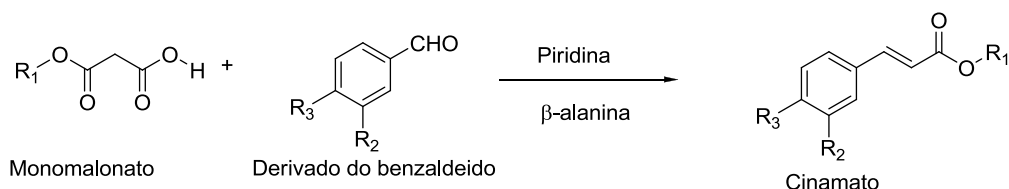


Figura 4-2: Síntese de cinamatos de cadeia longa.

Obtiveram-se rendimentos relativamente elevados em todas as sínteses efetuadas (39 a 88 %), *Tabela 4-2*.

Tabela 4-2: Resultados experimentais das sínteses dos cinamatos.

Cinamatos	R ₁	R ₂	R ₃	η %	m _{obtida} /g	Tempo/dias
H1	C ₈ H ₁₇	H	OH	74	0,9500	6
H2	C ₁₀ H ₂₁	H	OH	64	0,7798	6
H3	C ₁₂ H ₂₅	H	OH	55	0,6650	6
H4	C ₁₄ H ₂₉	H	OH	61	0,7216	6
C1	CH ₃	OH	OH	39	0,6384	3
C2	C ₂ H ₆	OH	OH	66	1,04	4
C3	C ₃ H ₇	OH	OH	76	1,15	6
C4	C ₄ H ₉	OH	OH	88	1,30	7
C6	C ₆ H ₁₃	OH	OH	70	0,98	5
C8	C ₈ H ₁₇	OH	OH	68	0,92	4
C10	C ₁₀ H ₂₁	OH	OH	71	0,93	6
C12	C ₁₂ H ₂₅	OH	OH	61	0,78	7
C14	C ₁₄ H ₂₉	OH	OH	73	0,91	24*
C16	C ₁₆ H ₃₃	OH	OH	61	0,75	12

*19dias à temperatura ambiente mais 5 dias a 40°C

Aparentemente, o tamanho da cadeia alquila do monomalonato influencia a velocidade da reação. Assim, verificou-se que para cadeias mais longas foram necessários tempos de reação superiores, como podemos verificar na *Tabela 4-2*. 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.

4.2.1. Estudo da síntese do cafeiato de hexilo a diferentes temperaturas

De acordo com o protocolo descrito na bibliografia para a síntese dos derivados do ácido dihidrocinâmico, a temperatura a utilizar deveria ser a temperatura ambiente. No entanto, este protocolo de síntese requeria um tempo de reação de 15 dias. De modo a

diminuir este tempo de reação, efetuou-se um estudo prévio da temperatura utilizando temperaturas superiores, 40 °C e 60 °C.

As reações foram monitorizadas por HPLC durante 7 dias.

Observaram-se nos cromatogramas obtidos três picos com tempos de retenção de 8,6, 20,8 e 23,4 minutos, relativos ao 3, 4- dihidroxibenzaldeído (3,4 – DHBA), ao intermediário imina formado por reação entre o 3,4 – DHBA e a β -alanina, e ao 3, 4 – dihidroxicinamato de hexilo, respetivamente. A partir das áreas dos picos, calcularam-se as percentagens dos três compostos na mistura reacional (*Tabela 4-3*).

Tabela 4-3: Síntese do cafeiato de hexilo a diferentes temperaturas.

Tempo / Dias	% Benzaldeído			% Intermediário (Imina)			% Cafeiato de hexilo		
	T _{ambiente}	40 °C	60 °C	T _{ambiente}	40 °C	60 °C	T _{ambiente}	40 °C	60 °C
0	99,1	99,7	96,1	0,9	0,3	0	0	0	3,9
1	96	36,1	8,6	4	21,2	4,15	0,9	47,6	89,5
2	89,1	22,2	9,7	7,7	9,6	4,18	3,3	69,1	86,2
3	81	16,3	10	10,5	5,4	3,3	8,5	78,3	88,9
6	67,4	10,3	11,1	18,2	2,4	3,2	14,4	87,2	87,3
7	64,3	9,6	7,9	14,5	1,4	0	21,2	88,9	92,1

À temperatura ambiente a reação é muito lenta, verificando-se ao fim de 7 dias que somente 21,2 % dos compostos identificados na mistura reacional correspondem ao antioxidante, enquanto que às temperaturas de 40 °C e 60 °C obteve-se percentagens de 88,9 e 92,1 %, respetivamente. A 60 °C este valor (da ordem dos 90 %) é logo atingido ao fim de 24 h. No entanto, uma vez que este estudo foi efetuado apenas para um composto, resolveu-se utilizar como temperatura de trabalho os 40 °C, dada a possível termoinstabilidade destas moléculas.

4.3. Estudo das condições experimentais: Estudo do efeito da acidez sobre k_{obs}

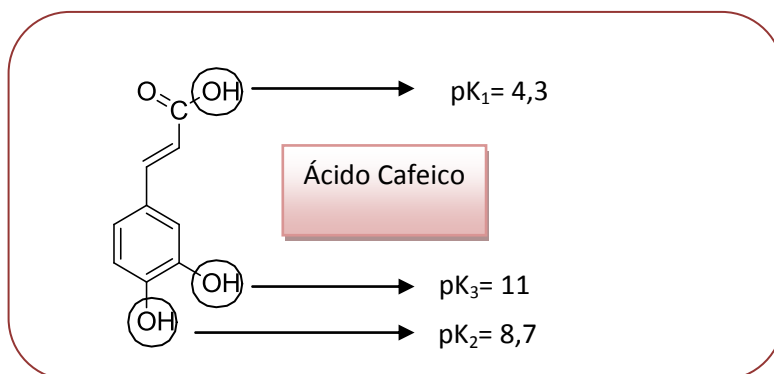


Figura 4-3: Estrutura do ácido cafeico e as suas constantes de ionização.

O ácido cafeico tem três grupos OH ionizáveis (*Figura 4-3*), cujas constantes de ionização são $pK_{a1} = 4,3$ ($-COOH$), $pK_{a2} = 8,7$ para o grupo hidroxilo na posição 4 e $pK_{a3} = 11$ para o grupo hidroxilo na posição 3 ^[126], pelo que pode desempenhar um papel importante, não só na distribuição dos antioxidantes no sistema emulsionado (fase aquosa, interfásica e orgânica), mas também na velocidade da reação do antioxidante com o sal arenodiazônio.

Analisou-se o efeito do pH (pH=2,0, pH=3,0 e pH=3,6) na velocidade da reação em emulsões contendo uma fração de emulsionante de 0,0047, para os cafeiados de propilo, octilo e hexadecilo. Para isso, utilizou-se o método de derivatização descrito no capítulo anterior.

Na *Figura 4-4* está representado um exemplo de uma variação típica da absorvância do corante em função do tempo, a diferentes pH para o cafeiato de propilo.

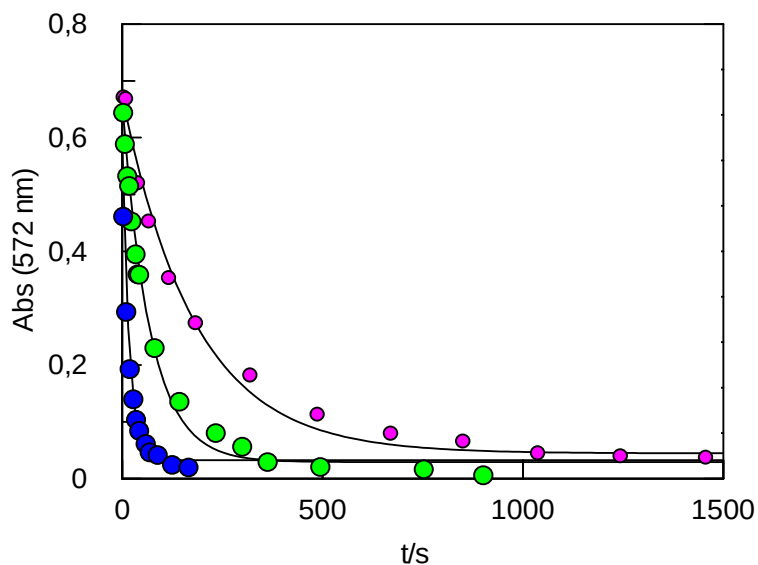


Figura 4-4: Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo. Condições experimentais: emulsão 4:6 [azeite/tampão citrato (0,04 M), pH=3,6 (azul), pH=3,0 (verde) e pH=2,5 (cor-de-rosa) / Tween 20], $\Phi_1=0,0047$, $[16\text{-ArN}_2^+]=3,40 \times 10^{-4}\text{ M}$, $[\text{AO}]=3,5 \times 10^{-3}\text{ M}$, $[\text{NED}]=0,019\text{ M}$ e $T=25^\circ\text{C}$.

Como podemos verificar através da *Figura 4-4*, a variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo usando uma solução tampão de pH=3,6 tem apenas dois pontos no tempo de semi-vida, ou seja, a velocidade da reação é muito rápida, pelo que o erro associado ao cálculo da constante de velocidade é elevado.

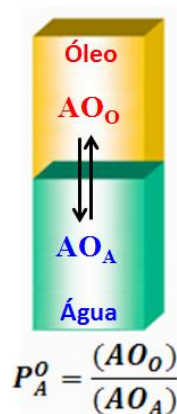
Para pH=2,5 e 3,0 a velocidade da reação é mais lenta, conseguindo obter-se mais pontos experimentais durante o tempo de semi-vida. Por este motivo, decidiu-se ao longo deste trabalho utilizar o pH=3.

4.4. DISTRIBUIÇÃO DO ÁCIDO CAFEICO E DOS SEUS DERIVADOS EM SISTEMAS BINÁRIOS AZEITE/ ÁGUA

4.4.1. Determinação da Constante de Partição P_A^O

Determinou-se o valor da constante de partição, P_A^O , do ácido cafeico e dos derivados do ácido cafeico de cadeia alquila longa numa mistura binária constituída por 4 mL de azeite e 6 mL de tampão citrato (0,04 M e pH=3,0), contendo uma concentração de $3,5 \times 10^{-3}$ M do antioxidante, de acordo com o procedimento descrito na secção experimental.

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:



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

Na Tabela 4-4, encontram-se os resultados obtidos para os diferentes antioxidantes.

Tabela 4-4: Percentagem dos diferentes antioxidantes presentes na fase aquosa e orgânica de uma mistura binária azeite/água e o valor da constante de partição P_A^O e P_O^A .

		Ácido Cafeico	C1	C2	C3	C8	C16
Mistura binária (4:6 azeite/água)	% AO _O	1,09	62,65	83,54	94,82	99,12	99,37
	% AO _A	98,9	37,23	16,06	5,040	0,88	0,67
	P_A^O	0,017	2,52	7,803	28,22	168,95	236,59
	P_O^A	60,5	0,3962	0,1282	0,0354	0,0059	0,0042

Como esperado, verifica-se a quase total solubilidade do ácido cafeico na fase aquosa e uma diminuição acentuada desta para o cafeiato de metilo. A partir do cafeiato de propilo todos os antioxidantes encontram-se praticamente apenas na fase oleosa.

4.5. DISTRIBUIÇÃO DO ÁCIDO CAFEICO EM EMULSÕES AZEITE/TAMPÃO CITRATO (O/A)

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

Neste trabalho estudou-se o efeito que a fração de emulsificante utilizada exerce sobre o valor de k_{obs} , entre os iões $16-ArN_2^+$ e o ácido cafeico em emulsões 4:6 azeite/ tampão citrato (0,04 M, pH= 3,0) para frações de emulsificante (Tween 20) 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 4-5* está representado um exemplo de uma variação típica da absorvância do corante em função do tempo, bem como a representação de $\ln(A_t - A_\infty)$ em função do tempo.

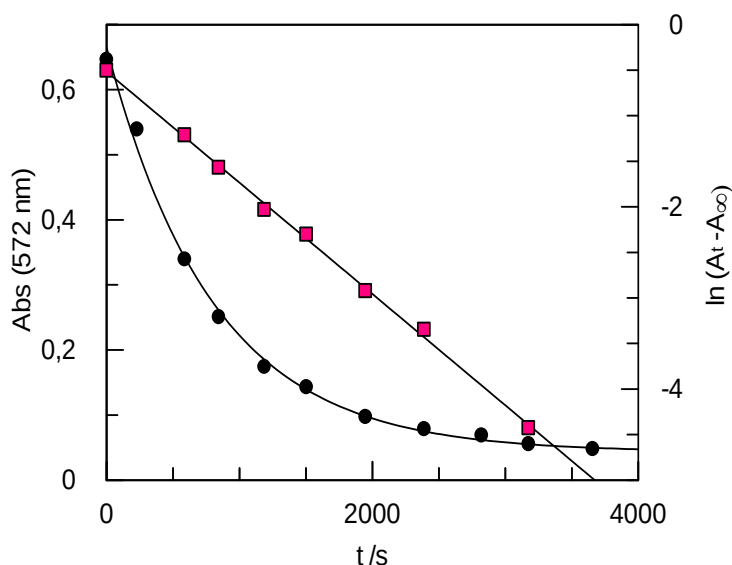


Figura 4-5: Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [A_t - A_\infty]$ vs tempo. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/tampão citrato 0,04 M, pH=3,0/ Tween 20), $\Phi_I=0,0136$, $[16-ArN_2^+]=3,40 \times 10^{-4} M$, $[AO]=3,5 \times 10^{-3} M$, $[NED]=0,019 M$ e $T=25^\circ C$.

Dado que mais de 98% do ácido cafeico se encontra na fase aquosa, analisaram-se os resultados experimentais com base no modelo simplificado da pseudofase, ajustando os dados

(k_{obs}, Φ_1) às equações [1.29] e [1.30] (Figura 4-6) deduzidas na secção 1.3.2.2. Através do gráfico da Figura 4-6, pode verificar-se uma diminuição de k_{obs} à medida que o valor de Φ_1 presente na emulsão aumenta.

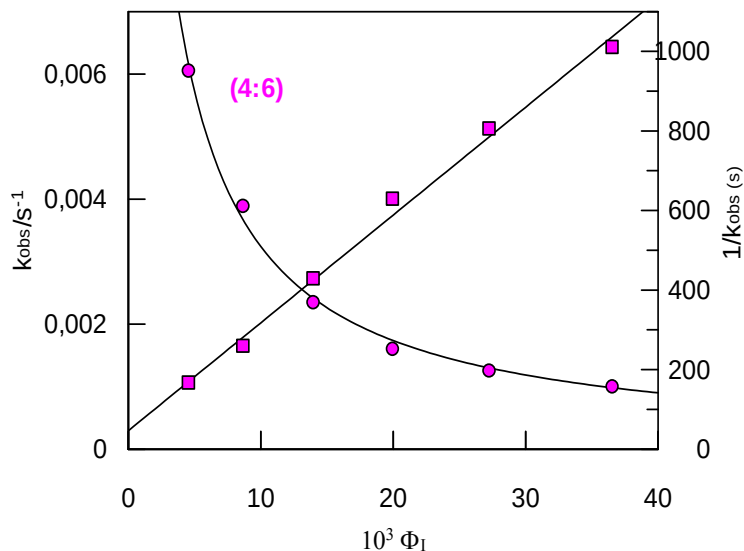


Figura 4-6: Representação de k_{obs} e $1/k_{\text{obs}}$ vs fração de emulsificante (Φ_1) com os respetivos ajustes às equações [1.29] e [1.30]. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/ tampão citrato 0,04 M, pH=3,0) / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,40 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{AO}] = 3,5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ e $T = 25^\circ \text{C}$.

Da representação linear de $1/k_{\text{obs}}$ vs Φ_1 (Figura 4-6), podem-se obter os parâmetros a e b através do ajuste à Equação [1.30], a partir dos valores do declive e da ordenada na origem (Tabela 4-5).

Tabela 4-5: Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da Figura 4-6 à equação [1.30].

Parâmetro	Emulsão (4:6)
$10^2 a$	0,0037
b	572,50

Utilizando o valor de a e b calculou-se o valor de k_i e P_A^I , Tabela 4-6.

Tabela 4-6: Valores de P_A^I e k_i obtidos para a emulsão 4:6 a partir do ajuste dos dados da Figura 4-6 à equação [1.30].

Emulsão (4:6)	
P_A^I	k_i ($M^{-1} s^{-1}$)
349,5	0,010

4.5.2. Análise da distribuição do Ácido Cafeico

Conhecido o valor de P_A^I e aplicando as equações [1.32] e [1.33] do modelo da pseudofase simplificado (MCPS), obtém-se a percentagem de ácido cafeico nas regiões aquosa e interfásica da emulsão, para cada valor de Φ_i , (Figura 4-7).

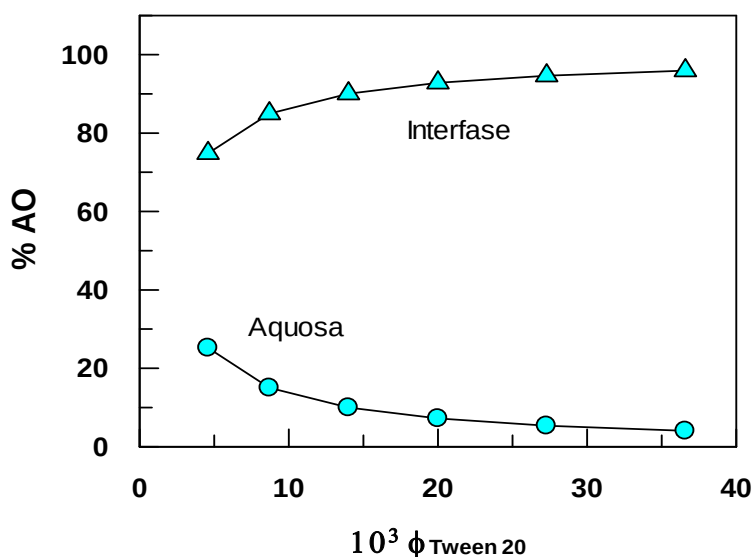


Figura 4-7: Variação da percentagem de ácido cafeico nas fases aquosa e interfásica do sistema emulsionado. Condições experimentais emulsão 4:6 (azeite/ tampão citrato 0,04 M, pH=3,0) / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,40 \times 10^{-4} M$, $[AO] = 3,5 \times 10^{-3} M$, $[NED] = 0,019 M$ e $T = 25^\circ C$.

Através dos resultados da *Figura 4-7*, verificou-se que para uma fração de emulsionante (Φ_I) de 0,005 mais de 70% do ácido cafeico encontra-se distribuído na região interfásica, e à medida que Φ_I aumenta a concentração deste também vai aumentando na interfase, ou seja, quando $\Phi_I=0,04$, cerca de 95% do antioxidante encontra-se na interfase.

Os resultados permitem-nos concluir que a fração em volume de emulsionante exerce uma influência significativa sobre a fração de antioxidante que se encontra em cada fase. Quanto maior for Φ_I (quer dizer, a concentração de emulsionante utilizado na preparação da emulsão) maior é a percentagem de ácido cafeico presente na interfase.

4.6. DISTRIBUIÇÃO DO CAFEIATO METILO EM EMULSÕES AZEITE/TAMPÃO CITRATO (O/A)

4.6.1. Determinação de k_{obs} mediante o método de derivatização e cálculo de P_O^I e P_A^I

Neste trabalho 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 cafeiato de metilo em emulsões 4:6 e 1:9 azeite/ tampão citrato (0,04 M, pH= 3,0) para frações de emulsionante (Tween 20) compreendida 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 4-8* está representado um exemplo de uma variação típica da absorvância do corante em função do tempo, bem como a representação de $\ln(A_t - A_\infty)$ em função do tempo.

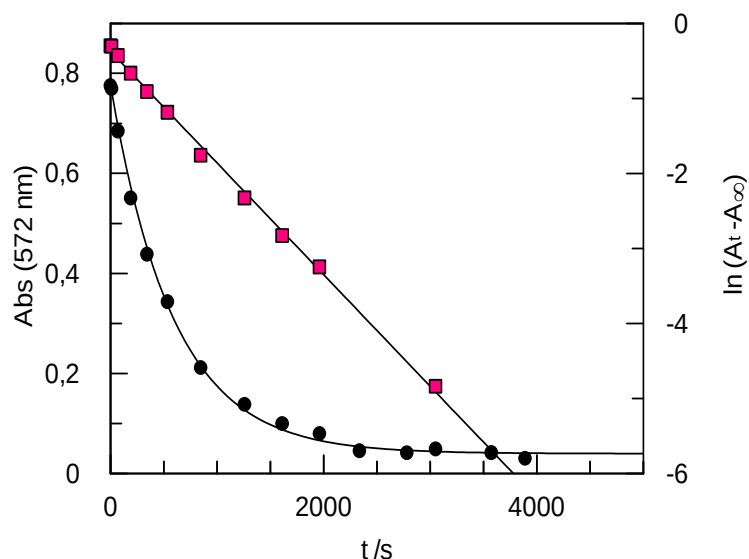


Figura 4-8: Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [A_t - A_\infty]$ vs tempo. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/tampão citrato 0,04 M, pH=3,0/ Tween 20), $\Phi_I=0,0274$, $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,40 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[AO] = 3,5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[NED] = 0,019 \text{ M}$ e $T = 25^\circ\text{C}$.

Como podemos verificar pelo valor de P_A^O (seção 4.4.1), este antioxidante distribui-se, provavelmente, pelas três fases da emulsão (aquosa, orgânica e interfásica), portanto são necessárias duas constantes de partição para descrever a distribuição, P_A^I e P_O^I , utilizando-se, neste caso, o modelo cinético completo da pseudofase (MCP).

Na *Figura 4-9* está representada a variação de k_{obs} com a fração de emulsionante, assim como os ajustes exponencial e linear às equações [1.11] e [1.12] do MCP.

Através do gráfico da *Figura 4-9*, pode-se verificar uma diminuição de k_{obs} à medida que o valor de Φ_I presente na emulsão aumenta. Verifica-se também que uma modificação da relação O/A causa efeito significativo sobre k_{obs} , para frações de emulsionantes mais altas.

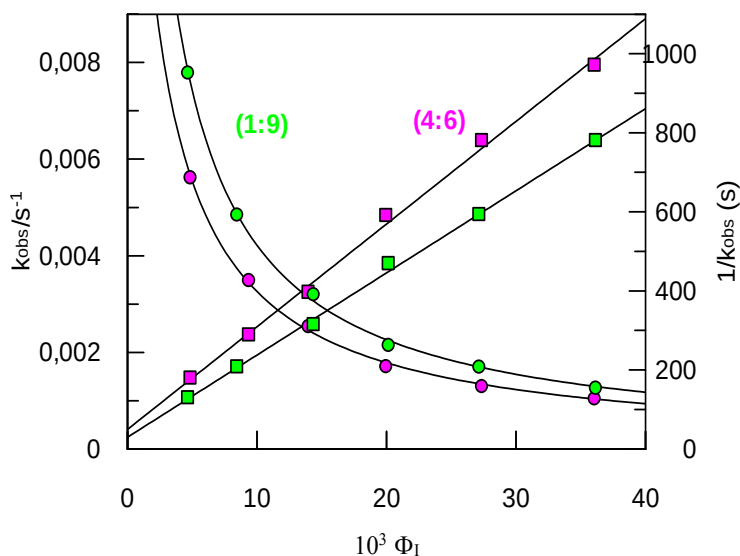


Figura 4-9: Representação de k_{obs} e $1/k_{\text{obs}}$ vs fração de emulsionante (Φ_I) com os respectivos ajustes às equações [1.11] e [1.12]. Condições experimentais: emulsão 1:9 e 4:6 (azeite/ tampão citrato 0,04 M, pH=3,0) / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,40 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{AO}] = 3,5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ e $T = 25^\circ \text{C}$.

Da representação linear de $1/k_{\text{obs}}$ vs Φ_I (Figura 4-9), podem-se obter os parâmetros a e b através do ajuste a Equação [1.12], a partir dos valores do declive e da ordenada na origem (Tabela 4-7).

Tabela 4-7: Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da Figura 4-9 à equação [1.12].

Parâmetro	Emulsão (1:9)	Emulsão (4:6)
$10^2 a$	3,4	1,9
b	700,7	393,5

Os valores de P_A^I e P_O^I podem ser calculados a partir dos dados experimentais por dois processos:

- A partir do valor de P_A^O da mistura binária e da variação k_{obs} vs Φ_I para uma determinada razão óleo/ água (O/A) (1:9 ou 4:6)
- A partir do estudo da variação k_{obs} vs Φ_I para duas emulsões óleo/ água distintas (1:9 e 4:6)

4.6.1.1. Constantes de partição obtidas a partir do valor de P_A^O da mistura binária e da variação k_{obs} vs Φ_I para a emulsão 4:6 ou 1:9.

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.

✓ Resolução do sistema de duas equações a duas incógnitas, P_O^I e P_A^I .

$$\begin{cases} b = \frac{P_A^I P_O^I (1 + \Phi_A / \Phi_O)}{P_A^I + \Phi_A / \Phi_O P_O^I} - 1 \\ P_A^O = \frac{P_A^I}{P_O^I} = 2,52 \end{cases}$$

Os valores P_O^I e P_A^I obtidos para a emulsão 4:6 e 1:9 (óleo/água) encontram-se na Tabela 4-8.

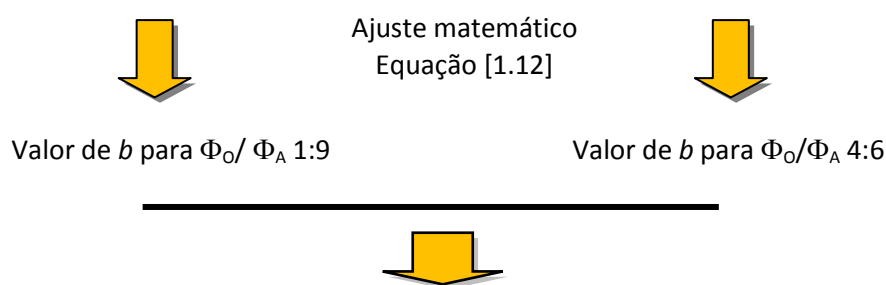
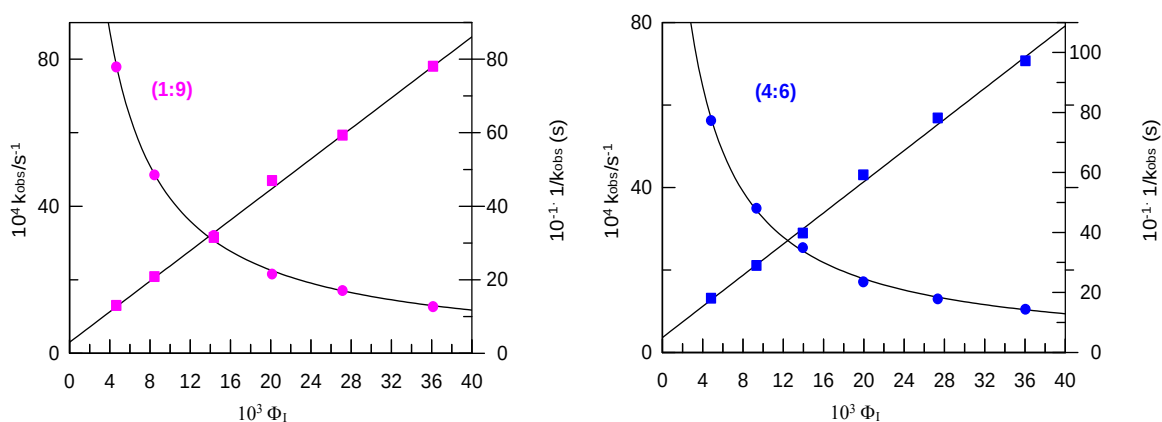
Tabela 4-8: Valores de P_O^I , P_A^I e k_I obtidos a partir da determinação espectrofotométrica de P_A^O e de vários ensaios (k_{obs} , Φ_I) para emulsões 4:6 e 1:9 (azeite/água), $T = 25^\circ\text{C}$.

Emulsão	$10^2 k_I (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	P_A^I	P_O^I	P_A^O
1:9	1,4	733,31	291,0	2,52
4:6	1,1	759,77	301,51	2,52

Os valores das constantes de partição obtidas para ambas as emulsões são similares, com uma diferença menor que 5%, o que quer dizer que a distribuição deste antioxidante não é afetada significativamente pela relação óleo/ água utilizada.

4.6.1.2. Constantes de partição obtidas a partir das variações de k_{obs} vs Φ_I para duas emulsões óleo/ água distintas (1:9 e 4:6)

A fim de validar o método utilizado anteriormente, considerou-se desejável comparar essa distribuição com a que se obteria para emulsões constituídas por duas razões óleo/água diferentes. Assim, determinou-se as constantes de partição P_O^I e P_A^I a partir do conjunto de dados k_{obs} vs Φ_I , obtidos para as duas emulsões O/A com frações O/A distintas (1:9 e 4:6).



✓ Resolução do sistema de duas equações a duas incógnitas, P_O^I e P_A^I

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

✓ Conhecendo P_O^I e P_A^I pode-se determinar k_I

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

Os valores obtidos para as constantes de partição, bem como o quociente que representa a constante de partição entre a fase aquosa e orgânica na ausência de agente emulsionante, P_A^O , encontram-se na *Tabela 4-9*.

Tabela 4-9: Valores de a, b, P_A^I , P_O^I , k_I e P_A^O obtidos a partir de duas razões óleo/água diferentes (4:6 e 1:9).

Emulsão	$10^2 a$	b	k_I (s ⁻¹)	P_A^I	P_O^I	P_A^O
1:9	3,4	700,7	0,014	719,93	311,73	2,31
4:6	1,9	393,5	0,011			

Como as constantes de partição obtidas através das duas formas de cálculo são iguais, podemos utilizar qualquer uma delas para determinar a distribuição do cafeiato de metilo. Os resultados não mostram variações significativas, logo são validas as duas formas de cálculo.

4.6.2. Determinação da distribuição do cafeiato de metilo

A partir das constantes de partição determinadas, pode-se calcular a percentagem de cafeiato de metilo presente nas diferentes fases da emulsão (oleosa, aquosa e interfase). Essa percentagem é dada pelas equações [1.16] [1.17] e [1.18].

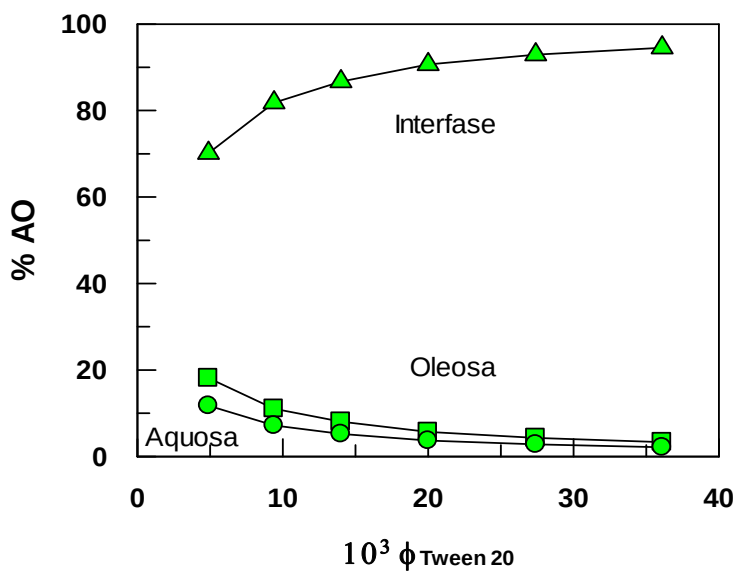


Figura 4-10: Variação da percentagem de cafeiato de metilo (C1) nas distintas fases do sistema emulsionado. Condições experimentais: emulsões 4:6 e 1:9 (azeite/tampão citrato 0,04M, pH= 3,0/ Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,4 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{AO}] = 3,5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$, $T = 25^\circ \text{C}$.

No cálculo desta distribuição foram utilizados os valores de P_A^I e P_O^I obtidos a partir do valor de P_A^O da mistura binária, e a variação k_{obs} vs Φ_I para uma relação óleo/ água. Verificou-se uma distribuição semelhante quando se utiliza os valores de P_A^I e P_O^I obtidos através das variações de k_{obs} vs Φ_I para duas emulsões óleo/ água distintas (1:9 e 4:6)

O cafeiato de metilo encontra-se maioritariamente distribuído na região interfásica, encontrando-se apenas cerca de 20% e 10 % na fase orgânica e na fase aquosa, respetivamente.

A percentagem de antioxidante na interfase aumenta com a quantidade de emulsionante utilizado, pelo que para uma fração de emulsionante de 0,037 a percentagem de antioxidante na interfase é de 90%.

4.7. DISTRIBUIÇÃO DO CAFEIATO ETILO EM EMULSÕES AZEITE/ TAMPÃO CITRATO (O/A)

4.7.1. Determinação de k_{obs} mediante o método de derivatização e cálculo de P_0^I e P_A^I

Neste trabalho estudou-se o efeito que a fração de emulsificante utilizada exerce sobre o valor de k_{obs} , da reação entre os iões 16-ArN_2^+ e o cafeiato de etilo em emulsões 4:6 azeite/tampão citrato (0,04 M, pH= 3,0) para frações de emulsificante (Tween 20) compreendida 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 4-11* está representado um exemplo de uma variação típica da absorvância do corante em função do tempo, bem como a representação de $\ln(A_t - A_\infty)$ em função do tempo.

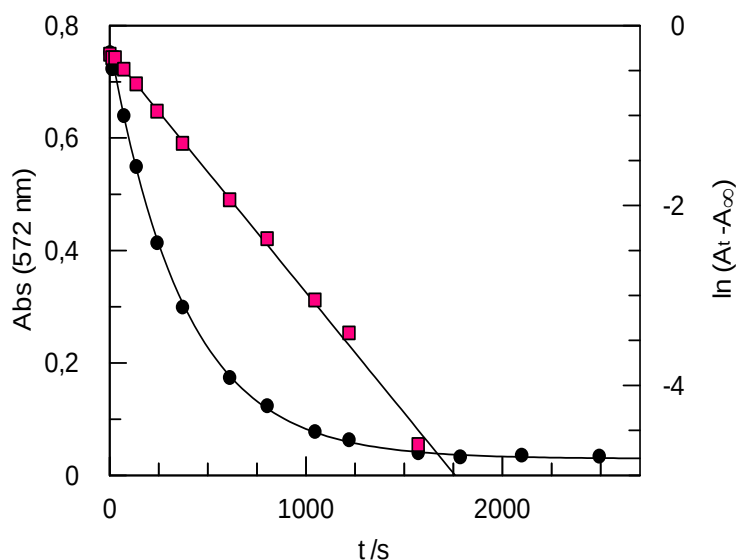


Figura 4-11: Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln[A_t - A_\infty]$ vs tempo, para o cafeiato de etilo. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/tampão citrato 0,04 M, pH=3,0/ Tween 20), $\Phi_1=0,019$, $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,40 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[AO] = 3,5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[NED] = 0,019 \text{ M}$ e $T = 25^\circ\text{C}$.

Como podemos verificar pelo valor de P_A^O (seção 4.4.1), este antioxidante distribui-se, provavelmente, pelas três fases da emulsão (aquosa, orgânica e interfásica), portanto são necessárias duas constantes de partição para descrever a distribuição, P_A^I e P_O^I , utilizando-se, neste caso, o modelo cinético completo da pseudofase (MCP).

Na *Figura 4-12* está representada a variação de k_{obs} com a fração de emulsificante, assim como os ajustes exponencial e linear às equações [1.11] e [1.12] do MCP.

Através do gráfico da *Figura 4-12*, pode-se verificar uma diminuição de k_{obs} à medida que o valor de Φ_I presente na emulsão aumenta. Verifica-se também que uma modificação da relação O/A causa efeito significativo sobre k_{obs} , para frações de emulsificantes mais altas.

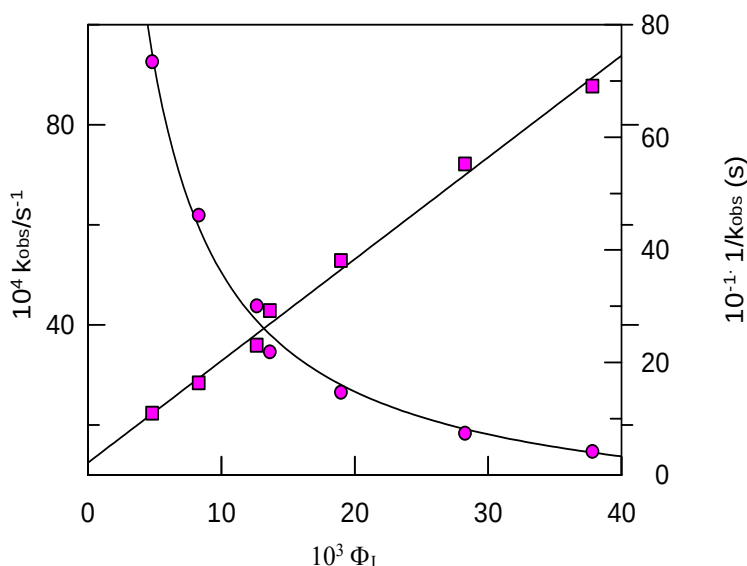


Figura 4-12: Representação de k_{obs} e $1/k_{obs}$ vs fração de emulsificante (Φ_I) com os respectivos ajustes às equações [1.11] e [1.12]. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/ tampão citrato, 0,04 M, pH=3,0), $[16-ArN_2^+] = 3,40 \times 10^{-4} M$, $[AO] = 3,5 \times 10^{-3} M$, $[NED] = 0,019 M$ e $T = 25^\circ C$.

Da representação linear de $1/k_{obs}$ vs Φ_I (*Figura 4-12*), podem-se obter os parâmetros a e b através do ajuste a Equação [1.12], a partir dos valores do declive e da ordenada na origem (*Tabela 4-10*).

Tabela 4-10: Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da *Figura 4-12* à equação [1.12].

Parâmetro	Emulsão (4:6)
$10^2 a$	4,7
b	847,3

Como já foi referido anteriormente, os valores de P_A^I e P_O^I podem ser obtidos a partir dos dados experimentais por dois processos:

- A partir do valor de P_A^O da mistura binária e da variação k_{obs} vs Φ_I para uma determinada razão óleo/ água (O/A) (1:9 ou 4:6)
- A partir do estudo da variação k_{obs} vs Φ_I para duas emulsões óleo/ água distintas (1:9 e 4:6)

Verificou-se no caso do cafeiato de metilo (*Secção 4.6.1.1 e 4.6.1.2*) que a distribuição do antioxidante é a mesma pelos dois processos. Portanto, no caso do cafeiato de etilo calculou-se as constantes de partição P_A^I e P_O^I , através do valor de P_A^O da mistura binária e da variação k_{obs} vs Φ_I para uma emulsão 4:6.

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.

- ✓ Resolução do sistema de duas equações a duas incógnitas, P_O^I e P_A^I .

$$\begin{cases} b = \frac{P_A^I P_O^I (1 + \Phi_A / \Phi_O)}{P_A^I + \Phi_A / \Phi_O P_O^I} - 1 \\ P_A^O = \frac{P_A^I}{P_O^I} = 7,80 \end{cases}$$

Os valores P_O^I e P_A^I obtidos para a emulsão 4:6 (óleo/água) encontram-se na Tabela 4-11.

Tabela 4-11: Valores de P_O^I , P_A^I e K_I obtidos a partir da determinação espectrofotométrica de P_A^O e de vários ensaios (k_{obs} , Φ_I) para uma emulsão 4:6 (azeite/água), $T = 25^\circ\text{C}$.

Emulsão	$10^2 k_I (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	P_A^I	P_O^I	P_A^O
4:6	1,55	3155,71	404,58	7,80

4.7.2. Determinação da distribuição do cafeiato de etilo

A partir das constantes de partição determinadas, pode-se calcular a percentagem de cafeiato de etilo presente nas diferentes fases da emulsão (oleosa, aquosa e interfase). Essa percentagem é dada pelas equações [1.16] [1.17] e [1.18].

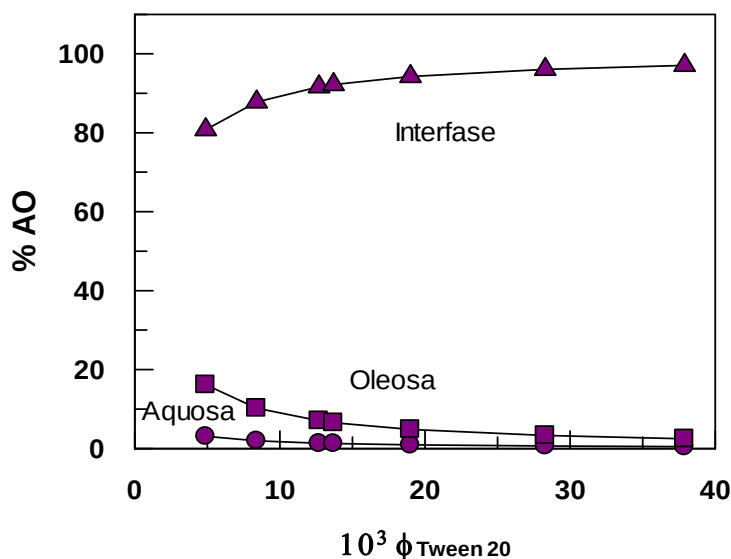


Figura 4-13: Variação da percentagem de cafeiato de etilo (C2) nas distintas fases do sistema emulsionado. Condições experimentais, emulsões 4:6 (azeite/tampão citrato 0,04M, pH=3,0/Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,4 \times 10^{-4}\text{M}$, $[\text{AO}] = 3,5 \times 10^{-3}\text{M}$, $[\text{NED}] = 0,019\text{M}$, $T = 25^\circ\text{C}$.

Os resultados que se encontram na *Figura 4-13* indicam que o cafeiato de etilo encontra-se, maioritariamente, distribuído na região interfásica, encontrando-se apenas cerca de 20% e 5 % na fase orgânica e na fase aquosa, respetivamente.

A percentagem de antioxidante na interfase aumenta com a quantidade de emulsionante utilizado, pelo que para uma fração de emulsionante de 0,04 a percentagem de antioxidante na interfase é cerca de 95%.

4.8. DISTRIBUIÇÃO DO CAFEIATO DE PROPILO, OCTILO E HEXADECILO EM EMULSÕES AZEITE/ TAMPÃO CITRATO (O/A)

4.8.1. Determinação de k_{obs} mediante o método de derivatização e cálculo de P_0^I

Neste trabalho 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 cafeiato de propilo, octilo e hexadecilo em emulsões 4:6 azeite/ tampão citrato (0,04 M, pH= 3,0) para frações de emulsionantes (Tween 20) compreendida 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 4-14* está representado um exemplo de uma variação típica da absorvância do corante em função do tempo, bem como a representação de $\ln(A_t - A_\infty)$ em função do tempo.

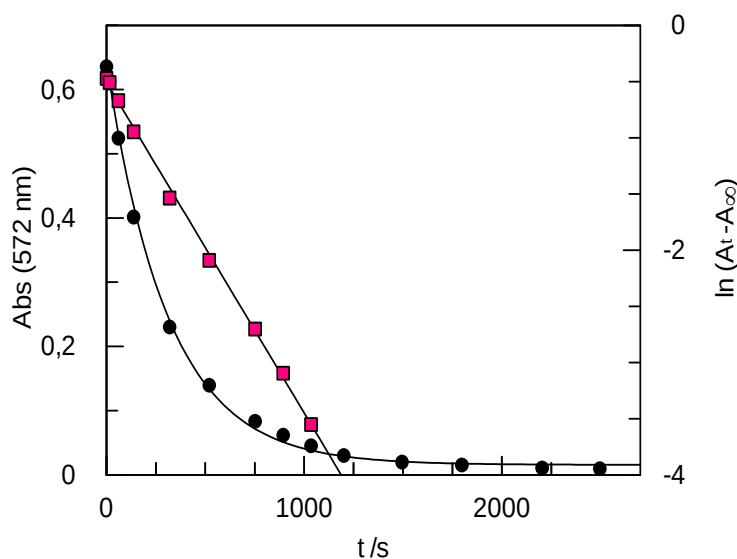


Figura 4-14: Variação da absorvância do corante azóico formado ao longo do tempo e representação de $\ln [A_t - A_\infty]$ vs tempo, para o cafeiato de propilo. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/tampão citrato 0,04 M, pH=3,0/ Tween 20), $\Phi_I=0,0092$, $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,40 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[AO] = 3,5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[NED] = 0,019 \text{ M}$ e $T = 25^\circ \text{C}$.

Dado que pelo menos 95 % destes antioxidantes se encontram na fase orgânica (ver anteriormente o valor de P_A^O), só é necessário uma constante de partição para descrever a distribuição, P_O^I , pelo que os dados experimentais podem ser interpretados com base no modelo simplificado da pseudofase, ajustando os dados (k_{obs} , Φ_I) às equações [1.22] e [1.25] deduzidas na secção 1.3.2.2. Através dos gráficos da Figura 4-15, pode verificar-se uma diminuição de k_{obs} à medida que o valor de Φ_I presente na emulsão aumenta para os três antioxidantes.

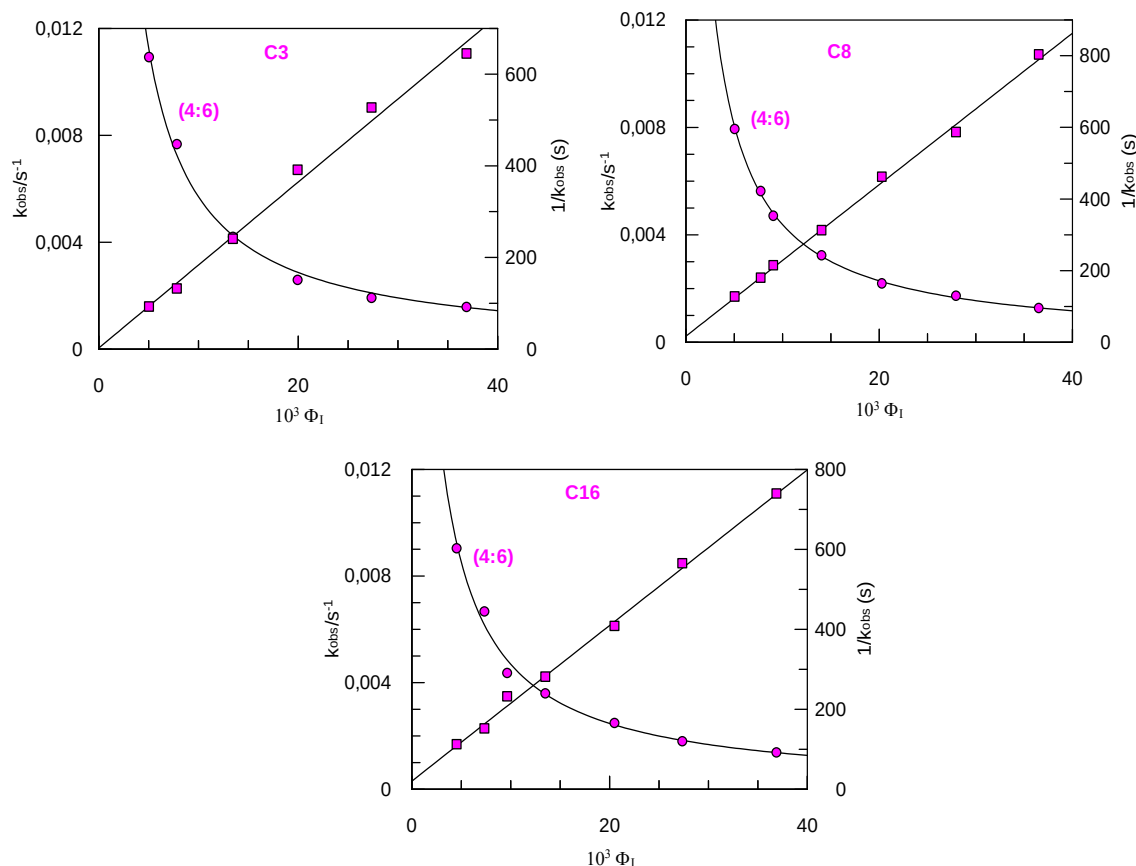


Figura 4-15: Representação de k_{obs} e $1/k_{\text{obs}}$ vs fração de emulsificante (Φ_1) com os respectivos ajustes às equações [1.22] e [1.25], para o C3, C8 e C16. Condições experimentais: emulsão 4:6 (azeite/ tampão citrato 0,04 M, pH=3,0) / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,40 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{AO}] = 3,5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ e $T = 25^\circ\text{C}$.

Da representação linear de $1/k_{\text{obs}}$ vs Φ_1 (Figura 4-15), podem-se obter os parâmetros a e b através do ajuste à Equação [1.25], a partir dos valores do declive e da ordenada na origem (Tabela 4-12).

Tabela 4-12: Valores dos parâmetros a e b obtidos a partir do ajuste dos dados da Figura 4-15 à equação [1.25].

Parâmetro	Emulsão (4:6) (C3)	Emulsão (4:6) (C8)	Emulsão (4:6) (C16)
$10^2 a$	3,48	4,73	5,10
b	1135,31	1254,48	966,50

A partir dos parâmetros a e b calcularam-se os valores de k_I e P_O^I , Tabela 4-13.

Tabela 4-13: Valores de P_O^I e k_I obtidos para a emulsão 4:6, a partir do ajuste dos dados da Figura 4-15 à equação [1.25].

Emulsão (4:6) C3		Emulsão (4:6) C8		Emulsão (4:6) C16	
P_O^I	k_I ($M^{-1} s^{-1}$)	P_O^I	k_I ($M^{-1} s^{-1}$)	P_O^I	k_I ($M^{-1} s^{-1}$)
454,2	0,010	501,79	0,014	376,44	0,015

4.8.2. Determinação da distribuição do cafeiato de propilo, octilo e hexadecilo

Conhecido o valor de P_O^I e aplicando as equações [1.27] e [1.28] do modelo da pseudofase simplificado (MCPS), obtém-se a percentagem de antioxidante nas regiões orgânica e interfásica da emulsão, para cada valor de Φ_I , (Figura 4-16).

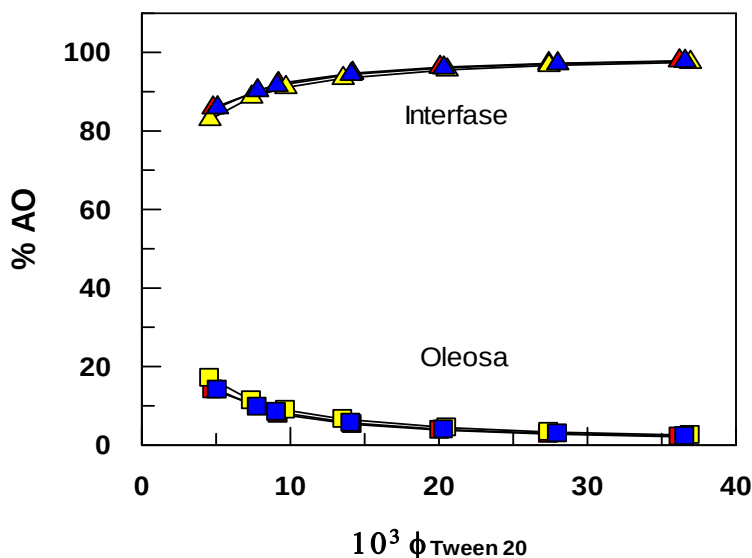


Figura 4-16: Variação da percentagem do cafeiato de propilo (vermelho), octilo (azul) e hexadecilo (amarelo) nas fases orgânica e interfásica do sistema emulsionado. Condições experimentais emulsão 4:6 (azeite/ tampão citrato 0,04 M, pH=3,0) / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^+] = 3,40 \times 10^{-4} M$, $[AO] = 3,5 \times 10^{-3} M$, $[NED] = 0,019 M$ e $T = 25^\circ C$.

Os resultados que se encontram na *Figura 4-16* indicam que mais de 80% do cafeiato de propilo, octilo e hexadecilo encontram-se distribuídos na região interfásica, e à medida que Φ_I aumenta a percentagem de antioxidante na interfase também aumenta, ou seja, quando $\Phi_I=0,040$ cerca de 99% dos antioxidantes encontram-se na interfase.

Os resultados permitem-nos concluir que a fração em volume de emulsionante exerce uma influência significativa sobre a fração de antioxidante que se encontra em cada fase. Quanto maior for Φ_I (quer dizer, a concentração de emulsionante utilizado na preparação da emulsão) maior é a percentagem de antioxidante na interfase. Para a Φ_I mais baixa utilizada (0,005), o cafeiato de hexadecilo, encontra-se numa percentagem ligeiramente superior na fase oleosa e, por conseguinte, numa percentagem inferior na interfase, relativamente aos derivados propilo e octilo. No entanto, estes três antioxidantes distribuem-se nas duas fases de modo bastante semelhante, com diferenças inferiores a 5%.

4.9. ANÁLISE COMPARATIVA DA DISTRIBUIÇÃO DO ÁCIDO CAFEICO E DOS SEUS DERIVADOS

Com os resultados anteriormente apresentados, podemos analisar em conjunto (Figura 4-17) como varia a percentagem do ácido cafeico e dos seus derivados em cada uma das regiões (aquosa, oleosa e interfase) de uma emulsão 4:6 (azeite/ tampão citrato 0,04 M, pH=3,0).

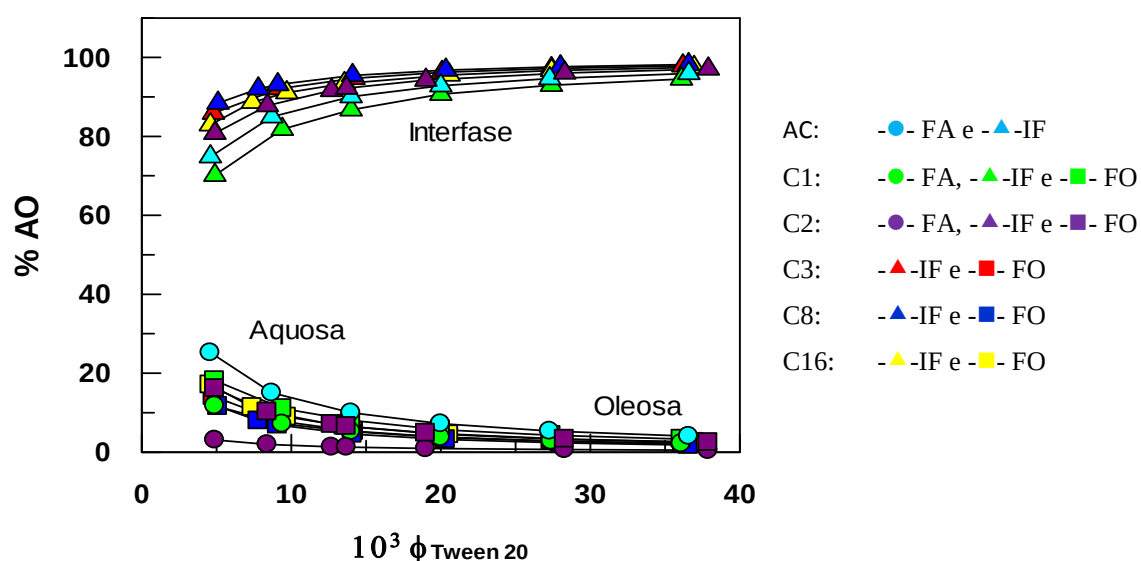


Figura 4-17: Variação da percentagem do ácido cafeico e dos seus derivados nas fases orgânica, aquosa e interfásica do sistema emulsionado. Condições experimentais emulsão 4:6 (azeite/ tampão citrato 0,04 M, pH=3,0) / Tween 20), $[16\text{-ArN}_2^{+}] = 3,40 \times 10^{-4} \text{ M}$, $[\text{AO}] = 3,5 \times 10^{-3} \text{ M}$, $[\text{NED}] = 0,019 \text{ M}$ e $T = 25^\circ \text{C}$.

Tabela 4-14: Valores de P_O^I , P_A^I , k_I e P_A^O , obtidos para o ácido cafeico e seus derivados.

		Ácido Cafeico	C1	C2	C3	C8	C16
Emulsão 4:6 (azeite/água)	P_O^I	----	311,73	404,58	454,12	501,79	376,44
	P_A^I	349,15	719,93	3155,71	----	----	----
	k_I	0,011	0,011	0,015	0,010	0,014	0,015
	P_A^O	----	2,31	7,80	----	----	----

Através da *Figura 4-17*, podemos verificar que o ácido cafeico se encontra distribuído pela fase aquosa e pela interfase, onde se encontra em mais de 70%. Já os derivados cafeiato de metilo e etilo encontram-se distribuídos pelas três regiões do sistema emulsionado (aquosa, oleosa e interfase), sendo o C1 o antioxidante que se encontra em menor percentagem na interfase da emulsão, para todas as frações de emulsionante utilizadas, mas em especial para as percentagens mais baixas. Todos os outros derivados do ácido cafeico (cafeiato de propilo, octilo e hexadecilo) encontram-se distribuídos apenas entre a região oleosa e interfásica, estando maioritariamente na interfase do sistema emulsionado, em percentagem superiores a 80%.

Os resultados permitem-nos concluir que a fração em volume de emulsionante exerce uma influência significativa sobre a fração de antioxidante que se encontra em cada fase. Quanto maior for Φ_I (quer dizer, a concentração de emulsionante utilizado na preparação da emulsão) maior é a percentagem de ácido cafeico e seus derivados presente na interfase. Esta variação é superior para o ácido cafeico e para o cafeiato de metilo.

Em relação aos valores de P_O^I obtidos para os antioxidantes estudados, pode-se observar uma tendência para o aumento do valor de P_O^I a partir do C1, encontrando-se o seu máximo para o cafeiato de octilo, decrescendo ligeiramente para o cafeiato de hexadecilo. Se atendermos à definição de P_O^I , isto indica-nos que para valores maiores de P_O^I maior é quantidade de antioxidante na interfase e, deste modo, o composto que se espera existir em maior percentagem na interfase será o C8 seguido do C3, C2, C16 e por fim o C1.

Em relação a reatividade do ácido cafeico e seus derivados na interfase, os valores de k_I são muito similares, o que nos indica que existe uma reatividade intrínseca muito similar para todos os antioxidantes, dado que unicamente se modifica a longitude da cadeia alquilo.

4.10. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Tal como já foi referido, a eficácia de um antioxidante depende, entre outros fatores, da sua localização na emulsão. Com a finalidade de correlacionar a distribuição do ácido cafeico e os seus derivados com a atividade antioxidante, efetuou-se uma série de experiências para determinar a eficácia destes antioxidantes em emulsões.

4.10.1. Método DPPH

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

Na *Figura 4-18* 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 de cafeiato de propilo.

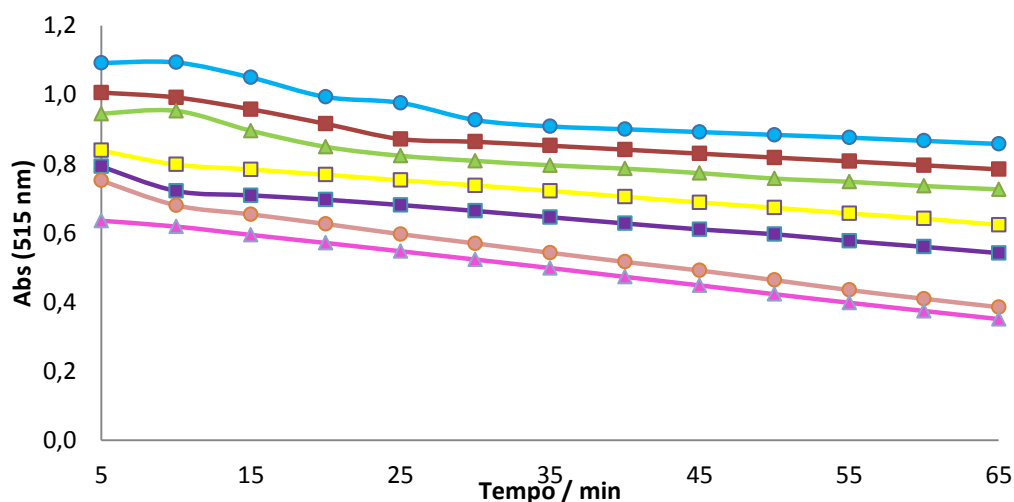


Figura 4-18: Variação da absorvância do radical DPPH ($\lambda = 515$ nm) na presença de diferentes concentrações do cafeiato de propilo -●- 0,063 mol de AO/ mol DPPH, -■- 0,099 mol de AO/mol DPPH, -▲- 0,132 mol de AO/ mol DPPH, -□- 0,165 mol de AO/ mol DPPH, -■- 0,198 mol de AO/ mol DPPH, -●- 0,231 mol de AO/ mol DPPH e -▲- 0,264 mol de AO/ mol 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 4-19*).

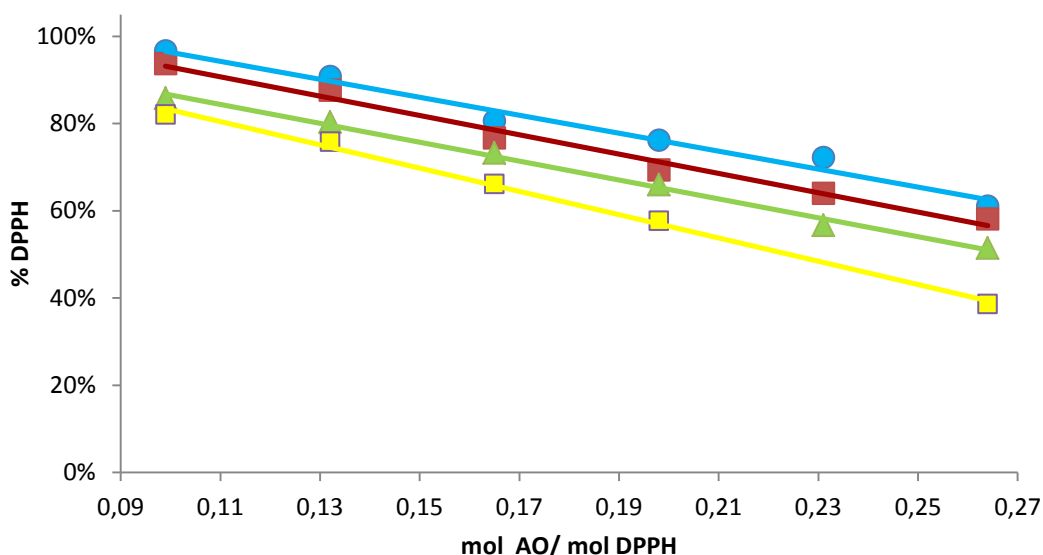


Figura 4-19: Representação da variação da percentagem de DPPH com a concentração de antioxidante (ex. cafeiato de propilo), expressa em mol AO/ mol DPPH, para os distintos tempos de reação, com o correspondente ajuste linear. (-●- 5 min, -■- 15 min, -▲- 30 min, -■- 60 min).

Os valores de EC_{50} obtidos para o ácido cafeico e seus derivados encontram-se na *Tabela 4-15*.

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 antiradicalar.

Tabela 4-15: Valores de EC₅₀ obtidos para diferentes tempos de reação.

t / min	5	15	30	60
Antioxidante	EC ₅₀ ± σ	EC ₅₀ ± σ	EC ₅₀ ± σ	EC ₅₀ ± σ
CA	0,330 ± 0,005	0,329 ± 0,001 *	0,334 ± 0,002*	0,344 ± 0,005*
C1	0,308 ± 0,012	0,290 ± 0,008	0,262 ± 0,005	0,222 ± 0,010
C2	0,323 ± 0,005	0,277 ± 0,005	0,263 ± 0,003	0,2328 ± 0,006
C3	0,322 ± 0,002	0,291 ± 0,006	0,270 ± 0,017	0,225 ± 0,001
C4	0,310 ± 0,006	0,293 ± 0,009	0,269 ± 0,005	0,216 ± 0,006
C6	0,315 ± 0,005	0,262 ± 0,008	0,233 ± 0,006	0,198 ± 0,007
C8	0,293 ± 0,012	0,269 ± 0,013	0,239 ± 0,005	0,199 ± 0,005
C10	0,333 ± 0,003	0,285 ± 0,003	0,254 ± 0,009	0,212 ± 0,008
C12	0,315 ± 0,004	0,294 ± 0,007	0,266 ± 0,006	0,211 ± 0,002
C14	0,317 ± 0,008	0,298 ± 0,001	0,257 ± 0,003	0,199 ± 0,005
C16	0,314 ± 0,003	0,282 ± 0,007	0,244 ± 0,001	0,196 ± 0,006

EC₅₀ 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 EC₅₀ para o ácido cafeico mantém-se mais ou menos constante ao longo do tempo, ao contrário do que acontece com os seus derivados. De fato, 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 caracterizadas 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 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.

4.10.2. Teste da Estufa de Schaal (“Schaal Oven Test”)

4.10.2.1. Método Padrão

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

A determinação do grau de oxidação lipídica foi efetuada através da determinação do conteúdo em dienos conjugados.

A *Figura 4-120* e a *Figura 4-21* representam o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a alcançar o valor de 0,5 % nas emulsões, contendo 0,5 % e 1 % de emulsionante, respetivamente.

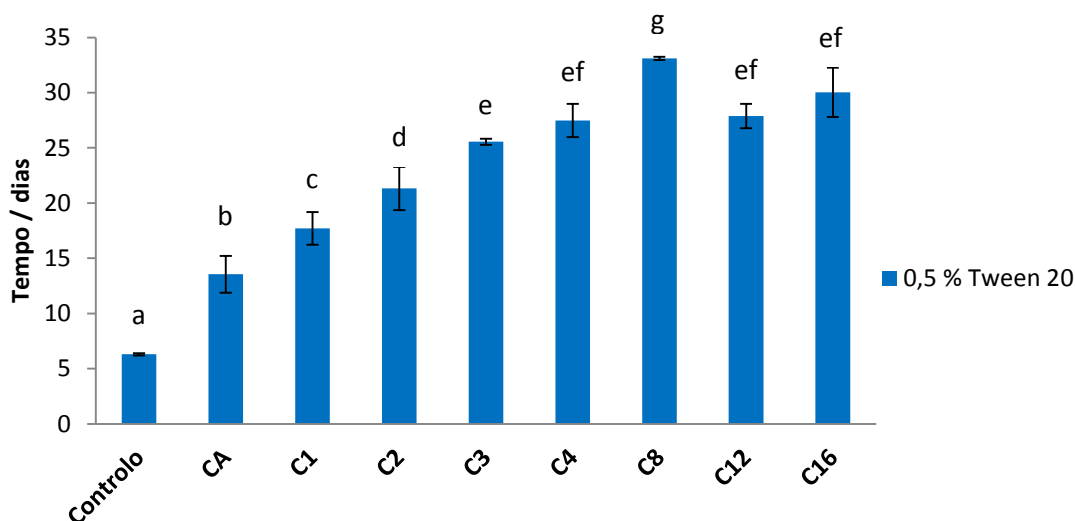


Figura 4-20: Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0,5% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: emulsões 4:6 (Azeite/Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,0/ Tween 20), [AO] = 0,6 mM.

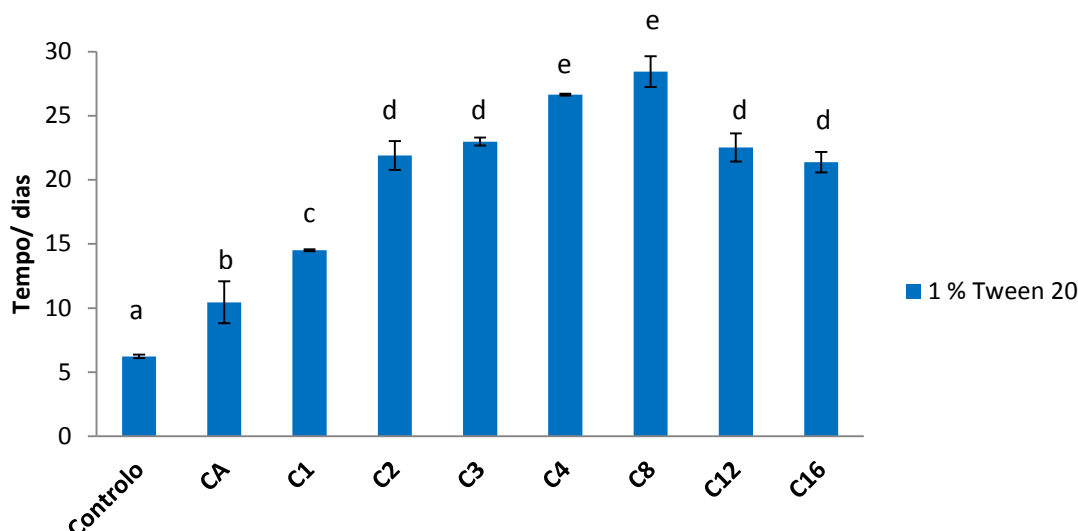


Figura 4-21: Tempo (dias) para que as emulsões contendo 1% de emulsionante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão e letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: emulsões 4:6 (Azeite/ Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,0/ Tween 20), e [AO] = 0,6 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 0,5 %, a ordem de atividade antioxidante foi: cafeiato de octilo > cafeiato de hexadecilo = cafeiato de butilo = cafeiato de dodecilo = cafeiato de propilo > cafeiato de etilo > cafeiato de metilo > ácido cafeico > controlo.

Relativamente à percentagem de emulsionante de 1%, a ordem de eficácia antioxidante foi bastante semelhante à obtida anteriormente para 0,5% de emulsionante: cafeiato de octilo = cafeiato de butilo > cafeiato de dodecilo = cafeiato de propilo = cafeiato de hexadecilo = cafeiato de etilo > cafeiato de metilo > ácido cafeico > controlo.

O paradoxo polar prevê que os antioxidantes mais polares sejam mais eficazes em meios menos polares e que 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 os antioxidantes mais hidrofóbicos, como o cafeiato de hexadecilo, apresentam menor eficácia que o cafeiato de octilo nos sistemas emulsionados utilizados. A eficácia dos antioxidantes aumenta até ao cafeiato de octilo, decrescendo para os antioxidantes com cadeias hidrocarbonadas maiores que 8 carbonos. Resultados semelhantes foram encontrados por Medina *et al* ^[127] para uma série de ésteres do 3,4-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol) em emulsões de óleo de peixe/água. Estes autores observam um aumento da

atividade antioxidante destes ésteres do hidroxitirosol, do próprio hidroxitirosol para o octanoato de hidroxitirosol e uma diminuição da atividade antioxidante para o laurato de hidroxitirosol.

A atividade antioxidante numa emulsão depende da partição e distribuição dos antioxidantes entre as diferentes fases que a constituem, da estabilidade dos antioxidantes e, muito particularmente dos fenómenos interfásicos ao nível da interfase óleo/água. Desta forma, a concentração de antioxidante na interfase 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 bastante semelhante, as diferenças observadas só podem advir da diferente distribuição dos vários antioxidantes nas emulsões. Assim, os antioxidantes que se encontram em maior percentagem na interfase, para uma mesma quantidade de emulsionante, parecem exercer uma atividade antioxidante melhor. No caso concreto do C1, verificou-se a existência de uma menor percentagem de antioxidante na interfase relativamente ao ácido cafeico (CA), mas melhor capacidade antioxidante. Este fato poderá ser explicado pela maior percentagem de antioxidante na fase oleosa. Enquanto, que o CA dissolvido na fase aquosa não poderá interagir diretamente com os radicais lipídicos formados na fase oleosa, o derivado C1 já o poderá fazer apresentando por isso melhor atividade antioxidante.

Contrariamente ao esperado, o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demora a alcançar o valor de 0,5 % aparentemente diminuiu com o aumento da percentagem de emulsionante, para alguns dos antioxidantes testados. Embora ocorra um aumento da quantidade do antioxidante na interfase, com o aumento da quantidade de emulsionante ocorre igualmente uma diluição do antioxidante que se encontra na interfase. O resultado da atividade antioxidante dependerá assim, por um lado, de um balanço entre o aumento da quantidade do antioxidante na interfase e, por outro, da diluição que ocorre. De modo a verificar este fato efetuou-se uma terceira experiência em que foram utilizados para um mesmo antioxidante, emulsões contendo diferentes quantidades de emulsionante.

Na *Figura 4-22* está representado o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a alcançar o valor de 0,5 % nas emulsões de 0,5 %, 1% e 2% de emulsificante, para alguns antioxidantes (CA, C1, C8, C12 e C16).

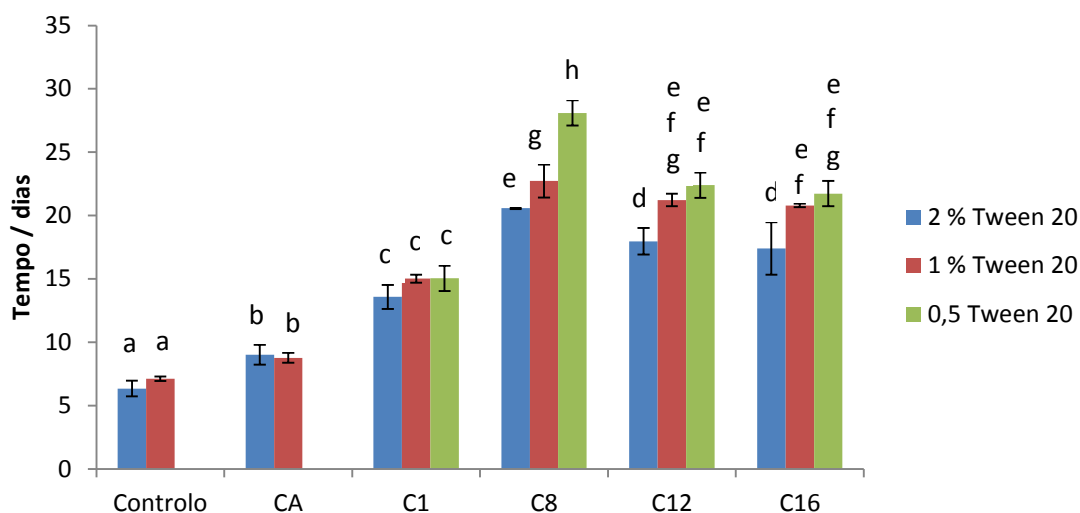


Figura 4-22: Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0,5%, 1% e 2% de emulsificante, atingissem o conteúdo em CD de 0,5 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: emulsões 4:6 (Azeite/ Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,0/ Tween 20) e [AO] = 0,6 mM.

De fato, verifica-se que para os compostos em que há um maior aumento da percentagem de antioxidante na interfase com o aumento da quantidade de emulsificante, como é o caso do ácido cafeico e o cafeiato de metilo, o efeito da diluição na atividade antioxidante é menos sentido do que para os compostos, cuja quantidade na interfase não é tao afetada pelo aumento da quantidade de emulsificante. Uma vez que a percentagem de antioxidante na interfase é semelhante, o efeito da diluição é mais acentuado.

4.10.2.2. Método utilizando AAPH como iniciador radicalar

Com o objetivo de diminuir o tempo de experiência utilizou-se o AAPH como iniciador radicalar. Assim, estudou-se a atividade antioxidante de vários derivados do ácido cafeico (C3, C4, C6, C8, C10, C12, C14 e C16) em emulsões formadas por 1 mL de azeite/ 9 mL de tampão citrato (0,04 M e pH= 3,6), com 0,5 % de emulsificante Tween 20, contendo 0,6 mM de cada um dos referidos antioxidantes e 1 mL de solução aquosa de AAPH 10 mM. Para tal, submeteram-se as emulsões a um teste de aceleração oxidativa a uma temperatura de 60 °C (teste da estufa de Schaal). Assim, verificou-se para todas as emulsões preparadas uma menor estabilidade quando comparadas com os resultados das experiências executadas na ausência de AAPH.

A Figura 4-23 representa o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demorou a alcançar o valor de 1 % em emulsões com 0,5 % de emulsificante, utilizando o AAPH como iniciador radicalar.

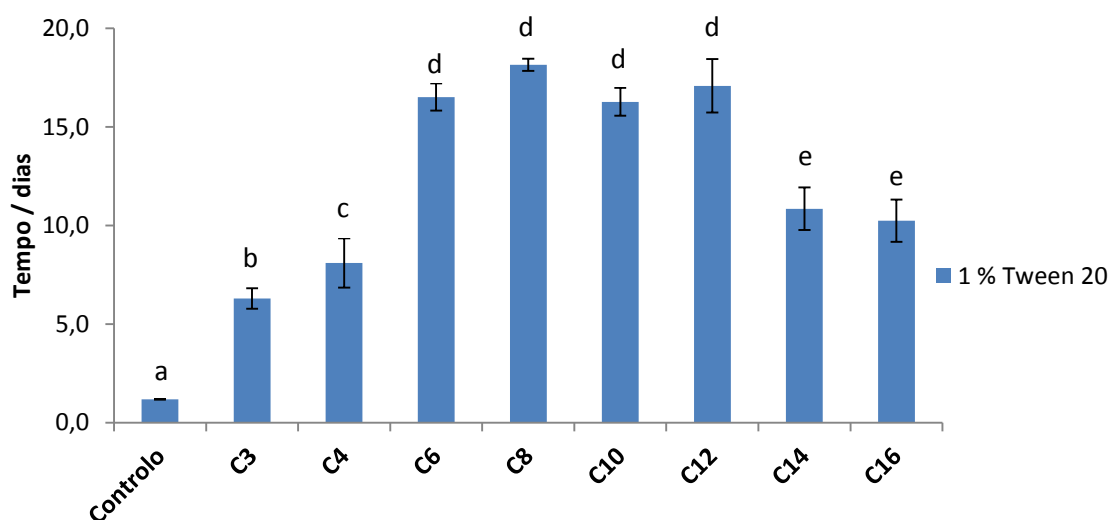


Figura 4-23: Tempo (dias) para que as emulsões contendo 0,5 % de emulsificante, atingissem o conteúdo em CD de 1 %. Os valores representam médias de triplicados (barras de erro representam o desvio padrão, letras iguais correspondem a valores estatisticamente iguais e letras diferentes a valores estatisticamente diferentes). Condições experimentais: emulsões 4:6 (Azeite/ Tampão citrato, 0,04 M, pH= 3,6/ Tween 20) e [AO] = 0,6 mM.

De acordo com o tempo que o conteúdo em dienos conjugados demora a atingir o valor de 1% para a percentagem de emulsionante de 0,5 % e com iniciador radicalar AAPH, a ordem de atividade antioxidante foi: cafeiato de octilo = cafeiato de dodecilo = cafeiato de decanoilo = cafeiato de hexilo > cafeiato de tetradecilo = cafeiato de hexadecilo > cafeiato de butilo > cafeiato de propilo > controlo.

Verificou-se que, do mesmo modo, que para os ensaios efetuados na ausência de AAPH, ocorre um aumento da atividade antioxidante com o aumento da cadeia alquilo, diminuindo com a continuação deste aumento da cadeia. No entanto, não foram encontradas diferenças entre os derivados com a atividade antioxidante superior, possuindo cadeias alquilo de tamanho intermédio (C6-C12). Observa-se um aumento brusco da atividade antioxidante do derivado C4 para o C6 e depois uma diminuição brusca da atividade do derivado C12 para o C14.

5. CONCLUSÕES

Estudou-se a distribuição do ácido cafeico e alguns dos seus ésteres sintetizados para o efeito, através da determinação das constantes de partição do AO entre as regiões aquosa-interfásica e oleosa-interfásica de emulsões alimentares modelo, sem necessidade de separação de fases ou pré-tratamento. Para o efeito, utilizou-se um método cinético em que os resultados obtidos foram analisados com base no modelo da pseudofase estendido a emulsões. Para tal, aplicou-se um tratamento matemático simplificado ou completo, dependendo da solubilidade de cada antioxidante. Através deste método foi possível obter-se uma estimativa da constante de velocidade na região interfásica da reação, k_i , entre os antioxidantes e os iões 4-hexadecilbenzenodiazonio.

Após a análise efetuada a todos os resultados obtidos, pode concluir-se que o ácido cafeico está distribuído maioritariamente na região interfásica e aquosa. O cafeiato de metilo e o cafeiato de etilo estão distribuídos principalmente na região interfásica e oleosa, estando presentes em pequenas quantidades na região aquosa. O cafeiato de propilo, octilo e hexadecilo encontram-se distribuídos essencialmente pelas regiões interfásica e oleosa.

Em relação aos valores de P_O^I obtidos para os ésteres do ácido cafeico estudados, pode-se observar uma tendência para o aumento do valor de P_O^I a partir do C1, encontrando-se o seu máximo para o cafeiato de octilo, decrescendo ligeiramente para o cafeiato de hexadecilo. Se atendermos à definição de P_O^I , isto indica-nos que para valores maiores de P_O^I é esperada uma maior quantidade de antioxidante na interfase.

Em relação a reatividade do ácido cafeico e dos seus derivados na interfase, os valores de k_i são muito similares o que nos indica que existe uma reatividade intrínseca muito semelhante para todos os antioxidantes, dado que unicamente se modifica a longitude da cadeia alquilo.

Quanto ao estudo da atividade antiradicalar através do método DPPH, podemos concluir que em solução metanólica, ao fim de 5 minutos de reação, não existem diferenças significativas na atividade antiradicalar do ácido cafeico e dos seus derivados mais hidrofóbicos frente ao radical DPPH, consequência da estrutura fenólica comum a todos eles. No entanto, o valor de EC_{50} para o ácido cafeico mantém-se mais ou menos constante ao longo do tempo, ao contrário do que acontece com os seus derivados que diminuem de uma forma semelhante.

Avaliou-se a eficácia dos diversos antioxidantes em emulsões azeite / tween 20/ água, através do teste da estufa de Schaal (método padrão e método que utiliza o AAPH como iniciador radicalar). Verificou-se que com o aumento da esterificação ocorreu um aumento

acentuado da capacidade antioxidante de todos os compostos relativamente ao ácido cafeico. Contudo, este aumento da capacidade antioxidante ocorreu do C1 até ao derivado C8, tendo diminuído um pouco para os derivados com cadeias alquila superiores.

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 bastante semelhante, as diferenças observadas só podem advir da diferente distribuição dos vários antioxidantes nas emulsões. Assim, os antioxidantes que se encontram em maior percentagem na interfase, para uma mesma quantidade de emulsionante, parecem exercer uma atividade antioxidante melhor. No caso do C1 verificou-se a existência de uma menor percentagem de antioxidante na interfase relativamente ao ácido cafeico (CA). No entanto, este apresentou uma melhor capacidade antioxidante, provavelmente, porque possui uma maior capacidade antiradicalar, por um lado, e por outro, porque a sua percentagem na fase oleosa onde se encontram inicialmente os radicais lipídicos é superior.

Contrariamente ao esperado, a estabilidade das emulsões diminuiu com o aumento da percentagem de emulsionante para alguns dos antioxidantes testados. Embora ocorra um aumento da quantidade do antioxidante na interfase com o aumento da quantidade de emulsionante, ocorre igualmente uma diluição do antioxidante que se encontra na interfase. O resultado da atividade antioxidante dependerá assim, por um lado, de um balanço entre o aumento da quantidade do antioxidante na interfase e, por outro, da diluição que ocorre.

No teste da estufa de Schaal, utilizando o AAPH como iniciador radicalar, verificou-se, igualmente de um modo geral, um aumento acentuado da atividade antioxidante com o aumento da cadeia alquila (até C8), para depois diminuir com a continuação deste aumento da cadeia. Uma vez que o ataque por parte dos radicais se inicia a partir da fase aquosa, verifica-se que os antioxidantes que se encontram em maior percentagem na interfase, apresentam melhor atividade antioxidante.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1]** Allen, J.St. A., Lipid Oxidation in Foods, *Food science and Nutrition.*, **1996**, 36, 175-224.

- [2] Castera-Rossignol, A., Bosque F., Nouvelle approche des anti-oxydants. *OCL*, **1995**, 1, 131-143.
- [3] Alaiz, M., Zamora, R., Hidalgo, F. J., Natural Antioxidants Produced in Oxidized Lipid/Amino Acid Browning Reactions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1995**, 72, 1571-1575.
- [4] Reynhout G., The Effect of Temperature on the Induction Time of a Stabilized Oil, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1991**, 68, 983-984.
- [5] Nwosu, C.V., Boyd L.C., Sheldon, B., Effect of Fatty Acid Composition of Phospholipids on Their Antioxidant Properties and Activity Index, *J. Am Oil Chem. Soc.*, **1997**, 74, 293-297.
- [6] Madsen, H.L., Bertelsen, G., Spices as antioxidants, *Trends Food Sci. Technol*, **1995**, 6, 271-277.
- [7] Frankel, E.N., In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends Food Sci. Technol*, **1993**, 4, 220-225.
- [8] Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K., Jadhav, S.J., Nimbalkar, S.S., Kulkarni, A.D., In Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives. *Edited by* Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D.K., Marcel Dekker Inc., New York, **1996**, 5-63.
- [9] Sherwin, E.R., Oxidation and Antioxidants in Fat and Oil Processing, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1978**, 55, 809-814.
- [10] Berset, C. Cuvelier, M. E., Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant, *Sciences des Aliments*, 16, 219-245.
- [11] Coupland, J.N., McClements, D.J., Lipid oxidation in food emulsions. *Trends Food Sci. Technol*, **1996**, 7, 83-91.
- [12] Frankel, E.N., Huang S.-W., Kanner J., German J.B., Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions, *J. Agric Food Chem.*, **1994**, 42, 1054-1059.
- [13] Berset, C., Cuvelier, M.-E., *Sciences des Aliments*, **1996**, 16, 219.
- [14] Antoniasse, R., "Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras", Boletim do centro de Pesquisa e processamento de alimentos, Curitiba, **2001**, 19, 353-380.
- [15] Ladikos, D., Lougovois, V., Lipid Oxidation in muscle Foods: A review, *Food Chem.* **1990**, 35, 295-314

- [16] Coupland, J. N., McClements, D.J., Lipid oxidation in food emulsions, *Trends Food Sci. & Technol.*, **1996**, 7, 83-91.
- [17] Hamilton, R. J., Rossell, J. B., Hudson, B. J. F. Löliger, J., *In Rancidity in Foods*; Allen J. C., Ed.; Applied Science Publishers LTD.; London, **1983**, 1.
- [18] Choe, E. and Min, D.B., Mechanisms and Factors for edible oil oxidation, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **2006**, 5, 169-186.
- [19] Shahidi, F., Yung, J., Rubin, L.J., Wood, D.F., *Can. Inst. Food Sci. Technol*, **1987**, 20,104.
- [20] Frankel, E. N., Lipid Oxidation, *Progr. Lipid Res.*, **1980**, 19,1-22.
- [21] DeMan, J. M., En Fatty Acids in Foods and their Health Implications. Ch. K Chow(ed), Marcel Dekker Inc, New York, **1992**, 17.
- [22] Dobarganes, C., Velasco, J., Oxidative stability of virgin olive oil, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2002**, 104, 661-676.
- [23] Cort, W. M., Scott, J. W., Araujo, M., Mergens, W.J., Cannalunga, M. A., Osadca, M., Harley, H., Parrish, D.R. & Pool, W. R., Antioxidant activity of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic Acid, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1975**, 52, 174-178.
- [24] Belitz, D., Grosch, W., Schieberle, P. “ Food Chemistry”, 3rd revised edition, Springer, **2004**, 194-196, 201, 205-206, 232-240, 463, 464, 822.
- [25] Coultate, TP., Food The chemistry of its components, *Royal Society of Chemistry*, **1984**, 50, 53 e 173.
- [26] Fenneme, O.R., “Química de los alimentos”, Editorial Acribia, S.A. Department of Food Science, University of Wiscosin-Madison, Madison-Wiscosin, **1993**, 197-221 e 263-265.
- [27] Frankel, E.N., Lipid Oxidation, *The oily Press, Dundee*, **1998**,166.
- [28] Frankel, E.N., Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality, *Food Chemistry*, **1996**, 57 (1), 51-55.
- [29] Porter, W. L., Paradoxical Behavior of Antioxidants in Food and Biological Systems, *Toxical, Ind. Health*, **1993**, 9, 93-122.

- [30] Silva, F. A. M., Ferreira, M.A., Métodos para a avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante, *Química Nova*, **1999**, 22 (1), 94-103.
- [31] Aruma, O. I., Free Radicals and Antioxidants in Food Science, *Chapman & Hall, U.K.*, **1998**.
- [32] Gordon, H. M. Antioxidants in Food: Practical Applications, *CRC Press: Boca Raton, N. Y.*, **2001**.
- [33] Halliwell, B., Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **1995**, 35, 7-20.
- [34] Griffiths, H. R. Lunec, J., Ascorbic acid in the 21st century – more than a simple antioxidant, *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **2001**, 10, 173-182..
- [35] Reische D. W., Lillard, D. A., Eitenmiller, R. R., “Antioxidant “, In: Akoh CC, Min DB editors, *Food Lipids*, New York: Marcel Dekker, **2002**, 489-516.
- [36] Lee, H.O. & Montag, A., Antioxidant wirksamkeit von Tocochromanolen- Rangfolge bestimmung mit – Response Surface Methodology (RSM), *Fat Sci. Technol.*, **1992**, 94, 213-217.
- [37] Cillard, J., Cillard, P., Cormier, M., Effect of Experimental factors on the prooxidant behavior of α Tocopherol, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **1980**, 57, 255-261.
- [38] Marinova, E. M. & Yanishlieva, N. V., Effect of temperature on the antioxidative action of inhibitors in lipid autoxidation, *J. Sci. Food Agric.*, **1992**, 60, 313-318.
- [39] Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J. A.; Suarà-Calixto, F. A., Procedure do Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols, *J. Sci. Food Chem.*, **1998**, 76, 270-276.
- [40] Paiva-Martins, F., Gordon, H. M., Interactions of Ferric Ions with Olive Oil Phenolic Compounds, *Agric. Food Chem.*, **2005**, 53, 2704-2709.
- [41] Milovanovic, M., Picuric-Jovanovic, K., Vucelic-Radovic, B., Vrbaski Z., Antioxidant Effects of Flavonoids *Anthriscus sylvestris* in Lard, *J. Am Oil Chem. Soc.*, **1996**, 73, 773-776.
- [42] Wong J.W., Hashimoto K., Shibamoto T., Antioxidant Activities of Rosemary and Sage Extracts and Vitamin E in a Model Meat System. *J. Agric. Food Chem.*, **1995**, 43 (10), 2707-2712.

- [43] Madsen, H.L., Bertelsen G., Spices as antioxidants, *Trends Food Sci. Technol*, **1995**, 6, 271-277.
- [44] Madsen H.L., Bertelsen G., Skibsted L.H., Antioxidative Activity of Spices and Spice Extracts, in ACS Symposium Series 660: Spices: Flavor Chemistry and Antioxidant Properties, Edited by Sara J. Risch, Chi-Tang Ho, ACS, Washington, **1997**, 176-187.
- [45] Cuvelier M.-E., Richard H, Berset C., Antioxidative Activity and Phenolic Composition of Pilot-Plant and Commercial Extracts of Sage and Rosemary, *J. Am. Oil Chem. Soc*, **1996**, 73, 645-652.
- [46] Blekas G, Tsimidou M., Boskou D., Contribution of α -tocopherol to olive oil stability, *Food Chem.*, **1995**, 52, 289-294.
- [47] Alaiz, M., Zamora, R., Hidalgo, F.J., Natural Antioxidants Produced in Oxidized Lipid/Amino Acid Browning Reactions, *J. Am. Oil Chem. Soc*, **1995**, 72, 1571-1575.
- [48] Silva, F.A.M., "Sistemas Antioxidantes Endógenos. Métodos de Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica e da Capacidade Antioxidante". Trabalho de Seminário do Curso de Mestrado em Controlo de Qualidade, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, **1997**.
- [49] Chen, J.H., Ho. C. T., Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds, *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 2374-2378.
- [50] Choi, S.W., Sapers, G.M., Purpling Reaction of Sinapic Acid Model Systems Containing L-DOPA and Mushroom Tyrosinase, *J. Agric Food Chem.*, **1994**, 42 (5), 1183-1189.
- [51] Cilliers, J. J. L., Singleton V. L., Nonenzymatic Autoxidative Phenolic Browning Reactions in a Caffeic Acid Model System, *J. Agric. Food Chem.*, **1989**, 37, 890-896.
- [52] Rosazza, J.P.N., Huang Z., Dostal, L., Volm, T., Rousseau, B., Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product, *J. Ind. Microbiol*, **1995**, 15, 457-471.
- [53] Rice-Evans CA., Miller N.J., Paganga G., Structure-Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids, *Free Radic. Biol. Med*, **1996**, 20, 933-956.
- [54] Larson RA., The Antioxidants of Higher Plants, *Phytochemistry*, **1988**, 27, 969-978.
- [55] Diéz, M. J. G. F., Adamos, M. R., "Table Olives", Chapman & Hall, London (UK), **1997**, 67-109.

- [56] Servili, M., Montedoro, G., Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, **2002**, 104, 602-613.
- [57] Terpinc, P., Polak, T., Segatin, N., Hanzlowsky, A., Ulrih, N. P., Abramovic, H., Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids, *J. Food Chemistry*, **2011**, 128 62–69.
- [58] Menezes, J.C.M.D.S, Kamat, S.P., Cavaleiro, J.A.S, Gaspar, A. Garrido, J., Borges, F., Synthesis and antioxidant activity of long chain alkyl hydroxycinnamates, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2011**, 46, 773-777.
- [59] Koelsch, C. Synthesis of Cinnamic Acids from Methyl Acrylate or Acrylonitrile and Diazonium Salts. [contribution from the school of chemistry of the university of minnesota]. **1943**, 65, 57-58.
- [60] Kolb, K.; Field, K.; Schatz. , Lattice enthalpies of ionic halides, hydrides, oxides, and sulfides: Second-electron affinities of atomic oxygen and sulfur, *J. Chem. Ed.* **1990**, 67,304.
- [61] Kulp, S., Knoevenagel condensation to alpha-phenylcinnamionitriles: NaBH₄ reduction to propanenitriles, *J. Chem. Ed.* **1988**, 65, 742.
- [62] Burton, G. W., and Ingold, K. U., Autoxidation of biological molecules. 1. Antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro, *J. Am. Chem. Soc.*, **1981**, 103, 6472.
- [63] Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., Use of free radical method to evaluate antioxidant activity, *Lebensm.-Wiss. Technol.* **1995**, 28, 25-30.
- [64] Miller, N. J., Sampson, J., Candeias, L. P., Bramley, P. M., Rice-Evans, C., *FEBS Letters*, **1996**, 387, 240-242.
- [65] Foti, M.C., Daquino, C., Geraci, C., Electron- transfer reactionof cinnamic acids and their methyl esters with DPPH radical in alcoholic solutions, *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 2309-2314.
- [66] Jimenéz, A.,Selga, A., Torres, J. L., Juliá, L., Reducing activity of polyphenols with stable radicals of the TTM series. Electron transfer versus H-abstraction in flavan-3-ols, *Org. Lett.*, **2004**, 6, 4583-4586.
- [67] Williams, K. A., “Oils, Fats and Fatty Foods”, 4th edn, J and A Churchill, London, **1996**.

- [68] Hill, S. E., Comparison of modern instruments for the analysis of the oxidation stability of fats, oils and foods, *Inform.*, **1994**, 5, 104-109.
- [69] Gray, J. I., Measurement of lipid oxidation: a review, *Journal of the American Oil Chemist's Society*, **1978**, 55, 538-546.
- [70] Antoniasse, R., "Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras", *Boletim do centro de Pesquisa e processamento de alimentos*, Curitiba, **2001**, 19, (2) 353-380.
- [71] Gómez-Alonso, S., *et al.*, Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature, *Food Chemistry*, **2007**, 100 (1), 36-42.
- [72] Castera- Rossignol, A., Bosque, F., *OCL*, **1994**, 1, 131.
- [73] Paiva-Martins, F., Santos, V., Mangericão, H., Gordon, M. H., Effects of Copper on the Antioxidant of Olive Polyphenols in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsions, *J. Agric. Food Chem*, **2006**, 54, 3738-3743
- [74] Binks, B.P. *Royal Soc. Chem.*, **1998**, 430.
- [75] Gunnaseelan, K., Romsted, L. S., Pastoriza-Gallego, M. J., Losada-Barreiro, M. J., González-Romero, E., and Bravo-Díaz, C., , *Adv. Colloid Interface Sci.*, **2006**, 123-126, 303-311.
- [76] Sánchez-Paz, V., Pastoriza-Gallego, M.J., Losada-Barreiro, S., Bravo-Díaz, C., Romsted, L. S., and Krishnan, G., *J. Colloid Interface Sci.*, **2008**, 320, 1-8.
- [77] Romsted, L. S., and Zhang, J., 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.*, **2002**, 50, 3328-3336.
- [78] Gunnaseelan, K., Romsted, L. S., González-Romero, E., and Bravo-Díaz, C., Determining Partition Constants of Polar Organic Molecules between the Oil/Interfacial and Water/Interfacial Regions in Emulsions: A Combined Electrochemical and Spectrometric Method, *Langmuir*, **2004**, 20, 3047-3055.
- [79] Shwarz, K., Frankel, E., and German, J. B., *Fett / Lipid*, **1996**, 98, 115-121.

- [80] Stockmann, H., and Shwarz, K., Partitioning of Low Molecular Weight Compounds in Oil-in-Water Emulsions, *Langmuir*, **1999**, 15, 6142-6149.
- [81] Stockmann, H., and Shwarz, K., 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.* **2000**, 77, 535-542.
- [82] Frankel, E. N., *The Oily Press PJ Barness & Associates, Bridgwater, England*, **2005**.
- [83] Frankel, E. N., *J. Oleo Sci.*, **2000**, 50, 387.
- [84] Frankel, E. N., Huang, S. W. Kanner, J., German, J.B., Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsions, *J. Agric Food Chem.*, **1994**, 41, 1054-1059.
- [85] Huang, S. W. Frankel, E. N., Aeschbach, R., and German, J.B., Partition of Selected Antioxidants in Corn Oil–Water Model Systems, *J. Agric Food Chem.*, **1997**, 45, 1991-1994.
- [86] Shwarz, K., Activities of Antioxidants Are Affected by Colloidal Properties of Oil-in-Water and Water-in-Oil Emulsions and Bulk Oils, *J. Agric Food Chem.*, **2000**, 48, 4874-4882.
- [87] Jacobsen, S. J., Partitioning of Selected Antioxidants in Mayonnaise, *Agric Food Chem.*, **1999**, 47, 3601-3610.
- [88] Gordon, M.H., *Antioxidants in Food: Practical Applications*, CRC Press: Boca Raton, FL, N.Y., **2001**.
- [89] Sánchez-Paz, V., Pastoriza-Gallego, M. J., Losada-Barreiro, S., Bravo-Díaz, C. Romsted, L.S., Quantitative determination of α -tocopherol distribution in a tributyrin/Brij 30/water model food emulsion, *Colloid Interface Sci*, **2008**, 320, 1-8.
- [90] Frankel, E. N., Meyer, A. S., The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *J. Sci. Food Agric.*, **2000**, 80, 1925-1941.
- [91] Costas, U., Bravo-Díaz, C., González-Romero, E., Micellar Effects on the Reaction between an Arenediazonium Salt and 6-O-Octanoyl-L-ascorbic Acid. Kinetics and Mechanism of the Reaction, *Langmuir*, **2004**, 20, 1631-1638.
- [92] Losada, S., Sánchez, V., and Bravo, C., 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*, **2007**, 90, 1559-1573.

[93] Machackova, O., Sterba V., and Valter, K., *Part XXIII: Kinetics and mechanism of diazo coupling. XXIV. Coupling kinetics of benzenediazonium ions with resorcinol and its o-methyl derivatives*, **1972**, 37, 1327.

[94] Kropacova, H., Panchartek, J., Sterba, V., and Valter, K., *Collection Czechoslov. Chem. Commun.* **1970**, 35, 1970.

[95] Zollinger, H., and Wittwer, C., Die Kinetik der Kupplungsreaktion: Diskussion und Anwendungen der kinetischen Reaktionsgleichung, *Helv. Chim. Acta*, **1952**, 35, 1209-1223.

[96] Hertel, H., *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, VCH, Weinheim, **1987**.

[97] Sterva, V., *Scientific Papers of the University of Pardubice* **1995**, 17-64.

[98] Conant, J. B., and Peterson, W. D., The Rate of Coupling of Diazonium salts with Phenols in Buffer solutions, *J. Am. Chem. Soc.* **1930**, 52, 1220.

[99] Kaválek, J., Panchartek, J., and Sterva, V., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1970**, 35, 3470.

[100] Sterva, V., and Valter, K., *Collect, Czec., Chem. Commun.*, **1972**, 37, 270.

[101] Machackova, O., and Sterva, V., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1972**, 36, 3313.

[102] Plazo-Llorente, S., Rodríguez-Menacho, M. C., Gonzalez-Romero, E., Bravo-Díaz, C., Micellar Effects on Dediazonation and on Azo Coupling Reactions, *J. Colloid Interface Sci.*, **2002**, 248, 169-175.

[103] Losada, S., Sánchez, V., and Bravo, C., Micellar Effects on the Reaction between an Arenediazonium Ion and the Antioxidants Gallic Acid and Octyl Gallate, *Helv. Chim. Acta*, **2008**, 91, 21-33.

[104] Costas-Costas, U., Bravo-Diaz, C., and González Romero, E., Effects of Ascorbic Acid on Arenediazonium Salts Reactivity: Kinetics and Mechanism of the Reaction, *Helv. Chim. Acta*, **2001**, 84, 632-648.

[105] Zollinger, H., *Diazo I., Chemistry, Aromatic and Heteroaromatic Compounds*. VCH: Weinheim, Germany, **1994**.

- [106] Torres, P. Ph. D. Thesis, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, **2010**.
- [107] Saunders, K., Allen, H. R. L. M. Aromatic Diazo Compounds, **1978**.
- [108] Lousada-Barreiro, S., Sánchez-paz, V, Bravo-Díaz, C., Paiva-Martins. F., Temperature and emulsifier concentration effects on gallic acid distribution in a model food emulsion, *Journal of Colloid and Interface Science*, **2012**, 370, 73-79.
- [109] Pastoriza-Gallego, M. J., Sánchez-Paz, V., Romsted, L. S., Bravo-Díaz, C., Distribution of Tert-Butylhydroquinone in a Corn Oil/C₁₂E₆/Water Based Emulsion. Application of the Pseudophase Kinetic Model, **2011**, 138, 33-38.
- [110] Savelli, G., Germani, R., and Brinch, L., *Reactivity Control by Aqueous Amphiphilic Self-Assembling Systems*, Marcell-Dekker, New York, **2001**.
- [111] Romsted, L. S., *Surfactants in Solution*., New York, **1984**.
- [112] Fendler, J. H., *Membrane Mimetic Chemistry*, New York, **1982**.
- [113] Fendler, J. H., and Fendler, E. F., *Catalysis in Micellar and Macromolecular Systems*, Academic Press, **1975**.
- [114] Zana, R., *Surfactant Solutions: New Methods for Investigation*, Marcell Dekker, New York, **1985**.
- [115] Becher, P., Emulsions: Theory and Practice, 3rd Edition, **2001**.
- [116] Binks, B. P., *Royal Soc. Chem.* **1998**, 430
- [117] McClements, D. J., Food Emulsions: Principles, Practice and Techniques, **1998**.
- [118] Sjöblom, J., Emulsions and Emulsion Stability, 2nd Edition, **2006**.
- [119] Friberg, S., Microemulsions: Structure and Dynamics, **1987**.
- [120] Zana, R., Dynamics of Surfactant Self- Assemblies: Micelles, Microemulsions, Vesicles and Lyotropic Phases, **2005**.

- [121] Silva, F.A.M., Borges, F., Guimarães, C., Lima, J.L.F.C., Matos, C., Reis, S., Phenolic Acids and Derivatives: Studies on the Relationship among Structure, Radical Scavenging Activity, and Physicochemical Parameters, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2000**, 48, 2122-2126.
- [122] Velasco, J., Dobarganes, C., Oxidative stability of virgin olive oil, *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, **2002**, 104, 661-676.
- [123] Yoshida, H., Influence of fatty acids of different unsaturation in the oxidation of purified vegetable oils during microwave irradiation, *J. Sci. Food Agric.* **1993**, 62, 41-47.
- [124] Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, M., Macchioni, A., Montedoro, G. F., 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*, **1999**, 47, 12-18.
- [125] Doyle, M. P., Bryker, W. J., Alkyl nitrite-metal halide deamination reactions. 6. Direct synthesis of arenediazonium tetrafluoroborate salts from aromatic amines, tert-butyl nitrite, and boron trifluoride etherate in anhydrous media, *J. Org. Chem.*, **1979**, 44, 1572-1574.
- [126] Jovanovic, S. V., Hara, Y., Steenken S., and Simic, M. G., Antioxidant Potential of Gallocatechins, A Pulse Radiolysis and Laser Photolysis Study, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 9881-9888.
- [127] Medina, I., Lois, S., Alcántara, D., Lucas R., and Morales, J. C., Effect of Lipophilization of Hydroxytyrosol on Its Antioxidant Activity in Fish Oils and Fish Oil-in-Water Emulsions, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **2009**, 57, 9773-9779.