



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**STEFANNY FEBRAIO**

**ESTUDO DA EFICIÊNCIA ANTIOXIDANTE DE ADITIVOS DE RÓTULO  
LIMPO EM SISTEMA MICROENCAPSULADO DE ALTO TEOR DE ÁCIDOS  
GRAXOS POLI-INSATURADOS**

**CAMPINAS  
2019**

**STEFANNY FEBRAIO**

**ESTUDO DA EFICIÊNCIA ANTIOXIDANTE DE ADITIVOS DE RÓTULO  
LIMPO EM SISTEMA MICROENCAPSULADO DE ALTO TEOR DE ÁCIDOS  
GRAXOS POLI-INSATURADOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Química na área de Físico-Química.

**Orientadora: Profa. Dra. Márcia Miguel Castro Ferreira**

**O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Stefanny Febraio e orientada pela Profa. Dra. Marcia Miguel Castro Ferreira.**

CAMPINAS  
2019

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

F315e Febraio, Stefanny, 1988-  
Estudo da eficiência antioxidante de aditivos de rótulo limpo em sistema microencapsulado de alto teor de ácidos graxos poli-insaturados / Stefanny Febraio. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Marcia Miguel Castro Ferreira.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Oxidação. 2. Antioxidantes. 3. Peróxidos. 4. Alimentos - Análise. 5. Quimiometria. I. Ferreira, Marcia Miguel Castro, 1951-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Study on antioxidant efficiency of clean label additives in a microencapsulated system with high polyunsaturated content

**Palavras-chave em inglês:**

Oxidation  
Antioxidants  
Peroxides  
Analysis of food  
Chemometrics

**Área de concentração:** Físico-Química

**Titulação:** Mestra em Química na área de Físico-Química

**Banca examinadora:**

Marcia Miguel Castro Ferreira [Orientador]  
Francisco Benedito Teixeira Pessine  
Roseli Aparecida Ferrari

**Data de defesa:** 11-12-2019

**Programa de Pós-Graduação:** Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-2267-8720>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/1203925547294700>

## **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Dra. Marcia Miguel Castro Ferreira (Orientadora)

Prof. Dr. Francisco Benedito Teixeira Pessine (IQ / UNICAMP)

Dra. Roseli Aparecida Ferrari (Instituto de Tecnologia de Alimentos)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **STEFANNY FEBRAIO**, aprovada pela Comissão Julgadora em 11 de dezembro de 2019.

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Márcia, que me recebeu com entusiasmo após uma mudança de rumo inesperada na minha trajetória na pós-graduação e que me conduziu e me orientou entre dificuldades e conquistas.

A Kerry, minha grande escola pessoal e profissional há mais de oito anos, que sempre acreditou em mim e permitiu que eu realizasse meu projeto conciliando-o ao trabalho.

Ao meu gestor e mentor Francisco Ormenese, que me incentivou nesta reta final para que eu pudesse concluir o trabalho.

Ao meu colega de trabalho Ronaldo Coelho que, entre tantas discussões a respeito de seus projetos, me inspirou para que eu pudesse definir o meu.

Ao meu amigo Leandro Montalvão, que abdicou de um sábado inteiro dentro da planta piloto para me apoiar com o preparo de todas as amostras necessárias para o projeto.

Aos meus pais Zilda e Luis Cláudio, pela base que me deram como ser humano, pelo esforço para garantir que eu realizasse meus sonhos e pelo apoio incondicional.

À minha irmã Jaqueline, que desde sempre acreditou em mim, mesmo quando eu não acreditava, e a quem devo meu gosto por estudar.

Ao meu amigo e marido Fellipe, que aguentou firmemente as oscilações de humor e os momentos de fraqueza, me incentivando e ajudando para seguir adiante e vencer mais esta batalha.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Novos estudos científicos na área de nutrição humana são frequentemente publicados e, não raramente, atingem a população, ditando novas diretrizes de consumo alimentar. Óleos e gorduras sempre foram vistos como vilões na dieta humana, sendo associados a palavras negativas como colesterol, obesidade, doenças coronárias e cardiovasculares, entre outros. Entretanto, alguns tipos de óleos desempenham papel importante na dieta humana devido às suas diversas funções vitais e capacidade de promover saúde, como no caso dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFA do inglês *Polyunsaturated Fatty Acids*). Neste sentido, a Administração de Alimentos e Remédios dos Estados Unidos (FDA do inglês *Food and Drug Administration*) permitiu recentemente que certos alimentos com estes nutrientes pudessem ser comercializados com a alegação de papel na redução dos riscos de doenças do coração. Todavia, a mesma propriedade que faz dos PUFA ingredientes interessantes do ponto de vista nutricional (presença de ligações duplas múltiplas) também os torna susceptíveis à oxidação. Como consequência, a proteção do ingrediente funcional e o controle de qualidade do produto processado resultam em grandes desafios para a indústria de alimentos.

Neste sentido, o objetivo do estudo foi avaliar a estabilidade à oxidação de uma blenda de óleos vegetais com alta teor de PUFA, utilizando a microencapsulação e o emprego de antioxidantes de “rótulo limpo” como recursos de proteção. Os antioxidantes foram combinados por meio de planejamento fatorial  $2^3$  e a avaliação do grau de oxidação foi realizada pela técnica clássica de determinação de índice de peróxidos (IP). Também foram empregadas técnicas alternativas, como a determinação da estabilidade oxidativa e a espectroscopia na região do infravermelho.

Entre os antioxidantes utilizados, observou-se desempenho superior para o extrato de alecrim, de acordo com resultados de IP. A análise para determinação da estabilidade oxidativa mostrou-se ainda mais sensível, pois revelou o efeito antagônico entre  $\alpha$ -tocoferol e palmitato de ascorbila. Já a determinação espectroscópica mostrou-se uma ferramenta adequada ao uso em controle de qualidade por sua rapidez. Entretanto, ela requer a construção de modelos específicos para cada antioxidante utilizado, já que estes diferem nos produtos intermediários gerados no mecanismo de atuação e que respondem em regiões específicas do infravermelho médio.

## ABSTRACT

New scientific studies in human nutrition are frequently published, and they reach the population from time to time, influencing new guidelines regarding food consumption. Oils and fats have always been considered villains for human diet, been related to negative concepts as cholesterol, obesity, coronary and cardiovascular diseases, among others. On the other hand, some types of oils play an important role in human diet due to their vital functions and capability to promote health, as for example, the Polyunsaturated Fatty Acids (PUFA). In this sense, the Food and Drug Administration (FDA) has recently allowed that some foods containing such type of nutrients could be commercialized with the claim that they can reduce the risk of heart disease. However, the same chemical properties that make PUFA interesting ingredients from a nutritional perspective (the presence of multiple double bonds) also turn them susceptible to oxidation. Consequently, the protection of functional ingredients and the quality control of the processed product turned into big challenges to the food industry.

For this reason, the objective of the present study was to evaluate the stability against oxidation of a vegetal oils blend, with high content of PUFA, using the microencapsulation technique and the application of clean label antioxidants as protecting agents. Antioxidants combinations were investigated through a  $2^3$  factorial design, and the degree of oxidation was monitored by the classical method for peroxide index determination (PI). Alternative techniques as the oxidative stability determination and mid-infrared spectroscopy were also applied.

Among the tested antioxidants, a superior performance was observed for rosemary extract, according to PI results. The technique for determining oxidative stability was even more sensitive, since it allowed the detection of an antagonistic effect between  $\alpha$ -tocopherol and ascorbyl palmitate. The spectroscopic determination seemed to be an adequate tool for quality control purposes because it is not laborious and time consuming compared to conventional methods. However, this technique requires specific models for each antioxidant to be built, as long as they will present different intermediate products in their mechanisms of action and will respond in specific regions in the mid-infrared region.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Composição de ácidos graxos de óleos vegetais determinada por cromatografia gás-líquido para amostras autênticas (expressa como porcentagem do total de ácidos graxos).....	25
<b>Tabela 2</b> – Equações básicas para reações de ordem zero, um e dois com respeito aos hidroperóxidos.....	52
<b>Tabela 3</b> – Valores de limites de detecção de odor de compostos voláteis gerados na oxidação de lipídeos.....	66
<b>Tabela 4</b> – Percepção aromática de compostos voláteis gerados na oxidação de lipídeos.....	66
<b>Tabela 5</b> – Perfil de ácidos graxos dos componentes do material microencapsulado que são lipídeos, segundo laudo de análise do fornecedor, e perfil de ácidos graxos do material encapsulado final.....	83
<b>Tabela 6</b> – Porcentagem de sólidos dos componentes do material microencapsulado que não são lipídeos e sua composição no material encapsulado final.....	83
<b>Tabela 7</b> – Matriz de planejamento fatorial completo $2^3$ para obtenção de fórmulas com diferentes tratamentos antioxidantes.....	84
<b>Tabela 8</b> – Perfil de ácidos graxos da blenda de óleos vegetais microencapsulada.....	89
<b>Tabela 9</b> – Teores dos isômeros de tocoferóis determinados na blenda de óleos por cromatografia líquida de alta eficiência (média $\pm$ estimativa do desvio padrão).....	90
<b>Tabela 10</b> – Resultados físico-químicos obtidos logo após o processo de secagem por atomização para os oito testes com diferentes tratamentos antioxidantes.....	91
<b>Tabela 11</b> – Valores de índice de peróxidos (mEq/Kg de lípidos) observados a cada períodos de avaliação para as amostras armazenadas na condição ambiente (AMB).....	97
<b>Tabela 12</b> – Valores de índice de peróxidos (mEq/Kg de lípidos) observados a cada períodos de avaliação para as amostras armazenadas na condição acelerada (ACL).....	97



<b>Tabela 13</b> – Tabela de análise de variância para o conjunto de dados de índice de peróxidos do período inicial.....	98
<b>Tabela 14</b> – Tabela de contrastes dos tratamentos com antioxidantes (testes 2 ao 8) em relação ao tratamento controle (teste 1) para o período inicial.....	98
<b>Tabela 15</b> – Correspondência entre os efeitos calculados para o planejamento 2 <sup>3</sup> e os valores de probabilidade cumulativa, com base nos resultados de índice de peróxidos da condição acelerada, com 100 dias de armazenamento.....	101
<b>Tabela 16</b> – Comparação dos resultados obtidos pelo tratamento com extrato de alecrim com base nos resultados de índice de peróxidos da condição acelerada, com 100 dias de armazenamento.....	103
<b>Tabela 17</b> – Valores de índice de estabilidade oxidativa (minuto) observados para as amostras em condição controle (período inicial).....	104
<b>Tabela 18</b> – Correspondência entre os efeitos calculados para o planejamento 2 <sup>3</sup> e os valores de probabilidade cumulativa, com base nos resultados de índice de estabilidade oxidativa.....	105
<b>Tabela 19</b> – Parâmetros de calibração e validação de métodos FTIR-PLS para determinação do índice de peróxidos para cada tratamento de amostra.....	114

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estrutura de ácidos graxos homólogos com cadeia saturada, mono-insaturada e poli-insaturadas.....	22
<b>Figura 2</b> – Dobra rígida na cadeia do ácido graxo saturado causada pela configuração cis, em comparação com a configuração trans estendida.....	23
<b>Figura 3</b> – Sistema pentadieno observado em ácidos graxos poli-insaturados.....	24
<b>Figura 4</b> – Estrutura básica de um acilglicerol e exemplo de um triacilglicerol.....	26
<b>Figura 5</b> – Estrutura básica de um fosfolípídeo e o grupo substituinte formador da lecitina.....	27
<b>Figura 6</b> – Estrutura química do colesterol.....	28
<b>Figura 7</b> – Estrutura básica dos esfingolípídeos.....	29
<b>Figura 8</b> – Estrutura da base conjugada do ácido araquidônico e alguns ecosanóides derivados do mesmo.....	30
<b>Figura 9</b> – Estrutura de dupla camada de lipídeos anfipáticos que compõem as membranas celulares.....	31
<b>Figura 10</b> – Metabolismo de ácidos graxos poli-insaturados no organismo.....	35
<b>Figura 11</b> – Esquema do processo de autooxidação lipídica.....	42
<b>Figura 12</b> – Etapa de iniciação da oxidação de lipídeos para um ácido mono-insaturado.....	43
<b>Figura 13</b> – Etapa de iniciação da oxidação de lipídeos para um ácido poli-insaturado.....	43
<b>Figura 14</b> – Etapa de propagação da oxidação de lipídeos para um ácido poli-insaturado, resultando na formação de um 9-hidroperóxido.....	44
<b>Figura 15</b> – Alguns dos possíveis produtos da decomposição da $\beta$ -clivagem de um 9-hidroperóxido.....	44
<b>Figura 16</b> – Representação da via de ciclo redox, onde $M^{n+}$ e $M^{n+1}$ são metais de transição nos estados reduzido e oxidado.....	46

<b>Figura 17</b> – Estruturas dos antioxidantes fenólicos sintéticos mais comumente utilizados.....	48
<b>Figura 18</b> – Estrutura do antioxidante palmitato de ascorbila.....	48
<b>Figura 19</b> – Estruturas genéricas para os grupos de tocoferóis e tocotrienóis.....	49
<b>Figura 20</b> – Estruturas dos principais agentes antioxidantes encontrados no extrato de alecrim: ácido carnósico (diterpênico) e ácido rosmarínico (fenólico).....	50
<b>Figura 21</b> – Curva da cinética de autooxidação de ácidos graxos poli-insaturados dividida nas etapas de indução, propagação e terminação.....	52
<b>Figura 22</b> – Representação simplificada de uma microcápsula: recheio e material de parede.....	55
<b>Figura 23</b> – Diferentes morfologias de microcápsulas.....	55
<b>Figura 24</b> – Representação gráfica das etapas de mistura e homogeneização que precedem a alimentação do secador por nebulização.....	57
<b>Figura 25</b> – Representação geométrica de dois grupos de amostras no sistema original, definido pelas variáveis var1 e var2, e as linhas que abrangem a maior quantidade de informação acerca dos objetos, chamadas de componentes principais.....	70
<b>Figura 26</b> – Representação gráfica da análise de componentes principais.....	71
<b>Figura 27</b> – Representação gráfica da regressão pelo método dos quadrados mínimos parciais.....	76
<b>Figura 28</b> – Regressão linear de u contra t para dados centrados na média.....	77
<b>Figura 29</b> – Comportamento da variância e da tendência no modelo PLS, indicando o ponto de intersecção onde o superajuste é o mínimo.....	77
<b>Figura 30</b> – Fluxograma do processo de secagem por atomização e etapas prévias.....	90
<b>Figura 31</b> – Mapa de reações de degradação de alimentos e suas taxas relativas de acordo com a atividade de água e a umidade.....	92
<b>Figura 32</b> – Relação entre a ordem de secagem dos testes e os valores de D <sub>90</sub> observados.....	93

<b>Figura 33</b> – Gráficos de distribuição de tamanho de partícula para os diferentes tratamentos antioxidantes, obtidos em duplicata.....	94
<b>Figura 34</b> – Valores de índice de peróxidos observados para cada tratamento feito; resultados em preto referem-se às condições ambiente de armazenamento e resultados em vermelho, às condições aceleradas.....	95
<b>Figura 35</b> – Gráfico normal dos valores dos efeitos principais, secundários e terciários para os tratamentos com antioxidantes com base nos resultados de índice de peróxidos da condição acelerada, com 100 dias de armazenamento.....	102
<b>Figura 36</b> – Valores de índice de estabilidade oxidativa (minuto) observados para as amostras em condição controle (período inicial).....	105
<b>Figura 37</b> – Gráfico normal dos valores dos efeitos principais, secundários e terciários para os tratamentos com antioxidantes com base nos resultados de índice de estabilidade oxidativa.....	106
<b>Figura 38</b> – Resultados de período de indução (min) em função da atividade de água, umidade e tamanho de partícula determinados para cada tratamento antioxidante..	108
<b>Figura 39</b> – Espectros na região do infravermelho médio originais, da região de 4000 a 400 cm <sup>-1</sup> .....	109
<b>Figura 40</b> – Espectros na região do infravermelho médio alisados e tratados por SNV, da região de 4000 a 400 cm <sup>-1</sup> .....	109
<b>Figura 41</b> – Gráficos de escores das componentes principais PC1 e PC2 (amostras no tempo inicial em azul, armazenamento ambiente em verde e armazenamento acelerado em laranja).....	110
<b>Figura 42</b> - Gráfico de escores das componentes principais PC1 e PC2, resultantes da PCA das amostras referentes ao Teste 1 do planejamento experimental proposto (amostra no tempo inicial em azul, armazenamento ambiente em verde e armazenamento acelerado em laranja).....	111
<b>Figura 43</b> - Gráfico de escores das componentes principais PC1 e PC2, resultantes da PCA das amostras referentes ao Teste 8 do planejamento experimental proposto (amostra no tempo inicial em azul, armazenamento ambiente em verde e armazenamento acelerado em laranja).....	111

<b>Figura 44</b> – Valores de escores das primeiras componentes principais das PCA dos Testes 1 e 8 em função do tempo de armazenamento.....	112
<b>Figura 45</b> - Valores previstos e valores medidos do logaritmo natural do índice de peróxidos no modelo de calibração obtido para o conjunto de dados da condição ambiente (amostras iniciais em rosa, 20 dias em verde claro, 40 dias em azul, 60 dias em amarelo, 80 dias em marrom e 100 dias em verde escuro).....	113
<b>Figura 46</b> – Espectro de correlação gerado no modelo PLS do Teste 6 com espectros totais; regiões selecionadas correspondem à correlação superior a 0,8.....	115
<b>Figura 47</b> – Espectro de correlação gerado no modelo PLS do Teste 7 com espectros totais; regiões selecionadas correspondem à correlação superior a 0,8.....	115
<b>Figura 48</b> – Vetor regressão e espectro de correlação gerado no modelo PLS do Teste 5 com espectros totais; regiões selecionadas correspondem a bandas resolvidas no vetor regressão e com correlação superior a 0,7.....	116
<b>Figura 49</b> – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 1, gerado sem seleção de variáveis.....	118
<b>Figura 50</b> – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 2, gerado sem seleção de variáveis.....	118
<b>Figura 51</b> – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 3, gerado sem seleção de variáveis.....	118
<b>Figura 52</b> – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 4, gerado sem seleção de variáveis.....	119
<b>Figura 53</b> – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 5, gerado sem seleção de variáveis.....	119
<b>Figura 54</b> – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 6, gerado sem seleção de variáveis.....	119
<b>Figura 55</b> – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 7, gerado sem seleção de variáveis.....	120
<b>Figura 56</b> – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 8, gerado sem seleção de variáveis.....	120

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACL: condição de armazenamento acelerado (37°C)

AOAC: *Association of Official Analytical Chemists* ou Associação dos Químicos Analíticos Oficiais

AOCS: *American Oil Chemist's Society* ou Sociedade Americana dos Químicos de Óleos

AOM: Método do Oxigênio Ativo

ALA: ácido  $\alpha$ -linolênico

AMB: condição de armazenamento ambiente (27°C)

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATR: reflectância total atenuada

BHA: hidroanisol butilado

BHT: hidroxitolueno butilado

CLA: ácido linolênico conjugado

DALY: indicador que mede simultaneamente o efeito da mortalidade e dos problemas de saúde que afetam a qualidade de vida dos indivíduos

D<sub>50</sub>: tamanho máximo observado para 50% das partículas avaliadas pela técnica de difração de laser

D<sub>90</sub>: tamanho máximo observado para 90% das partículas avaliadas pela técnica de difração de laser

DHA: ácido decosahexaenóico

DMS: diferença mínima significativa

EPA: ácido eicosapentaenoico

FDA: *Food and Drug Administration* ou Administração de Alimentos e Remédios

FTIR: espectrofotômetro de infravermelho com Transformada de Fourier

GLA: ácido  $\gamma$ -linolênico

HDL: lipoproteínas de alta densidade

IP: índice de peróxidos

LA: ácido linoleico

LDL: lipoproteínas de baixa densidade

MSC: correção multiplicativa de sinal

MUFA: ácidos graxos mono-insaturados

OSI: Índice de estabilidade oxidativa

PCA: Análise de Componentes Principais

PLS: Quadrados Mínimos Parciais

PRESS: soma quadrática dos resíduos

PUFA: ácidos graxos poli-insaturados

RMSEP: raiz da média quadrática dos resíduos

ROS: espécies reativas ao oxigênio

SFA: ácidos graxos saturados

SNV: padronização normal de sinal

SVD: decomposição por valores singulares

TBHQ: butil hidroquinona terciária

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
2.1. A química dos lipídeos.....	21
2.1.1. Ácidos graxos.....	21
2.1.2. Acilgliceróis.....	26
2.1.3. Fosfolipídeos.....	27
2.1.4. Esteróis e seus ésteres.....	27
2.1.5. Ceras.....	28
2.1.6. Esfingolipídeos.....	28
2.1.7. Outros.....	29
2.2. Lipídeos na dieta humana.....	29
2.2.1. Funções gerais no organismo humano.....	29
2.2.2. Colesterol, ácidos graxos e as doenças cardiovasculares.....	32
2.2.3. Ácidos graxos poli-insaturados e funções fisiológicas específicas.....	33
2.2.3.1. Ácido oleico (18:1 $\omega$ 9).....	36
2.2.3.2. Ácido linoleico (18:2 $\omega$ 6).....	36
2.2.3.3. Ácido $\gamma$ -linolênico (18:3 $\omega$ 6).....	36
2.2.3.4. Ácido araquidônico (20:4 $\omega$ 6).....	37
2.2.3.5. Ácido $\alpha$ -linolênico (18:3 $\omega$ 3).....	37
2.2.3.6. Ácido eicosapentaenoico (20:5 $\omega$ 3).....	37
2.2.3.7. Ácido docosahexaenóico (22:6 $\omega$ 3).....	38
2.2.4. Lipídeos e câncer.....	38
2.2.5. Ácido linolênico conjugado (CLA).....	39
2.2.6. Estresse oxidativo e patologias.....	40
2.3. Oxidação lipídica.....	40
2.3.1. A auto-oxidação e suas etapas.....	41
2.3.2. Fase exponencial e os pró-oxidantes.....	45
2.3.3. Antioxidantes.....	46
2.3.3.1. Mecanismo de sequestro de radicais livres.....	47
2.3.3.2. Controle de pró-oxidantes.....	51
2.3.4. Cinética de oxidação.....	51
2.4. Microencapsulação.....	53



2.5.	Alimentos especiais.....	58
2.6.	Métodos de análise para medição da oxidação de lipídeos.....	59
2.6.1.	Substratos e produtos primários.....	60
2.6.1.1.	Mudança na composição graxa de lipídeos.....	60
2.6.1.2.	Ganho de massa.....	60
2.6.1.3.	Determinação do índice de peróxidos (IP).....	60
2.6.1.4.	Dienos e trienos conjugados.....	62
2.6.1.5.	Método do Oxigênio Ativo ( <i>Active Oxygen Method – AOM</i> ).....	63
2.6.2.	Produtos secundários.....	63
2.6.2.1.	Compostos voláteis.....	63
2.6.2.2.	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.....	64
2.6.2.3.	Valor de p-anisidina.....	64
2.6.2.4.	Carbonilas.....	65
2.6.2.5.	Análise sensorial.....	65
2.6.3.	Espectroscopia na região do infravermelho.....	66
2.7.	Análise Multivariada.....	68
2.7.1.	Análise de Componentes Principais – PCA.....	69
2.7.2.	Pré-tratamento de dados.....	71
2.7.3.	Métodos de regressão multivariados.....	74
2.7.4.	Regressão pelo Método dos Quadrados Mínimos Parciais – PLS.....	76
3.	OBJETIVOS.....	80
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	81
4.1.	Equipamentos.....	81
4.2.	Materiais e reagentes.....	81
4.3.	Definição da matriz de amostra para estudo.....	82
4.4.	Delineamento de planejamento fatorial completo para estudo da atividade dos diferentes antioxidantes.....	84
4.5.	Obtenção das amostras pelo processo de secagem por atomização.....	85
4.6.	Avaliação dos pós obtidos pelo processo de secagem por atomização....	85
4.7.	Armazenamento das amostras.....	86
4.8.	Avaliação da estabilidade oxidativa.....	87
4.8.1.	Determinação do índice de peróxidos.....	87
4.8.2.	Índice de estabilidade oxidativa.....	87

4.8.3. Análise espectral: determinação dos espectros na região do infravermelho médio.....	88
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	89
5.1. Obtenção das blendas de óleos microencapsuladas.....	89
5.2. Determinação do índice de peróxidos.....	94
5.3. Determinação do índice de estabilidade oxidativa.....	104
5.4. Análise espectral e quimiométrica.....	108
6. CONCLUSÕES.....	121
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123

## 1. INTRODUÇÃO

Diversos estudos da área de nutrição são frequentemente publicados, ganhando grande destaque na comunidade científica, mas alcançando também toda a população. Esse alcance acaba por causar algumas discussões, polêmicas e, eventualmente, uma mudança momentânea de hábitos de consumo e de alimentação. No caso de óleos e gorduras, estes foram associados negativamente à saúde humana por muito tempo, devido principalmente à caracterização do consumo de gorduras (principalmente as saturadas) e da obesidade como um fator de risco para diversas enfermidades, como doenças cardíacas e diabetes. De fato, as doenças cardiovasculares consistem na principal causa de morte no Brasil, sendo responsáveis por 30% das mortes no país; apenas no primeiro trimestre de 2018, a Sociedade Brasileira de Cardiologia contabilizou mais de 170 mil óbitos em decorrência de alguma doença cardiovascular<sup>1</sup>. Entre 2006 e 2016, o número de brasileiros diabéticos aumentou 61,8%, passando a atingir 8,9% da população<sup>2</sup>. Estudos têm apontado uma forte associação das principais doenças crônicas não transmissíveis, como doenças cardiovasculares, cânceres, diabetes e doenças neuropsiquiátricas, entre outras, a certos fatores de risco como tabagismo, consumo excessivo de álcool, excesso de peso, níveis elevados de colesterol, baixo consumo de frutas e verduras e sedentarismo. Estas enfermidades já são responsáveis por grande parte das mortes antes dos 70 anos de idade e perda da qualidade de vida<sup>3,4</sup>. No Brasil, em 2015, a dieta foi considerada o fator de risco número um com impacto no DALY (sigla para *Disability-Adjusted Life Year*), que consiste em um indicador que mede simultaneamente o efeito da mortalidade e dos problemas de saúde que afetam a qualidade de vida dos indivíduos; um DALY significa um ano de vida sadia perdida<sup>5</sup>.

Entretanto, da mesma forma como surgem estudos que recomendam a baixa ingestão de gorduras (ou certos tipos desta) e que relacionam esse consumo com diversas doenças, estudos publicados recentemente também questionam estas recomendações e correlações. Por exemplo, um estudo publicado em 2014 no *Annals of Internal Medicine* foi responsável pela revisão de diversos trabalhos publicados anteriormente, culminando na falta de correlação observada entre a ingestão de ácidos graxos monoinsaturados e a ocorrência de doenças do coração, assim como na fraca associação entre ácidos graxos saturados provenientes da dieta com o risco

de doenças coronárias. Em contrapartida, fortes evidências da correlação dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 ao baixo risco de doenças cardiovasculares, além da associação de ácidos graxos trans ao risco de doenças coronárias, foram de fato observadas nesta grande revisão<sup>6</sup>.

Os lipídeos apresentam, de fato, grande importância em diversas funções vitais e de regulação no organismo humano, sendo importante compreendê-los para estabelecer as quantias e composição de lipídeos que devem ser consumidas na dieta, permitindo também um desenho eficiente de produtos industriais voltados para a nutrição humana. Além das funções fisiológicas, os lipídeos também apresentam funções nos alimentos, afetando atributos como aparência e textura, favorecendo o processo de escurecimento e transferência de calor (como no caso das frituras) e absorvendo e transportando aromas<sup>7</sup>.

À parte dos estudos que colocam alguns alimentos como “vilões” ou “heróis” para a saúde humana, outro movimento dirigido por consumidores é o conceito de rótulo limpo (ou *clean label*, em inglês). Este conceito trata do uso de ingredientes conhecidos pelo consumidor, os quais podem ser facilmente reconhecidos ao se ler a lista de ingredientes, mas também abrange opções menos processadas ou provenientes da natureza<sup>8</sup>. Em diversas categorias de alimentos e canais de distribuição, produtores de alimentos estão buscando inovações que permitam reduzir o número de itens na lista de ingredientes, remover aditivos pouco familiares e criar uma relação de transparência e confiança com o consumidor<sup>9</sup>. Ademais, o conceito de rótulo limpo pode ir ainda mais além, estando relacionado também aos benefícios nutricionais aportados por um alimento a ser consumido a longo prazo e à sustentabilidade relacionada à produção do mesmo<sup>10</sup>.

Neste sentido, a indústria de alimentos é bastante desafiada a fornecer produtos que as pessoas gostem de consumir e se sintam bem ao fazê-lo. É necessário garantir que um produto com funcionalidade específica possa ser produzido, distribuído e consumido, obedecendo aos parâmetros de qualidade exigidos por normas e regulamentações. Entretanto, tal produto também deve atender às expectativas dos consumidores, os quais estão cada vez mais conscientes em relação aos produtos que consomem e que demandam cada vez mais por transparência por parte dos fabricantes.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. A química dos lipídeos**

A dieta humana é composta de micro e macronutrientes; os lipídeos enquadram-se na categoria de macronutrientes, ou seja, sua ingestão é necessária diariamente e em grandes quantidades. Os alimentos variam não apenas no conteúdo total de lipídeos como também na composição destes.

Do ponto de vista químico, a classe de lipídeos é bastante ampla e heterogênea, mas algumas características gerais podem ser encontradas entre essa diversidade de compostos<sup>11</sup>:

- São substâncias geralmente insolúveis em água e solúveis em solventes apolares;
- Contêm em suas estruturas grupos hidrocarbonetos de cadeia longa;
- Estão presentes em organismos vivos ou derivam destes.

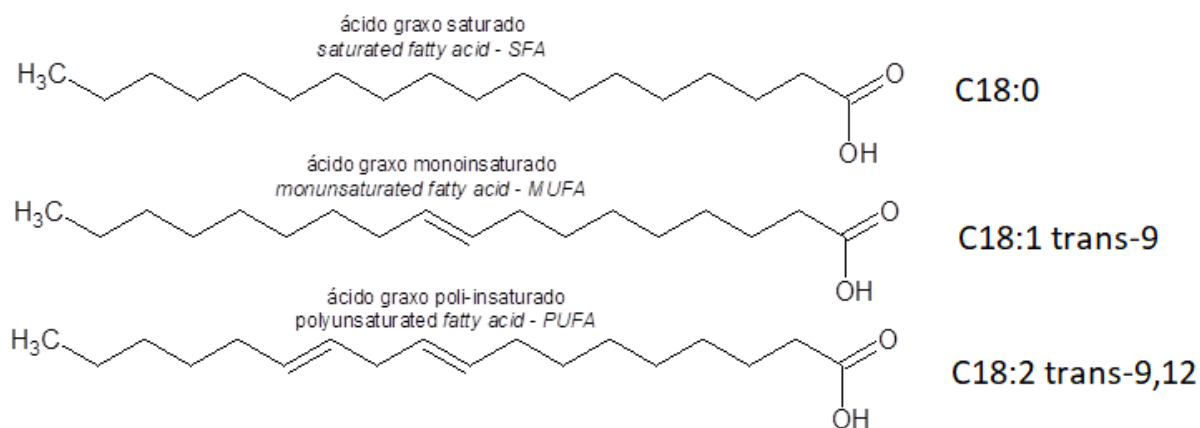
Os lipídeos podem ser classificados segundo diversos critérios, sendo o mais simples aquele quanto às propriedades físicas em temperatura ambiente: óleos são líquidos e gorduras são sólidas<sup>12</sup>. Uma segunda classificação refere-se às funções desempenhadas no metabolismo, sendo os lipídeos essenciais ou não-essenciais. Por fim, uma classificação mais detalhada pode ser aquela que considera a estrutura destas espécies, cujos grupos são detalhados a seguir<sup>11</sup>.

#### **2.1.1. Ácidos graxos**

Ácidos graxos são os componentes majoritários dos lipídeos. Consistem em ácidos carboxílicos de cadeia alifática longa, com número de carbonos geralmente par, dado o processo natural de alongamento dos ácidos graxos que ocorre de dois em dois carbonos. Essas cadeias geralmente variam de 14 a 24 carbonos em alimentos, mas estruturas com menor número podem ser encontradas em produtos

láceos e óleos tropicais<sup>13</sup>. Os ácidos graxos podem ser saturados (SFA da sigla em inglês para *Saturated Fatty Acids*) ou insaturados. O grau de insaturação varia bastante entre os ácidos graxos, sendo possível classificá-los em monoinsaturados (MUFA da sigla em inglês para *Monounsaturated Fatty Acids*) e poli-insaturados (PUFA da sigla *Polyunsaturated Fatty Acids*).

A nomenclatura de ácidos graxos segue o padrão IUPAC, sendo o nome do ácido carboxílico derivado do seu hidrocarboneto correspondente, com substituição do sufixo *-ano* por *-óico*. A posição das ligações duplas é indicada pelo símbolo  $\Delta$ , devendo indicar também a configuração destas. Entretanto, muitos ácidos graxos são mais comumente conhecidos por nomes comuns, geralmente atribuídos de acordo com sua fonte de obtenção. Por exemplo, o ácido octadecanóico (18:0) é mais conhecido por ácido esteárico, enquanto o ácido *cis*-9-octadecenóico (18:1  $\Delta$ 9 ou 18:1 *cis*-9) é conhecido como ácido oleico. Na Figura 1, pode-se observar as estruturas de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados para uma cadeia contendo 18 átomos de carbono<sup>14</sup>.



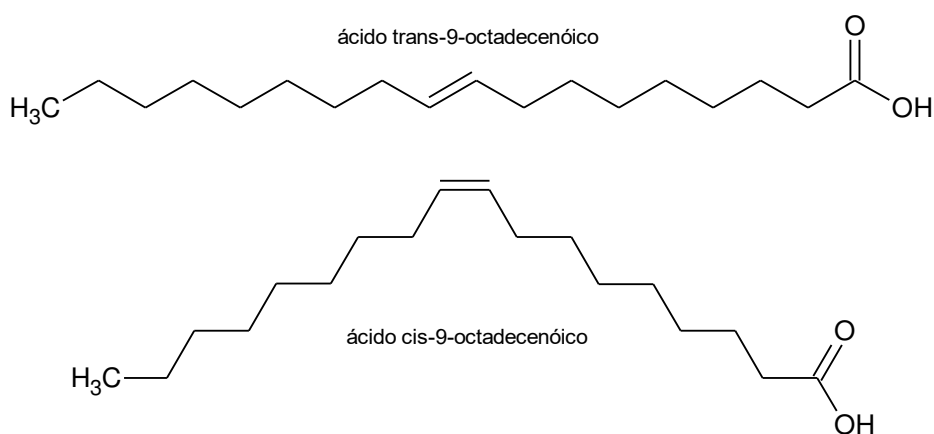
**Figura 1** - Estrutura de ácidos graxos homólogos com cadeia saturada, monoinsaturada e poli-insaturada.

Alguns ácidos graxos de especial importância para a nutrição humana são reconhecidos por enzimas pela primeira ligação dupla próxima à extremidade da cadeia com o grupo metila terminal ao invés do grupo ácido. Este padrão de reconhecimento é utilizado no sistema de nomenclatura ômega ( $\omega$ ), onde o carbono do grupo metila terminal recebe o número 1; se a ligação dupla ocorre entre os carbonos 3 e 4, o ácido graxo é denominado  $\omega$ 3; se a ligação dupla é observada entre

os carbonos 6 e 7, o ácido graxo é denominado  $\omega 6$ . Neste sistema de nomenclatura, assumem-se apenas ligações duplas na configuração cis, interrompidas por carbonos metilênicos. Estes ácidos graxos são denominados essenciais, o que significa que devem ser consumidos através da dieta, pois o corpo humano não é capaz de produzi-los.

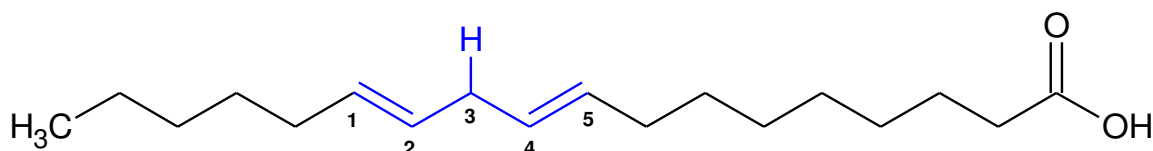
Os lipídeos ricos em ácidos graxos saturados são tipicamente sólidos à temperatura ambiente (também chamados de gorduras), menos susceptíveis à degradação e à oxidação. São naturalmente encontrados em produtos de origem animal como carnes, lácteos e ovos, em óleos tropicais como óleo de palma e coco, também em óleos hidrogenados<sup>7</sup>. Óleos ricos em ácidos graxos insaturados são mais líquidos à temperatura ambiente, como aqueles derivados de origem vegetal. Este grau de insaturação os torna interessantes no que se refere aos benefícios à saúde, mas os torna mais susceptíveis à degradação e à oxidação. Ligações triplas em ácidos graxos são raras, mas podem ser observadas; também podem ser observadas ramificações e estruturas cíclicas, grupos hidroxil, epoxil e furanos.

A configuração cis da dupla ligação, naturalmente observada, é não-linear, resultando em pouco empacotamento das moléculas, o que influencia diretamente em propriedades de fluidez. A configuração trans pode ser observada em decorrência do processo de deodorização, hidrogenação parcial e atividade de bactérias em condição anaeróbia, como resposta adaptativa para regular a fluidez nas membranas celulares. Na Figura 2 pode-se observar a dobra rígida causada pela configuração cis de uma dupla ligação, o que confere menor empacotamento entre as moléculas de ácidos graxos e maior fluidez resultante<sup>15</sup>.



**Figura 2** - Dobra rígida na cadeia do ácido graxo saturado causada pela configuração cis, em comparação com a configuração trans estendida.

Em ácidos graxos poli-insaturados de ocorrência natural, as múltiplas ligações químicas não aparecem conjugadas na grande maioria dos casos, mas sim separadas por um carbono metilênico, compondo assim um sistema pentadieno<sup>14</sup>. Este sistema é exemplificado na Figura 3, onde a posição 3 do sistema pentadieno é ocupada pelo carbono metilênico.



**Figura 3** - Sistema pentadieno observado em ácidos graxos poli-insaturados.

Os ácidos graxos podem apresentar-se livres ou como componentes de outros lipídeos; na sua forma livre, são citotóxicos, podendo romper membranas celulares. Nos alimentos, os lipídeos são geralmente encontrados em uma combinação padrão de ácidos graxos (mais comumente chamado de perfil de ácidos graxos); por exemplo, a Tabela 1 apresenta a composição média de ácidos graxos esperada para alguns óleos de origem vegetal<sup>12</sup>.



**Tabela 1** – Composição de ácidos graxos de óleos vegetais determinada por cromatografia gás-líquido para amostras autênticas (expressa como porcentagem do total de ácidos graxos).

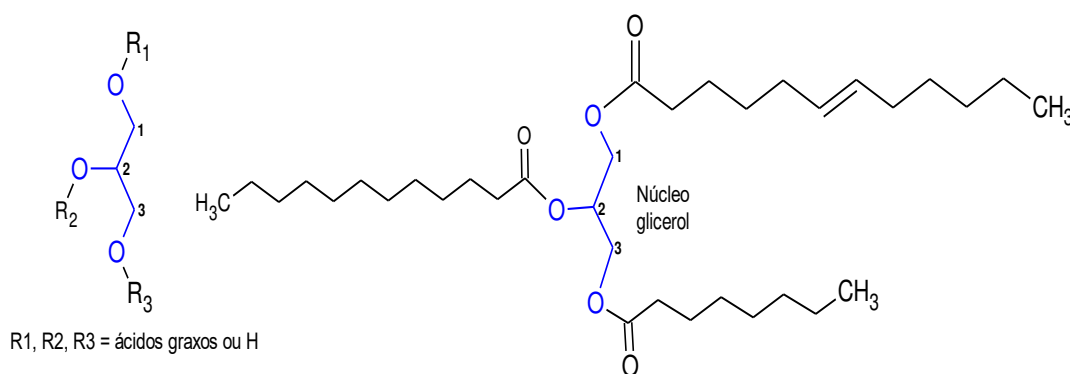
Ácido graxo	Óleo de babassú	Óleo de coco	Óleo de algodão	Óleo de milho	Óleo de palma	Óleo de palmiste	Óleo de soja	Óleo de girassol
<b>C6:0</b>	ND	ND-0.7	ND	ND	ND	ND-0.8	ND	ND
<b>C8:0</b>	2.6-7.3	4.6-10.0	ND	ND	ND	2.4-6.2	ND	ND
<b>C10:0</b>	1.2-7.6	5.0-8.0	ND	ND	ND	2.6-5.0	ND	ND
<b>C12:0</b>	40.0-55.0	45.1 53.2	ND-0.2	ND-0.3	ND-0.5	45.0-55.0	ND-0.1	ND-0.1
<b>C14:0</b>	11.0-27.0	16.8-21.0	0.6-1.0	ND-0.3	0.5-2.0	14.0-18.0	ND-0.2	ND-0.2
<b>C16:0</b>	5.2-11.0	7.5-10.2	21.4-26.4	8.6-16.5	39.3-47.5	6.5-10.0	8.0-13.5	5.0-7.6
<b>C16:1</b>	ND	ND	ND-1.2	ND-0.5	ND-0.6	ND-0.2	ND-0.2	ND-0.3
<b>C17:0</b>	ND	ND	ND-0.1	ND-0.1	ND-0.2	ND	ND-0.1	ND-0.2
<b>C17:1</b>	ND	ND	ND-0.1	ND-0.1	ND	ND	ND-0.1	ND-0.1
<b>C18:0</b>	1.8-7.4	2.0-4.0	2.1-3.3	ND-3.3	3.5-6.0	1.0-3.0	2.0-5.4	2.7-6.5
<b>C18:1</b>	9.0-20.0	5.0-10.0	14.7-21.7	20.0-42.2	36.0-44.0	12.0-19.0	17-30	14.0-39.4
<b>C18:2</b>	1.4-6.6	1.0-2.5	46.7-58.2	34.0-65.6	9.0-12.0	1.0-3.5	48.0-59.0	48.3-74.0
<b>C18:3</b>	ND	ND-0.2	ND-0.4	ND-2.0	ND-0.5	ND-0.2	4.5-11.0	ND-0.3
<b>C20:0</b>	ND	ND-0.2	0.2-0.5	0.3-1.0	ND-1.0	ND-0.2	0.1-0.6	0.1-0.5
<b>C20:1</b>	ND	ND-0.2	ND-0.1	0.2-0.6	ND-0.4	ND-0.2	ND-0.5	ND-0.3
<b>C20:2</b>	ND	ND	ND-0.1	ND-0.1	ND	ND	ND-0.1	ND
<b>C22:0</b>	ND	ND	ND-0.6	ND-0.5	ND-0.2	ND-0.2	ND-0.7	0.3-1.5
<b>C22:1</b>	ND	ND	ND-0.3	ND-0.3	ND	ND	ND-0.3	ND-0.3
<b>C22:2</b>	ND	ND	ND-0.1	ND	ND	ND	ND	ND-0.3
<b>C24:0</b>	ND	ND	ND-0.1	ND-0.5	ND	ND	ND-0.5	ND-0.5
<b>C24:1</b>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Adaptado de FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *Codex Standard for named vegetable oils Codex-Stan 210-1999*.

ND – não detectável, sendo o limite de detecção igual a 0,05%.

### 2.1.2. Acilgliceróis

Grande parte dos ácidos carboxílicos de origem biológica são encontrados na forma de acilgliceróis, que consistem na esterificação de uma molécula de glicerol com um, dois ou três ácidos graxos, formando mono, di ou triacilgliceróis, conforme indicado na Figura 4<sup>16</sup>. Os triacilgliceróis são mais comuns em alimentos, ocorrendo de forma natural. Mono e digliceróis são empregados geralmente como emulsificantes. Devido à menor atividade superficial, os acilgliceróis apresentam menor toxicidade.



**Figura 4** - Estrutura básica de um acilglicerol e exemplo de um triacilglicerol.

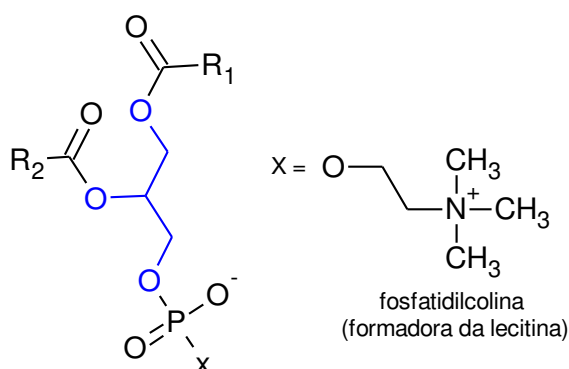
Os ácidos graxos esterificados podem possuir diferentes tamanhos de cadeia, grau de insaturação e/ou ramificação. Estes também podem ocupar diferentes posições na cadeia de glicerol, sendo que os ácidos graxos das posições 1 e 3 ficam geralmente voltados para a mesma direção, enquanto que aqueles na posição 2 devem ficar na direção oposta. Entre estas cadeias, predominam as forças de van der Waals.

Todos os carbonos da estrutura de um acilglicerol podem apresentar quiralidade a depender dos substituintes em cada uma das posições; neste caso, os átomos de carbono do núcleo glicerol são mais comumente identificados segundo a convenção de Hirshmann pelas designações sn-1 (carbono superior), sn-2 (central) e sn-3 (inferior).

### 2.1.3. Fosfolipídeos

Fosfolipídeos são acilgliceróis que apresentam um grupo fosfato geralmente localizado na posição 3, como indicado na Figura 5. Este grupo fosfato, de caráter polar, confere atividade superficial aos fosfolipídeos, o que está relacionado a duas principais funções: a formação de bicamadas, importante para a estrutura de membranas celulares e sua fluidez, e o papel de emulsificante regulador da cristalização de lipídeos<sup>14</sup>.

A lecitina é um exemplo de fosfolipídeo, amplamente utilizada como emulsificante na indústria de alimentos. Já a cardiolipina é um exemplo encontrado na mitocôndria de músculos cardíacos e membranas de bactérias.



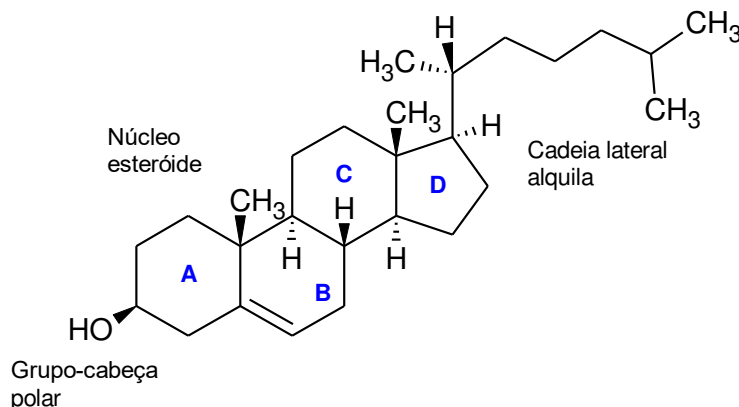
**Figura 5** - Estrutura básica de um fosfolipídeo e o grupo substituinte formador da lecitina.

### 2.1.4. Esteróis e seus ésteres

Do ponto de vista estrutural, esteróis são compostos que contêm três anéis de seis carbonos, um anel de cinco carbonos ligado a uma cadeia alifática e um grupo hidroxil no carbono 3 do primeiro anel. Este grupo hidroxil pode estar esterificado com um ácido graxo e é responsável por certa atividade superficial dos esteróis, fazendo com que estes atuem na estabilização da estrutura de membranas celulares.

Esteróis são encontrados em plantas (fitoesteróis) e em animais (zooesteróis). O exemplo mais comum de zooesterol é o colesterol (Figura 6), que também pode ser encontrado minoritariamente em plantas. O colesterol é susceptível

à oxidação *in vivo* e no processamento de alimentos, sendo seus óxidos relacionados ao desenvolvimento de arteroesclerose. Em contrapartida, os fitoesteróis apresentam propriedade de reduzir o colesterol no organismo humano<sup>13</sup>.



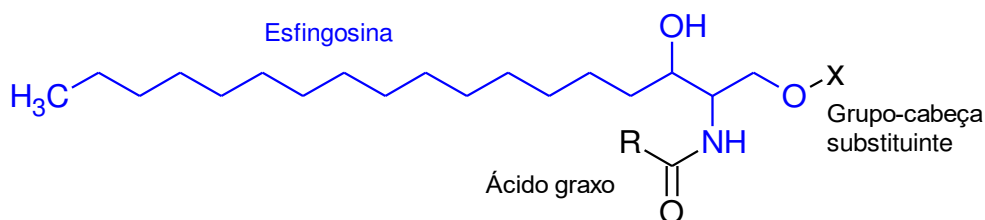
**Figura 6** - Estrutura química do colesterol.

#### 2.1.5. Ceras

Ceras são, de maneira geral, ésteres de ácidos graxos de cadeia longa (geralmente C16:0, C18:0 e C18:1 $\omega$ 9) e álcoois também de longa cadeia (geralmente C8 a C18). Estes lipídeos são encontrados na superfície e nas excreções de animais, insetos e plantas, com função de prevenir perda de água. Exemplos de ceras naturais são a ceras de abelha e de carnaúba<sup>14,p.138</sup>.

#### 2.1.6. Esfingolipídeos

Esfingolipídeos são lipídeos caracterizados por uma cadeia longa (esfingosina), que possui um ácido graxo e outros compostos, como fosfatos ou monossacarídeos. Na Figura 7, é apresentada a estrutura básica de um esfingolipídeo. Exemplos dessa classe são as ceramidas e os cerebrosídeos, sendo que estes últimos são importantes em membranas celulares, especialmente em tecidos nervosos e no cérebro<sup>14,p.137</sup>.



**Figura 7** - Estrutura básica dos esfingolípídeos.

### 2.1.7. Outros

Outros exemplos de lipídeos são as vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), carotenóides e os hidrocarbonetos. Em relação aos hidrocarbonetos, há interesse pela unidade isopreno (2-metil-1,3-butadieno), pois esta aparece repetida em outros lipídeos como carotenoides, esteróis e isoprenóides<sup>11</sup>.

## 2.2. Lipídeos na dieta humana

### 2.2.1. Funções gerais no organismo humano

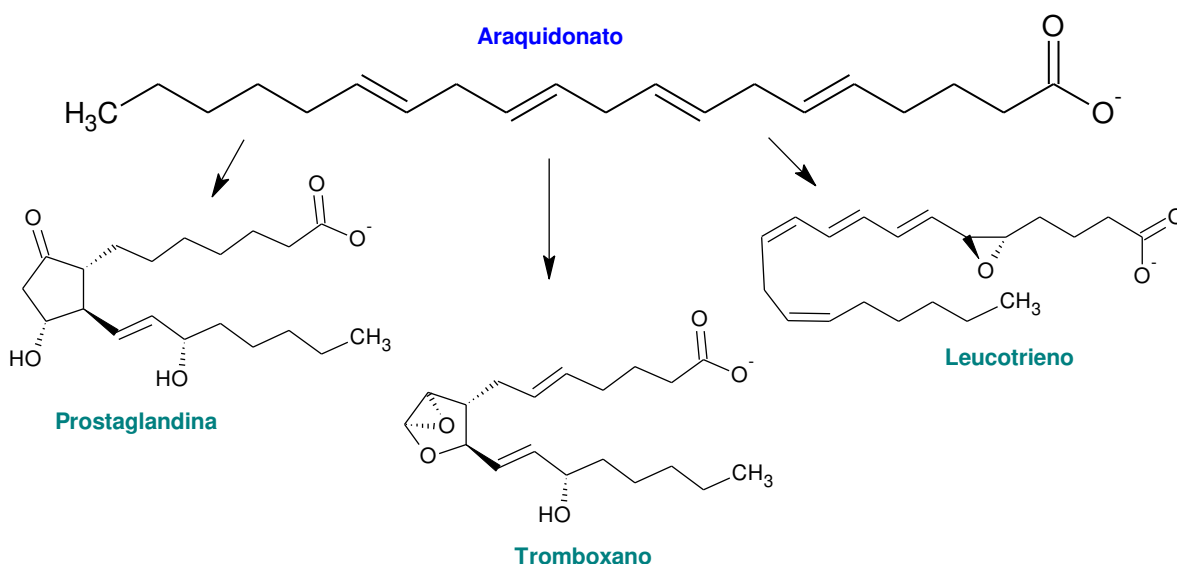
As funções básicas dos diversos lipídeos que constituem o organismo humano podem ser divididas em: formação do tecido adiposo, regulação de funções fisiológicas, função estrutural e transporte e composição de vitaminas lipossolúveis<sup>15</sup>.

Lipídeos consistem em reservas energéticas que se formam nos tecidos adiposos (a densidade calórica é de 9kcal g<sup>-1</sup> de lipídeo)<sup>14</sup>, os quais também atuam conservando calor e absorvendo impacto mecânico. Os lipídeos provenientes da dieta de cada indivíduo alteram a composição de ácidos graxos armazenados no tecido adiposo.

Os lipídeos também abrangem os ácidos graxos essenciais, os quais são metabolizados e geram eicosanóides, que são substâncias que possuem atividade

hormonal e podem, assim, regular diversas funções fisiológicas<sup>17</sup>. Os eicosanóides que se originam do ácido araquidônico estão envolvidos na função reprodutiva, na inflamação, na febre e na dor associadas aos ferimentos ou doenças, na formação de coágulos sanguíneos e na regulação da pressão sanguínea, na secreção de ácido gástrico e em outros processos importantes para o quadro de saúde dos humanos.

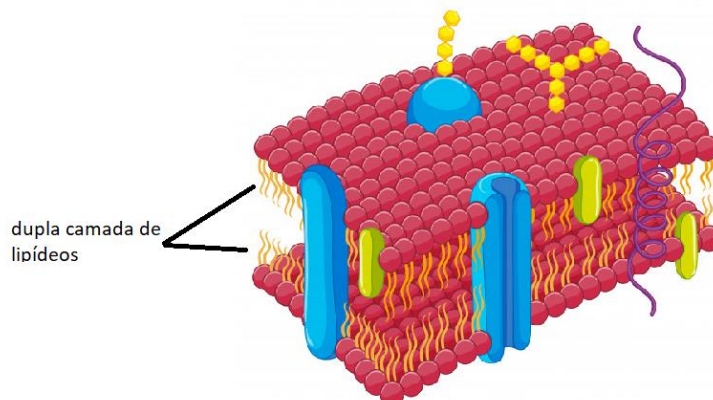
Há três classes de eicosanóides: *prostaglandinas* (possuem efeito sobre o fluxo de sangue a órgãos específicos, elevam a temperatura corporal e causam inflamação e dor), *tromboxanos* (atuam na formação dos coágulos e na redução do fluxo sanguíneo na região do coágulo) e *leucotrienos* (atuam como sinalizadores biológicos). Na Figura 8, por exemplo, são representados alguns eicosanóides cujo precursor é o araquidonato (base conjugada do ácido araquidônico)<sup>15</sup>.



**Figura 8** - Estrutura da base conjugada do ácido araquidônico e alguns eicosanóides derivados do mesmo.

No que se refere à função estrutural, as membranas biológicas são formadas por uma dupla camada de lipídeos anfipáticos, ou seja, que possuem uma extremidade hidrofóbica e outra hidrofílica. Os ácidos graxos poli-insaturados que constituem esses lipídeos se arranjam em estruturas químicas particulares de dupla camada com propriedades físico-químicas igualmente únicas<sup>15</sup>, como representado esquematicamente na Figura 9. As células utilizam-se destas propriedades para modulação das propriedades de suas membranas e formação de sítios de

reconhecimento na superfície celular. Ligeiras variações na composição das membranas podem, inclusive, apresentar efeitos significativos na fisiologia da célula<sup>17</sup>.



**Figura 9** - Estrutura de dupla camada de lipídeos anfipáticos que compõem as membranas celulares.

As membranas celulares são mantidas pelas forças de van der Waals entre as cadeias de ácidos graxos insaturados que compõem os fosfolipídeos. Essas interações são afetadas tanto pelo tamanho das cadeias dos ácidos graxos individuais como pelo grau de insaturação e pela posição da ligação dupla, uma vez que o volume de uma cadeia de ácido graxo individual e sua distância em relação ao ácido graxo vizinho afetam diretamente as forças de interação intermolecular. Por exemplo, o ácido esteárico, que é saturado, apresenta cadeia com diâmetro estimado de 0,25nm, enquanto seu homólogo insaturado na configuração cis (ácido cis-9-octadecenóico) apresenta cadeia com diâmetro igual a 0,72nm. O ácido trans-9-octadecenóico, em contrapartida, apresenta diâmetro igual a 0,31nm, evidenciando certa similaridade dos ácidos insaturados na configuração trans em relação aos seus homólogos saturados. Ligações duplas ocorrem tipicamente na posição  $\Delta 9$ , induzindo a separação dos ácidos graxos de um fosfolipídeo quando presente nesta estrutura; as ligações duplas que ocorrem ao final da cadeia possuem pouco efeito na separação entre ácidos graxos<sup>20</sup>. Por fim, os ácidos graxos insaturados de fosfolipídeos de membranas ocorrem majoritariamente na posição n2, com algumas exceções<sup>11</sup>.

Os lipídeos provenientes da dieta de cada indivíduo não parecem afetar a composição das membranas de outras células humanas, a não ser por aquelas do tecido adiposo anteriormente mencionado.

Por fim, lipídeos também atuam no transporte de vitaminas lipossolúveis (vitaminas D, A, E e K), as quais desempenham papéis essenciais no metabolismo de animais<sup>7</sup>. A vitamina D é precursora do hormônio que regula o metabolismo do cálcio; a vitamina A fornece o pigmento fotossensível do olho dos vertebrados e é reguladora da expressão gênica durante o crescimento das células epiteliais. A vitamina E atua como antioxidante *in vivo* e a vitamina K atua no processo de coagulação sanguínea.

### **2.2.2. Colesterol, ácidos graxos e doenças cardiovasculares**

Cerca de 0,2% da massa corpórea é constituída de colesterol, dos quais uma parte se encontra no cérebro e em tecidos do sistema nervoso e outra fração, como componente estrutural nos músculos. A vitamina D<sub>2</sub>, os ácidos biliares e alguns hormônios são derivados importantes do colesterol<sup>11</sup>. À parte de suas funções naturais, o colesterol é mais comumente referido como um fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardíacas quando presente em alta concentração no plasma sanguíneo<sup>7</sup>, onde é observado como um agregado molecular de lipídeo e proteína (lipoproteínas). Entretanto, há pouca correlação do colesterol no plasma sanguíneo com o colesterol proveniente da dieta<sup>18</sup>. Na realidade, os níveis de colesterol no sangue são modulados por outros lipídeos: no caso das lipoproteínas de baixa densidade (da sigla LDL para *Low Density Lipoprotein*) ou mau colesterol, os ácidos graxos saturados aumentam os níveis de LDL no sangue, enquanto os ácidos graxos insaturados diminuem estes níveis<sup>14</sup>. Quanto menor e mais denso estes aglomerados, maior é o risco de doenças coronárias, ou seja, maior o risco de obstrução das artérias coronárias por depósitos constituídos de colesterol, entre outras substâncias, ocasionando o fornecimento insuficiente de sangue ao coração. Alguns estudos em animais indicaram que lipoproteínas maiores, como o HDL (*High Density Lipoprotein*) não se difundem pela parede das artérias<sup>15</sup>.

Estudos epidemiológicos e estudos com intervenção sugerem que os níveis de colesterol no plasma sanguíneo aumentem com o aumento da ingestão de gorduras saturadas. O acúmulo de gorduras e colesterol nas paredes das artérias (aterosclerose) também parece ser afetado pela disposição dos ácidos graxos em uma cadeia de acilglicerol, sendo que acilgliceróis com ácidos graxos saturados



localizados na posição sn-2 devem possuir maior atividade aterogênica. Em 1997 e 2000, foram publicadas duas revisões bibliográficas acerca dos efeitos das gorduras trans; ambos os trabalhos apontaram para a possibilidade de as gorduras nesta configuração elevarem o nível de LDL no sangue, sinalizando prudência na ingestão deste tipo de lipídeo. Este efeito assemelha-se ao efeito causado pelos ácidos graxos saturados e deve-se em parte à configuração geométrica dos ácidos graxos trans, que são mais parecidos com os ácidos graxos saturados do que com aqueles cuja cadeia é insaturada<sup>11</sup>. Em 2015, outra revisão no mesmo contexto foi publicada e, embora a falta de consenso entre alguns estudos epidemiológicos e clínicos ainda seja reportada, muitas evidências do impacto negativo das gorduras saturadas e, principalmente trans, na saúde vem se acumulando ao longo do tempo<sup>19</sup>. De maneira consistente, a ingestão de altos níveis de gorduras trans proveniente de óleos parcialmente hidrogenados é associada ao risco de doenças coronárias e morte súbita, além de possuir outros efeitos adversos como inflamações, disfunções do endotélio, resistência à insulina e arritmias<sup>21</sup>.

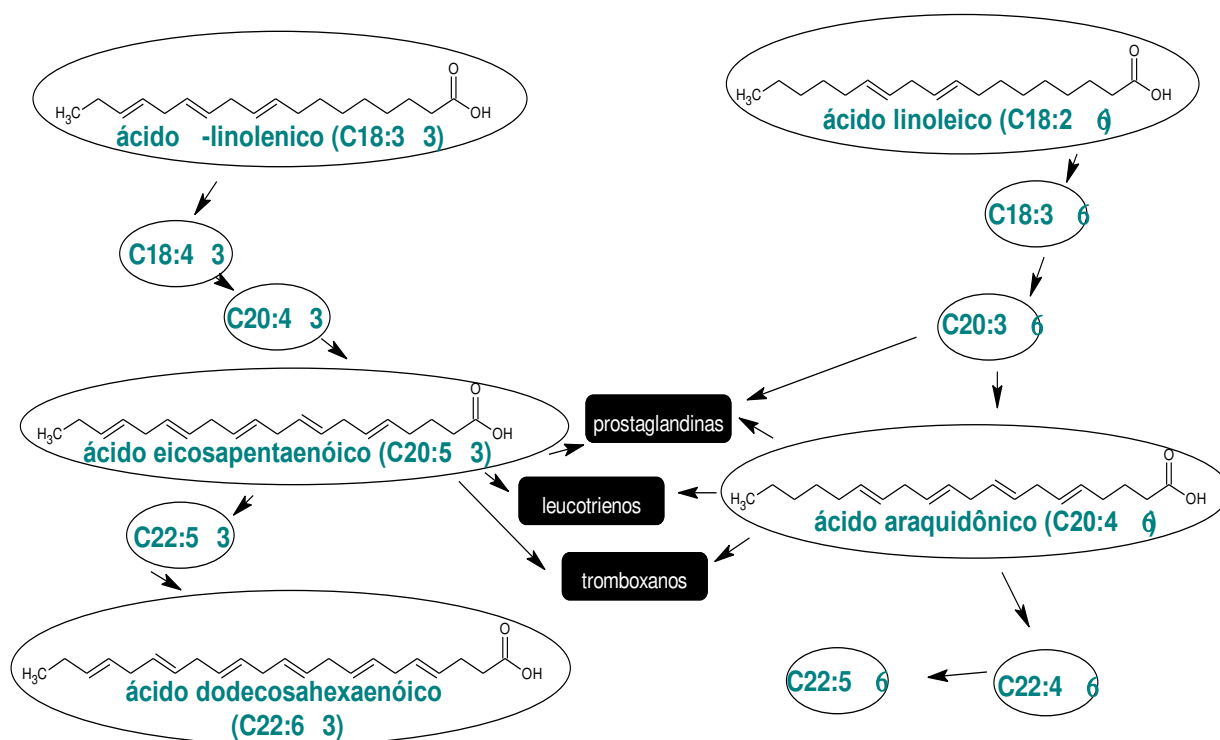
### **2.2.3. Ácidos graxos poli-insaturados e funções fisiológicas específicas**

Os ácidos graxos poli-insaturados apresentam ampla gama de funções no corpo humano. Também há evidências de que a quantidade e os tipos de ácidos graxos de uma dada dieta possam alterar respostas imunes, o que se torna de grande interesse em relação à prevenção contra o desenvolvimento de doenças como o câncer.

De todas as estruturas possíveis para ácidos graxos, há cerca de 20 que apresentam importância nutricional para os humanos; estes consistem em ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados, com ligações duplas interrompidas por carbonos metilênicos, os quais enquadram-se nas famílias  $\omega 3$ ,  $\omega 6$ ,  $\omega 7$  e  $\omega 9$ <sup>17</sup>. Os ácidos  $\omega 9$  são derivados exclusivamente do ácido oleico, os ácidos  $\omega 6$  são derivados exclusivamente do ácido linoleico (LA) e os ácidos  $\omega 3$  são derivados do ácido  $\alpha$ -linolênico (ALA)<sup>22</sup>; entretanto, todos podem ser modificados por alongamento, dessaturação e oxidação.

Dentre estes ácidos graxos insaturados, destacam-se as famílias dos ácidos graxos essenciais  $\omega 6$ , encontrados principalmente em plantas, e  $\omega 3$ , que podem ser encontrados em grande concentração em peixes e animais marinhos. Tais ácidos graxos não são sintetizados pelo corpo humano, mas precisam ser ingeridos por meio de uma dieta adequada. Outros ácidos graxos poli-insaturados são sintetizados a partir do ácido linoleico e do ácido  $\alpha$ -linolênico por uma série de etapas de dessaturação e alongamento dos ácidos graxos essenciais por meio de enzimas seletivas, como representado na Figura 10. No entanto, há uma competição pelo mesmo sistema de enzimas envolvido nesta síntese e, por isso, a ingestão de ácidos  $\omega 3$  e  $\omega 6$  deve ser balanceada. É possível que a dieta dos nossos ancestrais compreendesse quantidades iguais de ácidos  $\omega 3$  e  $\omega 6$ , mas que, por consequência do avanço da agricultura, com maior disponibilidade de gorduras refinadas de origem vegetal, e pelas mudanças de hábitos de consumo da humanidade, o consumo de  $\omega 6$  tenha ultrapassado significativamente o de  $\omega 3$ <sup>14</sup>. Um estudo que comparou a razão de ácidos  $\omega 6$ :  $\omega 3$  entre jovens de diferentes culturas apontou proporção equivalente a 2:1 no sangue de pessoas que consomem comida japonesa ou mediterrânea, enquanto esta razão foi igual a 25:1 em jovens que geralmente consomem *fast food*<sup>23</sup>. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura e a Organização Mundial de Saúde, uma dieta cuja razão destes ácidos seja igual a 5:1 ou menos é recomendada<sup>20</sup>. A Organização Mundial de Saúde também preconiza um consumo diário para adultos de 6 a 11% do conteúdo energético diário como ácidos graxos poli-insaturados, sendo 2,5 a 9% de  $\omega 6$  e 0,5 a 2% de  $\omega 3$ <sup>24</sup>.

A importância dos ácidos graxos  $\omega 6$  é conhecida há tempo, mas o interesse pelos ácidos graxos  $\omega 3$  ganhou força nas últimas décadas, após a publicação de estudos epidemiológicos relacionando o consumo de lipídeos de fontes marinhas à menor incidência de doenças cardiovasculares, inflamações crônicas e doenças autoimunes<sup>25,26</sup>. De fato, os ácidos graxos  $\omega 3$  estão aparentemente associados à diminuição de alguns fatores de risco de doenças cardiovasculares, como redução dos níveis de triglicerídeos no sangue e à hipertensão, já que controlam a constrição e a dilatação das artérias<sup>17</sup>. Alguns estudos sugerem um consumo de 2-3g/dia de ácidos  $\omega 3$  para efeitos de redução da pressão de indivíduos com hipertensão<sup>20</sup>.



**Figura 10** - Metabolismo de ácidos graxos poli-insaturados no organismo.

Muitos estudos epidemiológicos e clínicos foram publicados após os anos 80, os quais tratavam do efeito dos ácidos  $\omega$ 3, principalmente os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), na saúde humana e seus mecanismos de atuação. Fortes evidências de que os ácidos  $\omega$ 3 apresentam benefícios contra doenças cardiovasculares e artrite foram encontradas, além de que a utilização destes ácidos no tratamento e prevenção de doenças mentais e diversos tipos de câncer também foram revisadas em diversos destes trabalhos<sup>20,23</sup>.

Para fetos, descobriu-se a atuação dos ácidos graxos essenciais no desenvolvimento do cérebro e da retina, além de sua participação na síntese de membranas, na utilização como fonte de precursores e como estoque de energia após o nascimento. A transferência destes nutrientes se dá pela placenta, que contém uma membrana proteica ligante a ácidos graxos. Alguns PUFA são seletivamente absorvidos na seguinte ordem de preferência: docosahexaenóico,  $\alpha$ -linolênico, linoleico, oleico e araquidônico<sup>17</sup>. A adição de ácidos  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6 às fórmulas infantis nos primeiros seis meses de vida também resultou na promoção do desenvolvimento cognitivo e motor a longo prazo, sem efeitos adversos<sup>20</sup>.

Em estudos mais recentes, sugeriu-se correlação inversa entre o alto consumo de peixes e a ocorrência de deficiências cognitivas e o desenvolvimento de

Alzheimer e outras demências. De maneira geral, o consumo de altos níveis de gorduras insaturadas pareceu ter efeito protetivo contra a doença de Alzheimer, mas a intervenção com ácidos  $\omega 3$  em pacientes que já apresentavam a enfermidade de grau leve a moderado não pareceu surtir qualquer efeito<sup>18-19,22,27-30</sup>.

#### **2.2.3.1. Ácido oleico (18:1 $\omega$ 9)**

O ácido oleico é produzido a partir do ácido esteárico de plantas, animais e bactérias pela atividade da enzima  $\Delta 9$ -dessaturase. Muitos ácidos graxos poli-insaturados podem ser produzidos a partir do ácido oleico, sendo que as plantas o utilizam para produzir tanto ácidos  $\omega 3$  como  $\omega 6$ . Este é o ácido graxo poli-insaturado mais comum entre os ácidos graxos insaturados, sendo o óleo de oliva, as castanhas e a manteiga fontes ricas deste<sup>17,p.577</sup>.

#### **2.2.3.2. Ácido linoleico (18:2 $\omega$ 6)**

O ácido linoleico é um produto primário da síntese de ácidos graxos poli-insaturados em plantas. É encontrado em grandes concentrações em óleos de sementes, mas também em carnes. Consiste em um importante precursor do ácido araquidônico e outros ácidos  $\omega 6$  nos animais<sup>17,p.578</sup>.

#### **2.2.3.3. Ácido $\gamma$ -linolênico (18:3 $\omega$ 6)**

O ácido  $\gamma$ -linolênico (ou GLA da sigla em inglês para  *$\gamma$ -linolenic acid*) é produzido a partir do ácido linoleico em animais e plantas inferiores pela atividade da enzima  $\Delta 6$ -dessaturase. Nos animais, consiste em um precursor na rota de síntese do ácido araquidônico<sup>17,p.578</sup>.

#### **2.2.3.4. Ácido araquidônico (20:4 $\omega$ 6)**

O ácido araquidônico é biossintetizado em algas marinhas e em animais pela dessaturação e alongamento a partir do ácido linoleico. Este ácido graxo está presente em todos os tecidos e é o precursor dos eicosanóides<sup>17,p.578</sup>.

#### **2.2.3.5. Ácido $\alpha$ -linolênico (18:3 $\omega$ 3)**

O ácido  $\alpha$ -linolênico é um produto primário da síntese de ácidos graxos poli-insaturados em plantas, produzido a partir do ácido oleico pela atividade das enzimas  $\Delta$ 12 e  $\Delta$ 15-dessaturases. É encontrado em grandes concentrações nas folhas das plantas e em concentrações menores nos óleos de sementes. Consiste em um importante precursor dos ácidos  $\omega$ 3 nos animais<sup>17,p.579</sup>.

#### **2.2.3.6. Ácido eicosapentaenóico (20:5 $\omega$ 3)**

O ácido eicosapentaenóico (EPA) é produzido em algas marinhas; nos animais, é biossintetizado pela dessaturação e alongamento do ácido  $\alpha$ -linolênico. Os óleos de peixe contêm 20-25% de EPA, em massa<sup>17,p.579</sup>. Há evidências de que o EPA apresente papel importante em doenças cardiovasculares e no sistema imunológico. Estudos com administração de EPA por 6 meses para pacientes com Alzheimer e outras demências mostraram também melhora das funções cognitivas dos pacientes<sup>20</sup>.

#### **2.2.3.7. Ácido docosahexaenóico (22:6 $\omega$ 3)**

O ácido docosahexaenóico (DHA) também é produzido em algas marinhas e é um dos componentes majoritários do óleo de peixe (8-20% em massa)<sup>17</sup>. O DHA parece ter papel fundamental para o cérebro, retina e tecidos neurais; 50% dos ácidos graxos que compõem os fosfolípídeos destes tecidos são cadeias de DHA. Esse ácido graxo essencial também tem papel importante no desenvolvimento do sistema nervoso central de fetos, principalmente no último trimestre da gestação e na infância, sendo importante que a gestante ingira quantidades suficientes para disponibilizar esses nutrientes para o feto.

O DHA também está relacionado à redução ou inibição dos fatores de riscos relacionados a doenças cardiovasculares, além de apresentar efeitos na prevenção de inflamações e alguns tipos de câncer<sup>20</sup>. Adicionalmente, a ingestão de DHA é apontada como potencial tratamento para a doença de Alzheimer, uma vez que pôde modificar a expressão da patologia em modelos com ratos<sup>29</sup>.

#### **2.2.4. Lipídeos e câncer**

Alguns estudos realizados com ratos na década de 1930 indicaram forte correlação entre dietas ricas em conteúdo de gordura e a incidência de tumores em ratos. Estudos epidemiológicos posteriores encontraram correlação entre a ingestão de gordura e o risco de câncer de mama. Entretanto, a hipótese desta associação foi perdendo força ao longo do tempo uma vez que há pouca concordância entre diversos estudos realizados, principalmente aqueles com dados epidemiológicos. Ademais, estudos mais recentes apontam, na realidade, para uma maior importância do conteúdo calórico total como fator de risco no desenvolvimento de certos tipos de câncer que da própria ingestão de lipídeos. Por exemplo, em estudo com ratos, a incidência de tumores nos animais que receberam uma dieta de baixo conteúdo de lipídeos e alto conteúdo calórico foi 48% maior que em ratos cuja dieta era pouco calórica e alta em conteúdo lipídico<sup>17</sup>. Estudos em humanos também apontam uma

correlação positiva da ocorrência de câncer no cólon e no sistema gástrico com a ingestão de calorias provenientes da dieta, o que está em concordância com o sobrepeso como um fator de risco para o câncer<sup>31</sup>.

Devido à alta densidade calórica ocasionada pela ingestão de trigliceróis, alguns produtos lipídicos de baixa caloria vêm sendo estudados. Alguns destes baseiam-se na produção de alimentos com miméticos de gordura, que são compostos não-lipídicos como proteínas ou carboidratos que possam conferir as mesmas propriedades às das gorduras tradicionais, porém com baixo valor calórico. Outros baseiam-se no princípio de que apenas ácidos graxos nas posições sn-1 e sn-3 dos triacilgliceróis são liberados como ácidos graxos livres por hidrólise no pâncreas, de maneira que somente o ácido graxo na posição sn-2 será absorvido como caloria. Desta forma, ácidos graxos de cadeias maiores (maior ou igual a 16 átomos de carbono) são estruturados nas posições sn-1 e sn-3, enquanto os ácidos graxos da posição sn-2 são ácidos de cadeia curta (menor ou igual a 6 átomos de carbono). Tais lipídeos estruturados resultam em conteúdo energético de 5-7cal/g<sup>14</sup>.

#### **2.2.5. Ácido linolênico conjugado (CLA)**

A isomerização das ligações duplas do ácido linolênico em uma configuração conjugada, comumente decorrente da hidrogenação biológica promovida por bactérias em ruminantes, produz dois isômeros que têm despertado interesse por sua capacidade de inibir o câncer, diminuir o colesterol sanguíneo, inibir o aparecimento do diabetes e influenciar o ganho de peso. Ao ácido 9-cis,11-trans-linoleico é atribuída a atividade anticarcinogênica, enquanto o ácido 10-trans,12-cis-linoleico apresenta capacidade de influenciar o acúmulo de gordura corpórea. A bioatividade dos isômeros de CLA possivelmente deva-se à capacidade deles de modular a formação de eicosanóides e a expressão de genes<sup>14,17</sup>.

### 2.2.6. Estresse oxidativo e patologias

Assim como ocorre em sistemas *in vitro*, a oxidação lipídica também ocorre *in vivo*, levando a uma série de patologias. Sob condições aeróbias, são geradas espécies reativas ao oxigênio (da sigla ROS para *Reactive Oxygen Species*), as quais desencadeiam estresse oxidativo e poderão interagir com biomoléculas: ligam-se a proteínas, rompem a fita do DNA, reagem com componentes celulares vitais e atacam as ligações duplas de fosfolipídeos que compõem as membranas, alterando a estrutura das mesmas. Um grande número de publicações desde a década de 80 sugere a relação do estresse oxidativo a patologias como aterosclerose, diabetes, doenças pulmonares, câncer, Alzheimer, esclerose, catarata e doenças cardiovasculares<sup>31</sup>.

### 2.3. Oxidação lipídica

A oxidação de lipídeos é uma das reações mais importantes na cadeia produtiva de alimentos e em sistemas biológicos; ela ocorre na extração do material lipídico de seus materiais de origem (processamento de sementes, por exemplo), na produção e estocagem de alimentos processados e em sistemas *in vivo*. Nos alimentos, as consequências da oxidação lipídica vão desde mudanças na qualidade sensorial (odor, sabor, textura, consistência e aparência) até a queda de seu valor nutricional e riscos para a segurança alimentar<sup>32</sup>. Nos organismos vivos, implicam em disfunções fisiológicas que podem levar a diversas doenças<sup>33</sup>.

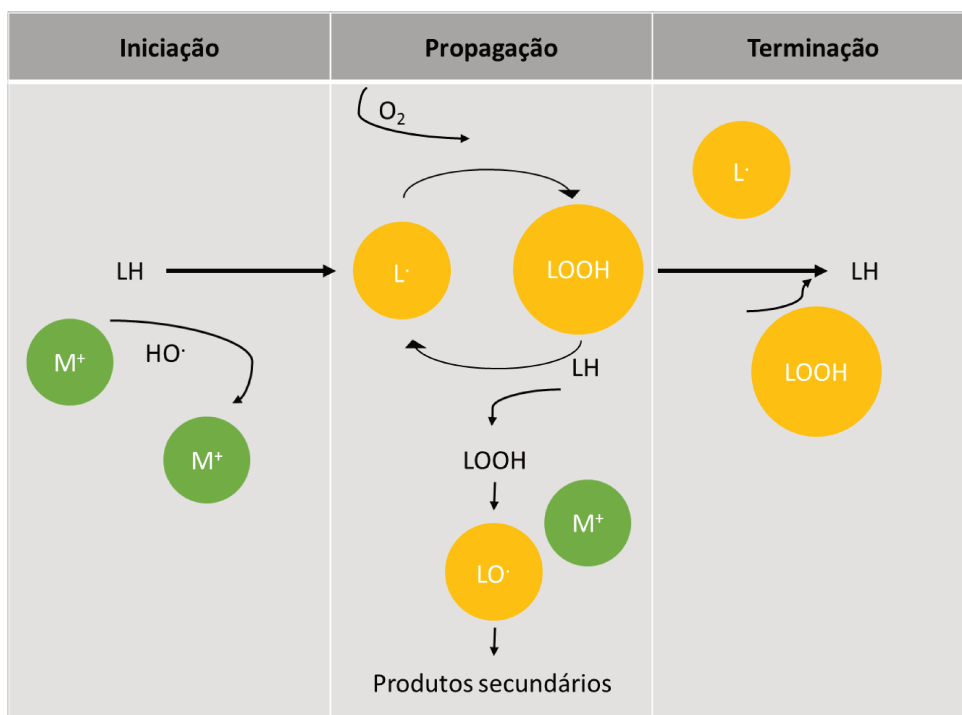
Embora ocorra em tantos sistemas, o entendimento completo da oxidação é um desafio tanto no que se refere à medição e ao monitoramento dos produtos formados neste processo como para o estabelecimento de modelos cinéticos adequados. Isso porque a oxidação lipídica consiste em uma sequência complexa de reações químicas, cujos produtos gerados dependem não só dos materiais de partida, mas também de outros fatores que podem acelerar ou inibir tais reações.



Em suma, qualquer reação entre o oxigênio atmosférico e compostos orgânicos em condição de temperatura ambiente caracteriza a oxidação<sup>33</sup>. No que se refere aos lipídeos, essa reação envolve os compostos insaturados, principalmente os ácidos graxos; os radicais livres são as principais espécies formadas, os quais consistem em átomos ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados. Diferentes radicais livres possuem diferentes níveis de energia e, desta forma, diferentes reatividades; por exemplo, os radicais hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ) possuem elevada energia e podem, portanto, oxidar outras espécies. Na oxidação lipídica, são formados radicais livres alquila ( $\text{L}^\cdot$ ) e peroxila ( $\text{LOO}^\cdot$ ) a partir dos ácidos graxos dos lipídeos, estejam estes livres ou associados a estruturas de acilglicerídeos ou fosfolipídeos. Embora menos reativos que o radical hidroxila, estes radicais apresentam energia suficiente para desencadear e manter a oxidação lipídica ativa dentro dos sistemas alimentícios.

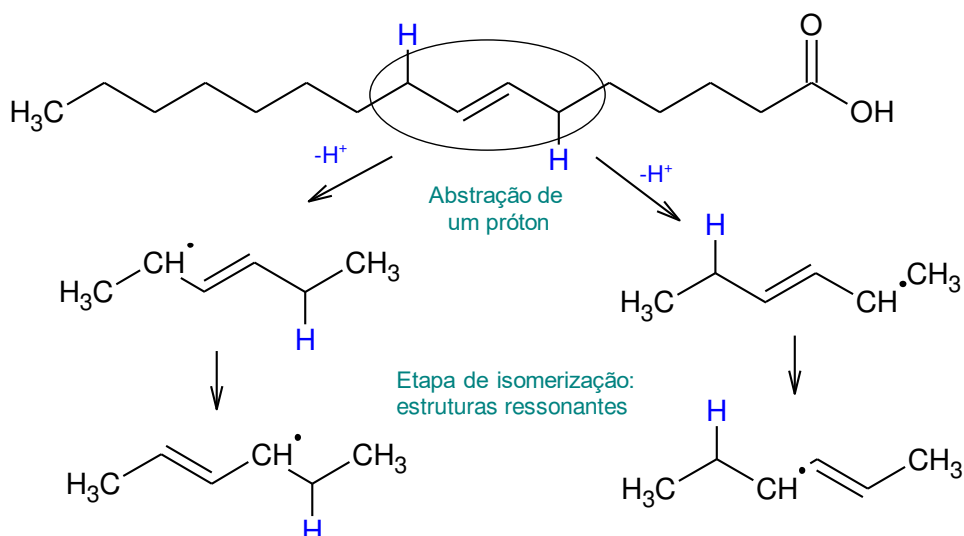
### **2.3.1. A auto-oxidação e suas etapas**

O processo central da oxidação lipídica, denominado auto-oxidação, pode ser dividido em três etapas distintas, como representado no fluxograma da Figura 11, chamadas de iniciação, propagação e terminação.

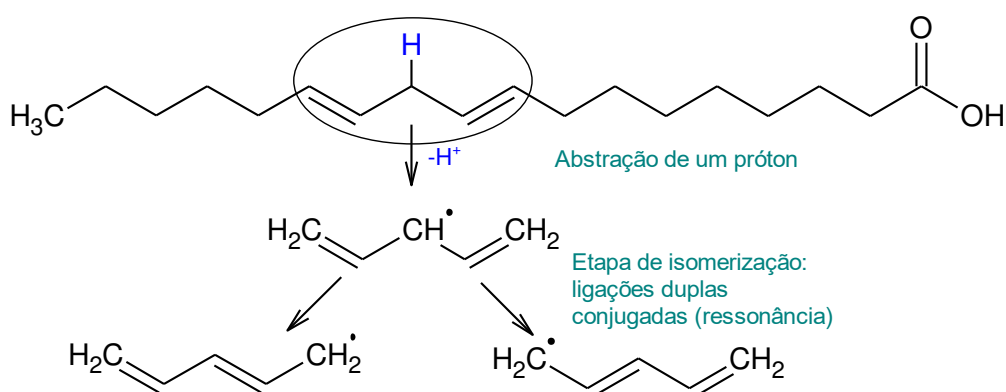


**Figura 11** – Esquema do processo de auto-oxidação lipídica.

Na etapa de iniciação ou indução, tem-se a abstração de um próton de um ácido graxo que se encontra adjacente a uma ligação dupla<sup>33</sup>, conforme representados nas Figuras 12 e 13. A proximidade com a ligação dupla diminui a energia de dissociação entre o próton e o carbono da cadeia lipídica, facilitando esta abstração e consequente formação do radical alquila ( $L^\cdot$ ). O aumento do número de ligações duplas deve enfraquecer ainda mais esta ligação, favorecendo a iniciação da oxidação; por exemplo, em uma cadeia alifática, a energia de dissociação da ligação de um carbono ao hidrogênio é de 98kcal/mol, mas a energia de dissociação da mesma ligação adjacente a uma ligação dupla cai para 89kcal/mol e, no carbono metilênico de sistemas pentadieno, para apenas 80kcal/mol<sup>34</sup>. Ainda que os menores valores de energia de dissociação da ligação carbono-hidrogênio favoreçam a formação do radical, uma elevada energia de ativação é necessária para a geração do primeiro radical alquila, o que pode ser obtido por aquecimento, radiação ou presença de oxigênio singleto, que é mais energético que o tripleto. Por fim, as ligações duplas presentes nas cadeias de ácidos graxos atuam também na estabilização do radical livre a ser formado por deslocalização eletrônica; no caso de ácidos graxos monoinsaturados, a ligação dupla forma uma estrutura ressonante e, no caso de ácidos graxos poli-insaturados, formam-se ligações duplas conjugadas, também ressonantes<sup>14</sup>.

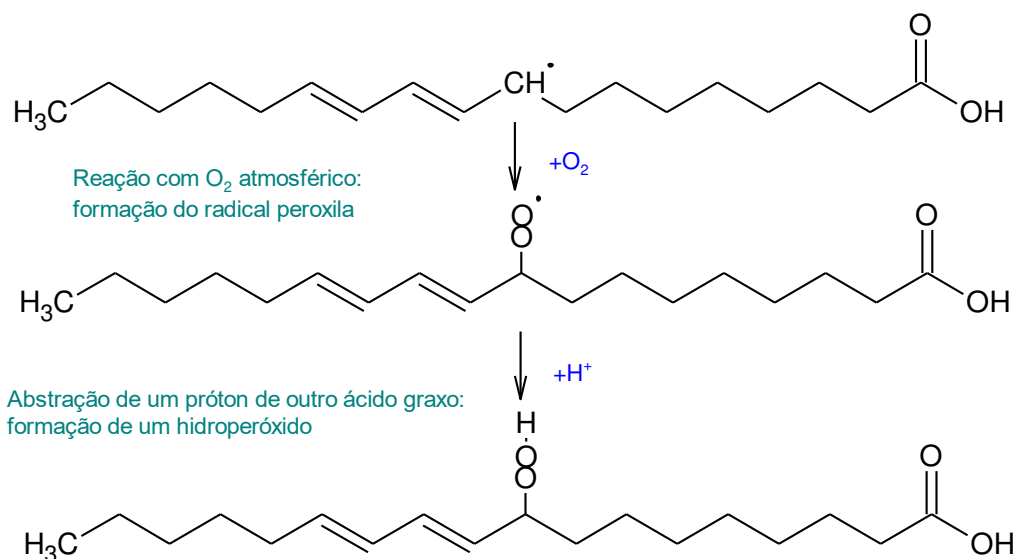


**Figura 12** - Etapa de iniciação da oxidação de lipídeos para um ácido monoinsaturado.



**Figura 13** - Etapa de iniciação da oxidação de lipídeos para um ácido poli-insaturado.

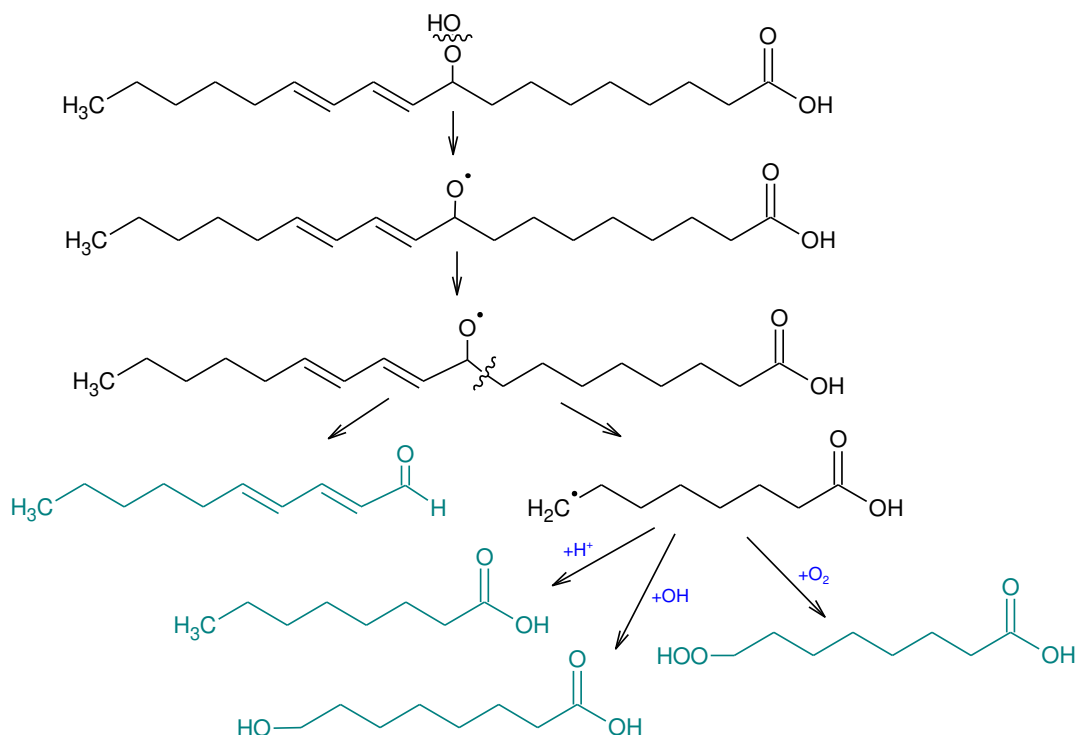
Na etapa de propagação ou peroxidação, exemplificada na Figura 14, o oxigênio atmosférico (ou tripleto,  $^3O_2$ ) interage com o radical alquila formando uma ligação covalente e gerando um radical peroxila ( $LOO^\bullet$ ). A energia do radical peroxila é elevada o suficiente para abstrair o hidrogênio de outra cadeia de ácido graxo insaturado. Desta forma, observa-se formação de um hidroperóxido ( $LOOH$ ) e um novo radical alquila ( $L^\bullet$ ), propagando a oxidação de um ácido graxo para o outro<sup>14,35</sup>. Ou seja, a reação se auto sustenta. A taxa de oxidação, medida como consumo de  $O_2$  ou concentração de hidroperóxidos, aumenta consideravelmente até um máximo valor de índice de peróxidos.



**Figura 14** - Etapa de propagação da oxidação de lipídeos para um ácido poli-insaturado, resultando na formação de um 9-hidroperoxido.

A etapa de terminação é caracterizada pela decomposição dos então formados hidroperoxidos<sup>35</sup>, principalmente pelas reações de  $\beta$ -clivagem (Figura 15), e pela formação de espécies não radicalares a partir da combinação de dois radicais. Uma ampla gama de compostos com diferentes funções químicas pode ser obtida (aldeídos, alcanos, álcoois, cetonas, epóxidos e produtos cíclicos), os quais caracterizam os produtos secundários da oxidação e cuja concentração aumenta consideravelmente. Nesta etapa, a taxa de decomposição dos hidroperoxidos é maior que a taxa de formação.

As reações de  $\beta$ -clivagem têm como precursores os radicais alcoxila ( $LO\cdot$ ), que se formam a partir da decomposição dos hidroperoxidos e são mais energéticos que os radicais alquila e peroxila. A energia destes radicais é elevada o suficiente para causar rompimento da cadeia alifática na ligação carbono-carbono adjacente. Um aldeído e um radical são formados; o radical pode reagir com radicais de hidrogênio ou hidroxila ou com  $O_2$ , formando hidrocarbonetos, álcoois ou hidroperoxidos. Ademais, a formação de hidroperoxidos em diferentes possíveis posições do ácido graxo contribui para a grande variedade de produtos secundários observados<sup>14</sup>.



**Figura 15** - Alguns dos possíveis produtos da decomposição da  $\beta$ -clivagem de um 9-hidroperóxido.

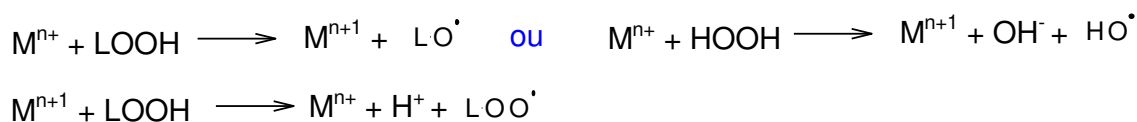
### 2.3.2. Fase exponencial e os pró-oxidantes

De maneira geral, a cinética de oxidação de lipídeos em alimentos pode ser dividida em uma *fase lag* (referente à iniciação) e uma fase exponencial. A extensão da *fase lag*, ou período de indução, é afetada por diversos fatores que devem ser conhecidos a fim de se manter a estabilidade do sistema por um período maior. A velocidade de reação da oxidação pode ser diminuída e o período de indução aumentado, mas este processo é espontâneo e deverá ocorrer obrigatoriamente, a menos que o oxigênio ou as substâncias oxidantes sejam totalmente excluídas do sistema<sup>32</sup>. Os mesmos fatores que podem encurtar a *fase lag* são também responsáveis pelo aumento exponencial da oxidação, uma vez que a auto oxidação não resulta em aumento líquido de radicais livres no meio e seus produtos finais deveriam apresentar um aumento linear. Estes fatores são denominados pró-oxidantes e são encontrados praticamente em todos os sistemas alimentares, causando ou acelerando processos de oxidação adicionais à auto oxidação. O oxigênio singlete e as lipoxigenases são pró-oxidantes que produzem hidroperóxidos;

metais de transição, luz e temperatura são pró-oxidantes que decompõem os hidroperóxidos em radicais livres<sup>14</sup>.

Oxigênio singlete no estado  $^1\Delta$ , com dois elétrons emparelhados e um orbital antiligante vazio, é uma espécie eletrofílica o suficiente para interagir diretamente com as ligações duplas dos ácidos graxos insaturados, formando hidroperóxidos. Nos alimentos, estas espécies podem ser formadas por processo químico ou enzimático ou por fotossensitização, quando compostos como clorofila, riboflavina e mioglobina absorvem a energia da luz radiante que é necessária para formação do singlete.

Os metais de transição estão presentes na água dos alimentos, nos ingredientes utilizados no processamento, nos materiais de embalagem, associados a proteínas e em materiais biológicos. Via mecanismo conhecido como ciclo redox, representado na Figura 16, os metais de transição podem decompor os hidroperóxidos em radicais livres. A concentração, o estado químico e o tipo de metal influenciam na velocidade desta decomposição. Ferro, cobre e manganês são exemplos de metais pró-oxidantes; entretanto, o superóxido ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) e o ácido ascórbico também podem atuar como espécies redutoras no ciclo redox. No caso do ácido ascórbico, que também tem atividade antioxidante, a concentração de ascorbato deve ser elevada para que seu efeito benéfico prevaleça<sup>35</sup>.



**Figura 16** - Representação da via de ciclo redox, onde  $\text{M}^{n+}$  e  $\text{M}^{n+1}$  são metais de transição nos estados reduzido e oxidado.

### 2.3.3. Antioxidantes

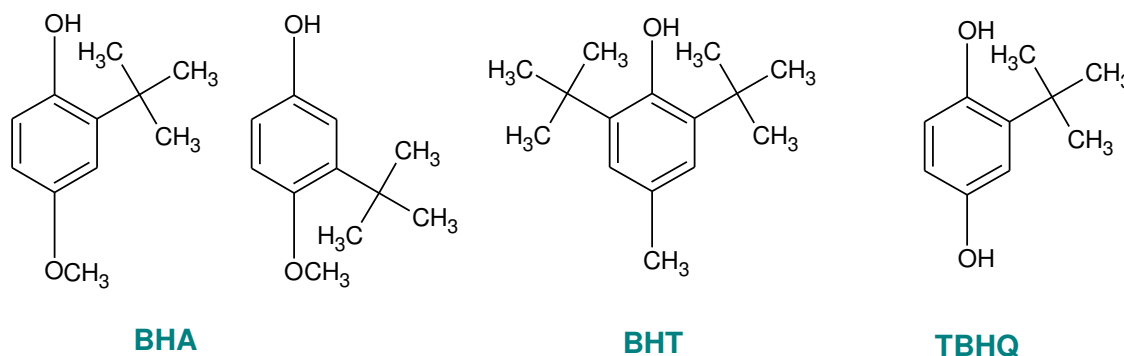
Algumas substâncias podem sequestrar radicais livres, atuar sobre os pró-oxidantes ou interagir com os intermediários de oxidação; qualquer que seja o mecanismo de atuação, elas são capazes de suprimir as reações em cadeia que caracterizam a oxidação e, portanto, são consideradas antioxidantes. Tais substâncias podem ocorrer naturalmente em alguns sistemas alimentícios, mas são

mais comumente adicionados aos produtos de maneira intencional. Os antioxidantes utilizados no processamento de alimentos precisam ser baratos, não-tóxicos, eficientes em baixas concentrações, estáveis e apresentarem cor, aroma e sabor mínimos.

#### **2.3.3.1. Mecanismo de sequestro de radicais livres**

Alguns compostos podem reagir com os radicais livres em uma taxa de reação maior que aquela dos ácidos graxos insaturados, pois apresentam maior capacidade de doar hidrogênio para as espécies radicalares. Essa capacidade pode ser prevista tanto pelo potencial padrão de redução (as espécies que apresentarem potencial de redução menor que os radicais peroxila poderão desempenhar função antioxidante) como pelo nível de energia dos radicais formados (deve haver estabilização da espécie radicalar)<sup>34</sup>. Por exemplo, compostos fenólicos consistem em eficientes sequestrantes de radicais livres, pois o elétron desemparelhado é deslocalizado pelo anel aromático por ressonância. Ademais, a efetividade dessa estabilização pode ser aumentada adicionando certos substituintes ao anel aromático.

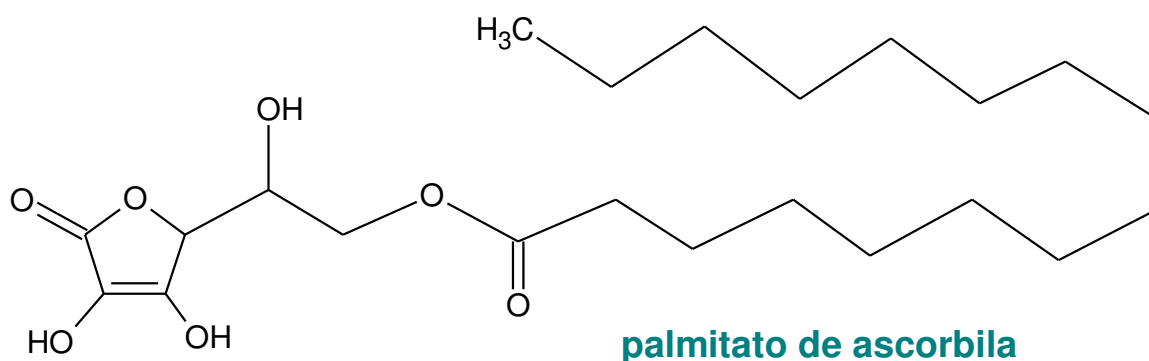
Estão disponíveis no mercado uma série de compostos fenólicos sintéticos, os quais são amplamente utilizados na indústria de alimentos, como, por exemplo, o hidroxitolueno butilado (BHT), hidroanisol butilado (BHA) e butil hidroxiquinona terciária (TBHQ), cujas estruturas químicas estão representadas na Figura 17<sup>14</sup>. Tais compostos apresentam variações de estrutura que caracterizam tanto sua atividade antioxidante como também suas propriedades físicas, como solubilidade e estabilidade a altas temperaturas. A estabilização por ressonância garante que estas espécies possam doar um próton para os radicais peroxila, formando um radical fenólico de baixa energia que não tende a reagir com o oxigênio, mas sim com outros radicais em uma reação de terminação<sup>36</sup>. Apesar da eficiência superior destes compostos, do baixo custo e da estabilidade, sua utilização vem sendo diminuída nos últimos anos, devido à busca dos consumidores por produtos e aditivos naturais.



**Figura 17** – Estruturas dos antioxidantes fenólicos sintéticos mais comumente utilizados.

O BHA e o BHT são usualmente empregados juntos devido à sinergia apresentada; o BHA atua como antioxidante primário, interagindo com os radicais peroxila e produzindo um radical fenoxil. Em seguida, o radical fenoxil do BHA abstrai um próton do BHT, se regenerando. O TBHQ e o ácido cítrico também apresentam sinergismo<sup>11</sup>.

O L-ácido ascórbico (ou vitamina C) também é um composto natural que atua como antioxidante. Entretanto, para que o mesmo possa ser empregado em sistemas que contenham lipídeos, o mesmo é usualmente empregado na forma de seu derivado sintético palmitato de ascorbila, representado na Figura 18, com característica lipofílica. O palmitato de ascorbila é convertido no trato gastrointestinal a ácido palmítico e ascórbico<sup>14</sup>, embora não se possa utilizar esta propriedade como apelo nutricional para o produto.



**Figura 18** – Estrutura do antioxidante palmitato de ascorbila.

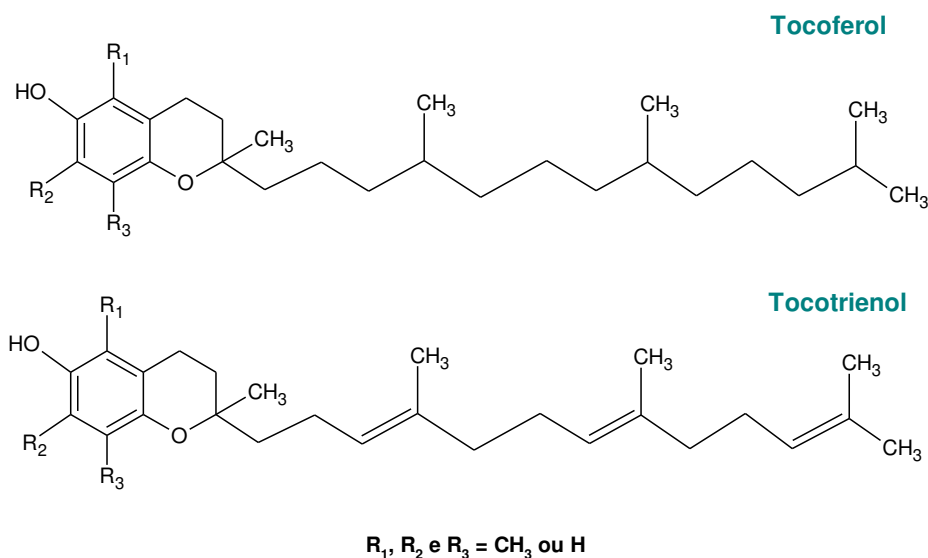
No que se refere a compostos naturais com propriedade antioxidante, destaca-se o grupo dos tocoferóis, cujos homólogos apresentam atividade de vitamina E. A atividade de antioxidante e de vitamina varia de um homólogo para outro, os



quais apresentam a estrutura básica apresentada na Figura 19. O  $\alpha$ -tocoferol, que é trimetilado, apresenta a maior atividade de vitamina E. Os homólogos  $\beta$  e  $\gamma$  são bimetilados e o homólogo  $\delta$ , que apresenta a maior atividade antioxidante, é monometilado. Esta classe ainda compreende os tocotrienóis, que apresentam três ligações duplas na cadeia fitol adicionalmente aos tocoferóis. Estas estruturas apresentam três carbonos assimétricos, podendo apresentar oito diferentes isômeros. Entretanto, somente os isômeros RRR são naturalmente encontrados<sup>14</sup>.

Misturas de tocoferóis e tocotrienóis são geralmente obtidas no refino de óleos vegetais, sendo o óleo de soja a principal fonte de tocoferóis naturais utilizados comercialmente (resultam em misturas superiores a 80% dos homólogos  $\alpha$  e  $\delta$ ). Os tocoferóis sintéticos também estão disponíveis no mercado, variando a forma isomérica. Como muitos óleos vegetais já possuem alta concentração de tocoferóis, a adição destas substâncias pode resultar em um efeito pró-oxidante.

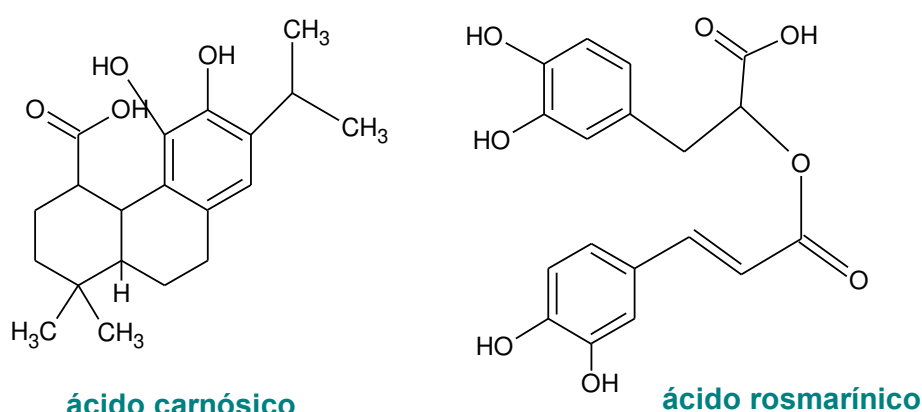
De maneira similar aos fenólicos sintéticos, estas espécies doam um próton para os radicais peroxila, formando uma espécie radicalar de baixa energia que reagirá posteriormente com outras espécies radicalares, terminando a cadeia de reações<sup>37</sup>.



**Figura 19** – Estruturas genéricas para os grupos de tocoferóis e tocotrienóis.

Muitas frutas, temperos e chás também apresentam diversos compostos fenólicos com notável atividade antioxidante; são compostos fenólicos simples, ácidos fenólicos, antocianinas, derivados de ácido cinâmico e flavonóides. O extrato de

alecrim é um exemplo de extrato vegetal rico em fenólicos, entre eles o ácido carnósico, o carnosol e o ácido rosmarínico (Figura 20), os quais atuam como sequestrantes de radicais livres<sup>34</sup>. Estes e outros extratos de ervas carregam muitos compostos flavorizantes, o que permite que sejam declarados como aromatizantes e não antioxidantes. Entretanto, estes mesmos flavorizantes limitam a utilização do extrato no produto, pois podem alterar as características organolépticas do alimento. Estes extratos também costumam ser mais caros que os antioxidantes sintéticos disponíveis no mercado e requerem maiores dosagens para a mesma funcionalidade.



**Figura 20** – Estruturas dos principais agentes antioxidantes encontrados no extrato de alecrim: ácido carnósico (diterpênico) e ácido rosmarínico (fenólico).

Um artifício utilizado para potencializar o efeito antioxidante é a utilização de sistemas múltiplos de sequestrantes de radicais livres<sup>34,38</sup>. Uma espécie se oxida mais rapidamente (oxidante primário), formando um primeiro radical; este abstrai o próton da segunda espécie (oxidante secundário), se regenerando e gerando uma espécie radicalar do segundo antioxidante. Por exemplo, o sinergismo entre tocoferóis e palmitato de ascorbila já foi reportado na literatura para matrizes alimentares como óleos vegetais, gorduras alimentares e até mesmo em carnes<sup>36</sup>; neste caso, o derivado de ácido ascórbico é o responsável por regenerar o tocoferol.

### 2.3.3.2. Controle de pró-oxidantes

O controle de oxigênio singlete, de elevada energia, pode ser feito agregando carotenóides à matriz lipídica. Estes compostos consistem em polienos de coloração amarelo a vermelho cujas ligações duplas interagem com o singlete, desativando-o. Tal interação resulta na descoloração dos carotenóides e caracteriza um mecanismo químico de desativação. Carotenóides com nove ou mais ligações duplas também podem desativar o oxigênio singlete pela absorção de sua elevada energia, que depois é dissipada por interações vibracionais e rotacionais. Este processo configura um controle físico, que é mais efetivo que o mecanismo químico<sup>14</sup>.

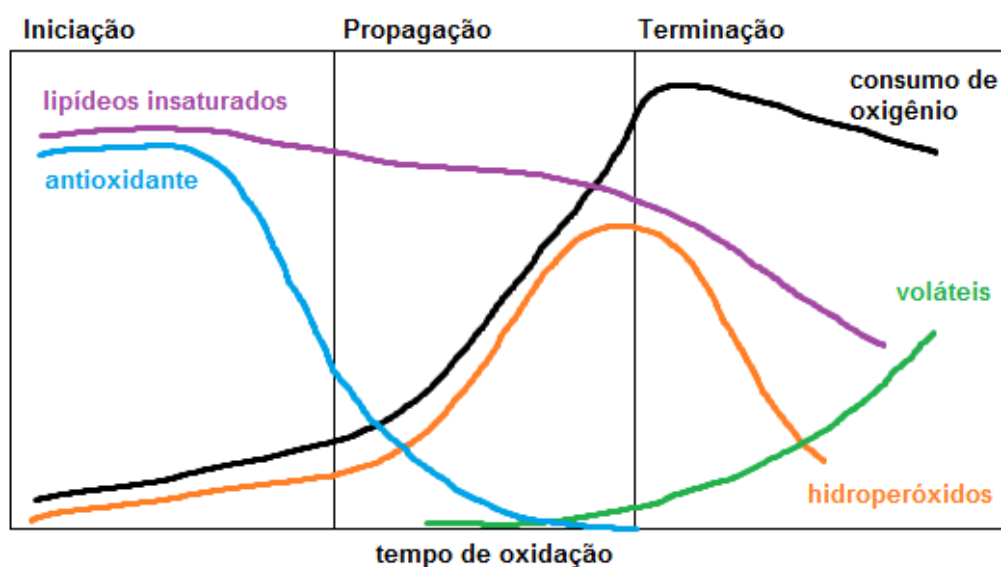
No que se refere ao controle de metais pró-oxidantes, recorre-se ao uso de quelantes. Tais aditivos podem apresentar grupos de ácidos carboxílicos (EDTA e ácido cítrico, por exemplo) ou de fosfatos (tripolifosfato e hexametáfosfato, por exemplo), os quais devem estar ionizados para atuarem no controle dos metais (ou seja, o pH deve ser maior que o pKa destes grupos). Os mecanismos de atuação podem ser pela intervenção no ciclo redox, ocupação de todos os sítios de coordenação do metal, formação de complexos metálicos insolúveis ou impedimento estéreo.

### 2.3.4. Cinética de oxidação

O consumo de oxigênio ao longo do processo de oxidação é o melhor parâmetro a ser monitorado para o estudo da cinética de oxidação dos lipídeos. Entretanto, a medida do conteúdo total de hidroperóxidos é suficiente para avaliar o progresso do processo oxidativo como um todo, embora não forneça informações para estudo do mecanismo de reação<sup>33</sup>.

Graficamente, a cinética de oxidação de lipídeos é bem representada pela Figura 21, na qual se observam as três etapas da oxidação mencionadas anteriormente e a transição da *fase lag* para a fase exponencial<sup>39</sup>. Matematicamente, o primeiro passo para a determinação da cinética da oxidação lipídica é a

determinação da ordem de reação. No que se refere unicamente aos hidroperóxidos, a etapa de indução é de pseudo-ordem zero, a etapa de propagação é de pseudo-ordem um e a etapa de terminação é de pseudo-ordem dois; as ordens de reação não são absolutas, pois não são reações que ocorrem isoladamente. Desta forma, cada etapa da oxidação é matematicamente descrita por uma equação, como indicado na Tabela 2, com respeito à produção de hidroperóxidos<sup>40</sup>.



**Figura 21** - Curva da cinética de auto oxidação de ácidos graxos poli-insaturados dividida nas etapas de indução, propagação e terminação.

**Tabela 2** - Equações básicas para reações de ordem zero, um e dois com respeito aos hidroperóxidos.

Ordem de reação	Função diferencial	Função integrada	Gráfico característico
0	$\frac{d[LOOH]}{dt} = -k$	$[LOOH]_t - [LOOH]_0 = -kt$	$[LOOH] \text{ vs. } t$
1	$\frac{d[LOOH]}{dt} = -k [LOOH]$	$[LOOH]_t = [LOOH]_0 e^{-kt}$	$\ln[LOOH] \text{ vs. } t$
2	$\frac{d[LOOH]}{dt} = -k [LOOH]^2$	$[LOOH] = \frac{[LOOH]_0}{1 + [LOOH]_0 kt}$	$\frac{1}{[LOOH]} \text{ vs. } t$

Modelos mais sofisticados, polinomiais ou empíricos, foram propostos ao longo do tempo para ajuste da cinética da oxidação lipídica. Dentre eles, destaca-se a função de Gompertz, descrita na equação 1, que já foi utilizada para descrever curvas sigmóides como cinética de crescimento bacteriano e cinética de cristalização de gorduras. As etapas de iniciação e propagação podem ser comparadas ao

crescimento de bactérias e à nucleação e crescimento de cristais, assim como o consumo de nutrientes pelas bactérias e à diminuição da supersaturação podem ser comparados à diminuição da concentração de substratos. Na equação 1,  $a$  é a assíntota superior,  $b$  é uma taxa constante de crescimento exponencial,  $t$  é o período e  $k$  é o período equivalente ao ponto de inflexão<sup>33</sup>.

$$y(t) = ae^{-e^{(-b(t-k))}} \quad (1)$$

## 2.4. Microencapsulação

Alimentos contendo alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados são de grande importância na nutrição humana dada a ampla gama de funções fisiológicas que regulam ou nas quais participam dentro do organismo. Também são muitas as hipóteses da função destes ácidos na prevenção ou retardação de diversas doenças, como indicam estudos em animais e de intervenção clínica<sup>25-26,41</sup>. Desta forma, óleos contendo alto grau de insaturação, de fonte vegetal ou marinha, constituem ingredientes funcionais de grande interesse para a indústria de alimentos. Entretanto, o alto grau de insaturação também os torna altamente susceptíveis à oxidação, restringindo sua utilização em alimentos. Neste sentido, torna-se necessário proteger tais ingredientes e garantir sua estabilidade durante o processamento e o armazenamento, evitando a exposição à luz e ao oxigênio atmosférico e, portanto, à precoce iniciação da oxidação. A microencapsulação de óleos com alto grau de insaturação permite que suas propriedades funcionais específicas sejam mantidas (efeito protetivo) e também que o manuseio destes ingredientes na forma de pó seja facilitado<sup>42</sup>. Desta forma, novos ingredientes funcionais vêm sendo desenvolvidos, dentre eles os óleos ricos em ácidos graxos ômega-3, com o objetivo de atender à crescente demanda por produtos mais saudáveis<sup>43</sup>.

A tecnologia de microencapsulação é uma ferramenta viável e eficiente na produção de diversos alimentos funcionais e por diversas razões. Alimentos funcionais são aqueles enriquecidos com ingredientes funcionais que ofereçam benefícios para a saúde ou que reduzam o risco de doenças crônicas. A microencapsulação produz

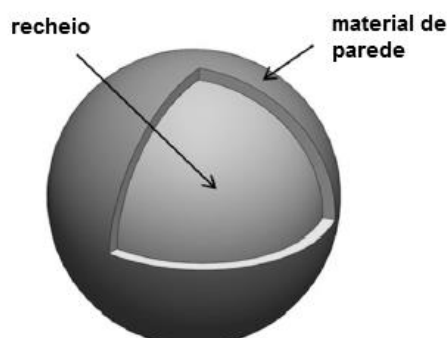
pequenas partículas de material sólido ou líquido recobertas com material de cobertura, criando uma barreira física que reduz as interações deste núcleo lábil com o meio externo. Proteínas, vitaminas, minerais, lipídeos, antioxidantes, fitoquímicos e probióticos compreendem uma lista de ingredientes bioativos comumente microencapsulados<sup>42</sup>. A técnica ainda é empregada com o objetivo de preservação de aromas, manutenção de cor e do valor nutricional, além de poder atuar na separação de componentes reativos ou incompatíveis dentro de uma dada formulação ou evitar reações prematuras de um substrato de interesse. Matérias-primas com sabor indesejável também podem ser encapsuladas para mascaramento desta percepção sensorial desagradável. No que tange a aspectos de formulação, a microencapsulação de alguns materiais pode garantir melhor incorporação destas matérias-primas a sistemas secos e promover melhor solubilidade do material do núcleo<sup>44</sup>. Ademais, a maior facilidade na manipulação e no manuseio dos materiais encapsulados tem impacto financeiro, reduzindo os custos envolvidos nestes processos.

No processo de encapsulação, pequenas partículas ou gotículas que contêm o ingrediente ativo são envolvidas por um material de cobertura (material de parede, cobertura ou matriz), resultando em pequenas partículas. O material que compõe o recheio (núcleo ou agente ativo) pode ser sólido, líquido ou gasoso, sendo este mantido isolado do ambiente exterior; desta forma, reações químicas e transformações físicas podem ser retardadas e até mesmo evitadas, mantendo as propriedades biológicas, funcionais e físico-químicas do material a ser encapsulado, como já citado. A barreira física criada isola o material interno do ambiente, em uma estrutura similar àquela representada na Figura 22<sup>45</sup>. Ademais, o recheio das cápsulas pode difundir-se gradualmente através das paredes, caracterizando uma propriedade de grande interesse para a indústria, principalmente a farmacêutica, que é a liberação modificada do material ativo.

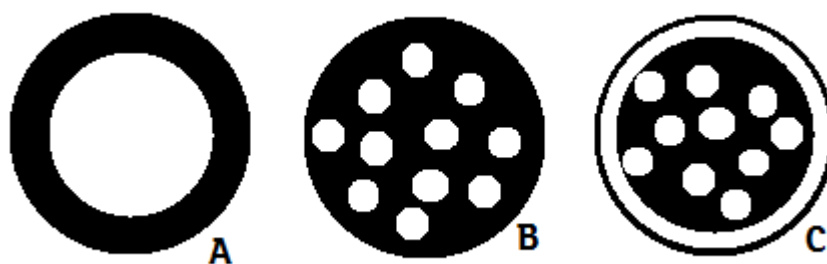
De acordo com o tamanho das partículas obtidas, estas podem ser classificadas em três categorias: macro (superior a 5000 $\mu\text{m}$ ), micro (0,2-5000 $\mu\text{m}$ ) e nanocápsulas (inferior a 0,2 $\mu\text{m}$ )<sup>44</sup>. As partículas também podem ser classificadas de acordo com sua morfologia, que dependerá muito do método de encapsulação adotado. Em cápsulas verdadeiras, do tipo reservatório (Figura 23-A), uma barreira inerte protege o núcleo que é composto pelo ingrediente ativo. No tipo matriz ou microesfera (Figura 23-B), o ingrediente ativo está disperso ou impregnado em uma

matriz polimérica inerte. Por fim, a morfologia mista (Figura 23-C) é uma combinação da cápsula e da microesfera<sup>42</sup>.

O processo de microencapsulação pode se dar por técnicas físicas, químicas ou físico-químicas, como secagem por atomização, leite fluidizado, coextrusão e emulsificação, coacervação ou polimerização *in situ*<sup>45</sup>. Em todas as técnicas, o material de parede irá determinar a estabilidade das cápsulas, a eficiência do processo e o grau de proteção do recheio. Geralmente, polímeros sintéticos e biomateriais são empregados como material de parede. Dentre os biomateriais, destacam-se os polissacarídeos, proteínas e lipídeos, os quais devem ser de grau alimentício e biodegradáveis. Os polissacarídeos comumente utilizados são o amido, amilose, amilopectina, dextrina, maltodextrina, polidextrose e xaropes. Polissacarídeos de origem microbiana e animal também podem ser utilizados, como quitosana, xantana e gelana. As proteínas geralmente utilizadas são aquelas de leite e de soro de leite, gelatina e glúten. Quanto aos lipídeos, podem ser empregados ácidos e álcoois graxos, ceras, glicerídeos e fosfolipídeos.



**Figura 22** - Representação simplificada de uma microcápsula: recheio e material de parede.

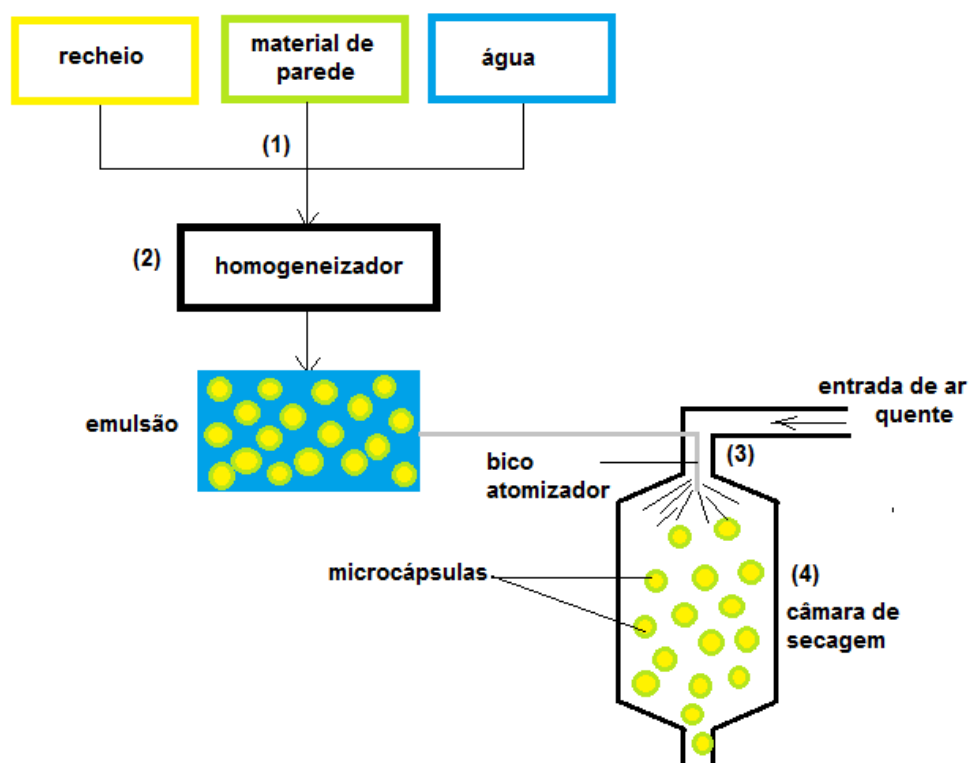


**Figura 23** – Diferentes morfologias de microcápsulas.

Dentre as diversas técnicas de microencapsulação, a secagem por atomização (ou mais comumente chamada de *spray-drying*) é a mais antiga (sua utilização para proteção de aromas data de 1930) e a mais amplamente utilizada, apresentando vantagens sobre os demais métodos como simples operação e relativo baixo custo<sup>44</sup>.

Em suma, o núcleo é emulsionado em uma solução ou dispersão aquosa do material de parede e a emulsão formada é atomizada dentro de uma câmara de secagem com temperatura relativamente alta, resultando na rápida evaporação da água e na formação de uma crosta que aprisiona a fase dispersa da emulsão original, ou seja, o recheio. Para que este processo ocorra, quatro etapas devem ser consideradas, como está graficamente representado na Figura 24. A primeira etapa envolve o preparo da dispersão das matérias-primas em água, sob agitação. O material a ser protegido é geralmente adicionado com emulsificante. Para garantir a alta eficiência do processo, deve-se trabalhar com uma alta concentração de sólidos na dispersão, ou seja, grande quantidade de material de parede. A segunda etapa envolve a homogeneização da dispersão, que resulta em emulsões com tamanho de glóbulos de 0,1 a 100µm de diâmetro<sup>45</sup>, a depender do emulsificante e do equipamento empregados. A emulsão formada deve apresentar mínima estabilidade necessária até que a etapa de secagem seja finalizada. A viscosidade também deve ser relativamente baixa, pois deverá ser bombeada para a câmara de secagem na terceira etapa. Essa característica reológica deve evitar a incorporação de ar às cápsulas e a formação de partículas alongadas e muito grandes, já que uma emulsão muito viscosa afeta diretamente a eficiência da atomização. Na última e quarta etapa, ocorre a secagem das partículas atomizadas na câmara de aquecimento, cujos parâmetros a serem otimizados são a temperatura de entrada da emulsão, a temperatura do ar de entrada e a temperatura do ar de saída. Quanto mais alta a temperatura de entrada, menor é a viscosidade da emulsão e mais eficiente é a atomização. O tempo de exposição ao calor é de cerca de alguns segundos apenas e a temperatura do núcleo chega a temperaturas comumente abaixo de 100°C, o que não deve comprometer significativamente a estabilidade de compostos termolábeis<sup>44</sup>. No entanto, a volatilidade e a estabilidade dos componentes da emulsão devem ser levadas em consideração neste ponto.





**Figura 24** – Representação gráfica das etapas de mistura e homogeneização que precedem a alimentação do secador por nebulização.

O material resultante do processo de *spray-drying* é do tipo matricial ou microesfera, para o qual a liberação do núcleo pode ocorrer pela ação de solventes ou por difusão. A faixa de tamanho de partícula das microcápsulas é geralmente de 10 a 400 $\mu$ m. Outra vantagem da técnica é a simplicidade e velocidade do processo, além de seu fácil escalonamento para maiores dimensões e grande disponibilidade comercial de equipamentos. Ademais, o custo da técnica de secagem por atomização é de 30 a 50 vezes menor que o de outras técnicas de microencapsulação<sup>42</sup>. Por outro lado, algumas desvantagens do processo devem ser mencionadas, como a grande quantidade de etapas do processo passíveis de otimização, altas taxas de perda de material por deposição nas paredes da câmara, além da não uniformidade das condições dentro da câmara de secagem e a dificuldade de se controlar o tamanho das partículas obtidas<sup>46</sup>.

No que se refere aos materiais de parede utilizados no método de *spray-drying*, alguns critérios devem ser avaliados, como solubilidade em água, viscosidade (baixa para alta concentração de sólidos), propriedades mecânicas, higroscopicidade, transição vítrea, ponto de fusão, cristalinidade, formação de filme e propriedades emulsificantes<sup>47</sup>. Na prática, utilizam-se misturas para que grande parte das

propriedades de interesse sejam atendidas, pois tanto as características da emulsão (estabilidade, viscosidade, tamanho das partículas) como as do pó (quantidade de óleo na superfície, tamanho de partícula, densidade, morfologia e estabilidade oxidativa) são influenciadas pelo material de parede<sup>48</sup>. Carboidratos são os materiais de parede mais utilizados como agentes encapsulantes de alimentos, havendo uma grande diversidade de compostos à baixo custo.

## **2.5. Alimentos especiais**

Nos últimos anos, a indústria de alimentos vem sendo exigida quanto à adição de ingredientes funcionais aos produtos disponibilizados ao consumidor, sejam estas moléculas bioativas, como os ácidos graxos ômega-3 e ômega-6, até mesmo probióticos<sup>46</sup>. Alguns destes ingredientes funcionais podem inclusive compor uma outra classe mais ampla de produtos para fins especiais, que são os alimentos enterais. Produtos voltados para dieta enteral devem ser consumidos somente sob orientação médica ou de nutricionista, especialmente processado para ser utilizado de forma exclusiva ou complementar na alimentação de pacientes com capacidade limitada de ingerir, digerir ou absorver alimentos convencionais, ou de pacientes com necessidades nutricionais específicas determinadas por sua condição clínica. Segundo definição do Ministério da Saúde, nutrição enteral designa alimentos para fins especiais, com ingestão controlada de nutrientes, na forma isolada ou combinada, de composição definida ou estimada, especialmente formulada e elaborada para uso por sondas ou via oral, industrializado ou não, utilizada exclusiva ou parcialmente para substituir ou complementar a alimentação oral em pacientes desnutridos ou não, conforme suas necessidades nutricionais, em regime hospitalar, ambulatorial ou domiciliar, visando a manutenção de tecidos, órgãos e sistemas.

Uma blenda de óleos vegetais e/ou marinhos, por exemplo, poderia ser enquadrada na categoria de módulo para nutrição enteral segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>49</sup>, cumprindo o requisito de ser composta por um dos principais grupos de nutrientes necessários à dieta humana (no caso, composta de lipídeos).

## 2.6. Métodos de análise para medição da oxidação de lipídeos

A avaliação do grau de oxidação de lipídeos é objeto de interesse em estudos médicos, devido ao caráter nocivo das espécies radicalares e outros produtos que podem levar a disfunções do organismo. Para a indústria de alimentos, esta avaliação também se faz necessária, pois desta forma pode-se controlar a qualidade de matérias-primas recebidas antes de utilizá-las nos processos e controlar a qualidade dos produtos que são produzidos e comercializados<sup>39</sup>. A nível de pesquisa e desenvolvimento, a utilização de métodos para avaliação do grau de oxidação permite que se estude o desenvolvimento de ranço em produtos que serão lançados no mercado, podendo avaliar se a adição de antioxidantes ou outros recursos se fazem necessários para garantir uma vida de prateleira mais longa para os produtos.

Ao longo do processo oxidativo, há variações de propriedades físicas, organolépticas e químicas nos alimentos, as quais podem ser monitoradas e consistem na base de muitos métodos disponíveis.

Para um único ácido graxo insaturado, são diversas as vias de oxidação de lipídeos e, portanto, diversos os produtos formados. Entretanto, o material lipídico de alimentos em geral é composto de diferentes ácidos graxos, o que aumenta consideravelmente a gama de produtos da oxidação, sejam estes primários (gerados nas etapas de iniciação e propagação) ou secundários (gerados na decomposição dos hidroperóxidos e reações de terminação). Em consequência, a avaliação da oxidação torna-se um desafio, pois cada método experimental disponível irá fornecer informações sobre um estado particular de todo o processo. Desta forma, os métodos disponíveis costumam ser divididos em procedimentos para (1) análise de substratos e produtos primários e (2) análise de produtos secundários.

## **2.6.1. Substratos e produtos primários**

### **2.6.1.1. Mudança na composição graxa de lipídeos**

O método de determinação do perfil de ácidos graxos livres de um produto consiste na análise por cromatografia gasosa dos ésteres metílicos dos ácidos graxos livres presentes em sua fração lipídica. Esta etapa de derivatização que converte os ácidos graxos livres (substrato) em seus ésteres metílicos permite que os analitos sejam voláteis.

Dado que os ácidos graxos insaturados são o alvo da oxidação lipídica, tal método deverá refletir este consumo por uma mudança na composição do produto. Entretanto, tal método não é muito utilizado, uma vez que requer extração exaustiva da fração lipídica do alimento sob estudo<sup>39</sup>.

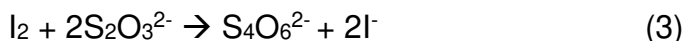
### **2.6.1.2. Ganho de massa**

Um método bastante simples para monitorar a oxidação de lipídeos, principalmente no que se refere às etapas de iniciação e propagação, é o ganho de massa que se observa em decorrência da incorporação de oxigênio aos ácidos graxos na peroxidação. Apesar de simples, o método pode sofrer algumas interferências e não é usualmente utilizado<sup>11</sup>.

### **2.6.1.3. Determinação do índice de peróxidos (IP)**

Apesar do nome atribuído ao método, possivelmente por razões históricas, a determinação do índice de peróxidos trata-se de um método iodométrico, que se

baseia na redução dos hidroperóxidos e consequente oxidação do iodeto a iodo (2). O iodo formado é então titulado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio (3).



A reação 2 ocorre no escuro e com solução saturada de iodeto de potássio, em meio a um solvente composto de clorofórmio e ácido acético. Na reação 3, adiciona-se água ao meio, a qual deve estar fervida para evitar a presença de O<sub>2</sub> dissolvido no meio. O oxigênio dissolvido pode gerar resultados superestimados de índice de peróxidos, pois este também deverá oxidar os íons iodeto; por isso, a agitação durante a titulação também deve ser branda, para não incorporar ar ao sistema. Conforme o iodo é titulado, sua coloração âmbar vai sendo descorada. Próximo ao ponto de equivalência, uma solução indicadora de amido é adicionada, formando um complexo de coloração violeta com o iodo. Este complexo também é descorado no ponto de equivalência, indicando o final da titulação. Os resultados são expressos em miliequivalentes (mEq) de oxigênio por quilo de material lipídico, o que equivale também a 2mmol de hidroperóxido por quilo de lipídeos. Limites de detecção de 0,5mEq/kg de óleo são reportados na literatura<sup>11</sup>.

Além da interferência do oxigênio e da luz, o tempo da reação 2 também afeta os resultados da análise, devido às diferenças em reatividade dos hidroperóxidos formados (dihidroperóxidos ou peróxidos cíclicos formados em peroxidações posteriores) e ao grau de hidroperóxidos. Em baixos valores de IP, o tempo de reação não tem grande efeito e a reação pode ser conduzida à temperatura ambiente. Em valores mais altos de IP, o tempo de reação deve ser maior. O método oficial proposto pela Associação dos Químicos Analíticos Oficiais (*Association of Official Analytical Chemists* – AOAC), Official Method AOAC 965.33, por exemplo, indica um tempo de reação igual a um minuto, à temperatura ambiente e sob luz do dia difusa, omitindo a necessidade do uso de gás inerte. Ademais, a análise de um branco suprime a necessidade de conduzir a análise sob condição atmosférica.

O monitoramento do índice de peróxidos ao longo do tempo é usualmente utilizado para medir a efetividade de antioxidantes adicionados, pois permite o monitoramento da etapa do período de indução. O método clássico utiliza a detecção visual do ponto final da titulação, tendo uma solução indicadora de amido, como já

mentionado, mas a literatura aponta trabalhos em que se utilizaram pontos de detecção espectrofotométricos, eletrométricos e coulométricos<sup>33</sup>. Ademais, o índice de peróxidos é apontado como um dos parâmetros que indica a qualidade de óleos e gorduras, estabelecido mundialmente pelo *Codex General Standard for Fats and Oils*, da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura<sup>50</sup>. Para óleos e gorduras refinados, os valores máximos de 0,6mg KOH/g e de 10mEq de oxigênio ativo/kg para acidez e índice de peróxidos, respectivamente, são tidos como critérios de qualidade. A acidez é o parâmetro que reflete a rancidez hidrolítica de óleos e gorduras, processo no qual ocorre a hidrólise de mono, di e triglicerídeos, com liberação de ácidos graxos livres.

#### **2.6.1.4. Dienos e trienos conjugados**

A abstração de hidrogênio de ácidos graxos poli-insaturados leva à formação de ligações duplas conjugadas e ao aumento da absorção de radiação ultravioleta. Os dienos formados apresentam absorção no comprimento de onda de 234nm, enquanto os trienos absorvem em 268-270nm. As amostras costumam ser diluídas em isooctano, na proporção de 1:100 para trienos e 1:1000 para dienos<sup>51</sup>. As medidas de absorbância nestes comprimentos de onda apresentam proporcionalidade em relação à absorção de O<sub>2</sub> devido à formação dos radicais peroxila, sendo alternativo ou complementar à determinação do índice de peróxidos.

Este é um método bastante rápido e simples, que não depende de reações químicas prévias ou desenvolvimento de cor e requer quantidade relativamente baixa de amostra. Em contrapartida, torna-se ineficiente no caso de sistemas complexos, devido à presença de outros compostos que também podem absorver radiação nos comprimentos de onda referidos.

#### **2.6.1.5. Método do Oxigênio Ativo (*Active Oxygen Method* – AOM)**

O Método do Oxigênio Ativo consiste em um teste acelerado para a estabilidade oxidativa recomendado pela Sociedade Americana dos Químicos de Óleos (*American Oil Chemists' Society* – AOCS). Neste, a amostra sob estudo é controladamente aerada em temperaturas elevadas. Monitora-se o índice de peróxidos em intervalos de tempo definidos<sup>39</sup>, determinando-se o período de indução de forma gráfica.

Versões automatizadas do Método do Oxigênio Ativo estão disponíveis no mercado desde a década de 80; nestas versões (Instrumento de Estabilidade de Óleos OSI ou Rancimat), são medidas as variações de condutividade causadas por ácidos orgânicos voláteis, principalmente o ácido fórmico, que são mais estáveis que os hidroperóxidos.

#### **2.6.2. Produtos secundários**

##### **2.6.2.1. Compostos voláteis**

Devido à sua volatilidade, alguns produtos secundários da oxidação são compostos que podem ser analisados por cromatografia gasosa com injeção direta, *headspace* (estático ou dinâmico)<sup>37</sup> ou micro-extração em fase sólida. Essa análise apresenta grande correlação com a análise sensorial, pois os compostos voláteis são aqueles responsáveis pelo desenvolvimento do odor e do sabor ranço<sup>39</sup>.

Pode-se monitorar tanto os voláteis totais como produtos específicos, gerados na oxidação de certos ácidos graxos de partida; por exemplo, para produtos ricos em ácidos graxos ômega-6, monitora-se a formação de hexanal, enquanto o propanal é monitorado em produtos ricos em ácidos graxos ômega-3.

A técnica apresenta limitações quanto ao custo de instrumentação e dificuldade de operação destes sistemas.

#### **2.6.2.2. Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico**

Este método baseia-se na reatividade de espécies contendo o grupo funcional carbonila com o ácido tiobarbitúrico (TBA), gerando adutos de coloração vermelha sob condição ácida, os quais apresentam máximo de absorção da radiação ultravioleta em 530-532nm. O principal produto monitorado é o malonaldeído<sup>39</sup>, que se trata de um produto minoritário da oxidação de lipídeos. O resultado é expresso então como equivalentes de malonaldeído por quilo de amostra, ainda que o método seja sensível a diversas espécies reativas ao TBA (outras carbonilas lipídicas e carbonilas não lipídicas, como ácido ascórbico, açúcares, produtos da reação de Maillard, entre outros).

Dada as interferências da matriz de amostra, é sugerido que se realize a análise primeiramente na amostra fresca, não oxidada; assim, tem-se uma estimativa das espécies reativas ao TBA que não provém de produtos de oxidação. Ademais, a quantidade de malonaldeído produzida a partir da oxidação varia de acordo com a composição dos ácidos graxos, não se indicando este método para a comparação do grau de oxidação de diferentes composições graxas.

#### **2.6.2.3. Valor de p-anisidina**

Aldeídos com duas duplas ligações conjugadas também formam compostos cromóforos em meio ácido com a p-anisidina, absorvendo radiação ultravioleta em 350nm. O método também é sensível às carbonilas não voláteis e de alta massa molecular.

O resultado é expresso como 100 vezes a densidade ótica de 1,0g de lipídeo em 100mL de uma mistura de solvente e reagente, em cubeta de 1cm<sup>39</sup>.



#### 2.6.2.4. Carbonilas

Carbonilas ainda podem sofrer reação com a 2,4-dinitrofenilidrazina, formando hidrazonas com máximos de absorção entre 430 e 460nm, mas o método também é susceptível a interferências de outras espécies que não sejam produtos de oxidação<sup>11</sup>.

#### 2.6.2.5. Análise sensorial

A análise sensorial é a disciplina científica que evoca, mede, analisa e interpreta como as características dos alimentos são percebidas pelos órgãos da visão, olfato, gosto, tato e audição<sup>52</sup>. No que se refere ao monitoramento da oxidação de lipídeos, a análise sensorial é o método com melhor resposta, pois monitora diretamente aromas e sabores indesejáveis gerados na oxidação e como estes são percebidos pelos sentidos humanos. Esta metodologia apresenta níveis de detecção inferiores ou próximos aos níveis de detecção de métodos químicos ou instrumentais, dada a alta sensibilidade do sistema olfativo dos humanos; o ranço torna-se sensorialmente perceptível para um conteúdo lipídico peroxidado da ordem de 0,5%. De acordo com a Tabela 3, o limite de detecção na análise sensorial abrange uma faixa de 2150ppm para hidrocarbonetos até 0,00002ppm para vinil cetonas<sup>11</sup>.

Nesta metodologia, um grupo de pessoas treinadas é utilizado como instrumento de medida. Uma vez que diferentes lipídeos deverão desenvolver diferentes perfis de oxidação, o treinamento deve ser específico por produto. Aromas estranhos ao produto, chamados de *off-flavors*, vão desde nuances de óleo e peixe até grama e papelão. Na Tabela 4, são apresentados alguns produtos secundários da oxidação e as características sensoriais que os mesmos conferem aos produtos alimentícios nos quais se formam<sup>11</sup>.

**Tabela 3** - Valores de limites de detecção de odor de compostos voláteis gerados na oxidação de lipídeos.

Classes de compostos	Limite de detecção (ppm)
Hidrocarboneto	90-2150
Furano substituído	2-27
Álcool vinílico	0,5-3
1-Alceno	0,02-9
2-Alcenal	0,04-2,5
Aldeído saturado	0,04-1
Trans,trans-2,4-dienal	0,04-0,3
Dienal isolado	0,002-0,3
Cis-alcenal isolado	0,0003-0,1
Trans,cis-dienal	0,002-0,006
Vinil cetona	0,00002-0,007

**Tabela 4** - Percepção aromática de compostos voláteis gerados na oxidação de lipídeos.

Percepção de aroma	Composto responsável
Papelão	trans,trans-2,6-nonadienal
Oleoso	Aldeídos
Tinta	2-pentenal Aldeídos
Peixe	trans,cis,trans-2,4,7-decatrienol 1-octen-3-ona
Grama	trans-2-hexenal nona-2,6-dienal
Fritura	trans-trans-2,4-decadienal

### 2.6.3. Espectroscopia na região do infravermelho

A espectroscopia na região do infravermelho tem sido utilizada recentemente, principalmente aliada a ferramentas quimiométricas, em diversos estudos que avaliam adulteração e frescor de azeites, parâmetros de processo e de qualidade de óleos, como acidez, conteúdo de água, índice de peróxidos, de iodo e de epoxidação, além de monitoramento e quantificação de ácidos graxos livres<sup>51,53-54</sup>. São métodos simples e não-destrutivos, os quais requerem pouca quantidade de

amostra e que fornecem resultados de maneira rápida com diversas aplicações em análises químicas de alimentos<sup>55</sup>.

No que se refere à oxidação de lipídeos, algumas bandas características podem ser monitoradas, refletindo etapas diferentes da oxidação<sup>11,30</sup>:

- A banda de estiramento referente à ligação O-H dos hidroperóxidos, de intensidade média, pode ser observada na região de  $3400\text{-}3600\text{cm}^{-1}$ .
- A banda de estiramento da ligação C-O, de intensidade maior que a banda referente à ligação O-H, ocorre na região de  $1030\text{-}1150\text{cm}^{-1}$ . Ambas as bandas não são exclusivamente características de hidroperóxidos, podendo ser atribuídas também à função álcool em outros sistemas.
- A substituição de um átomo de hidrogênio em uma ligação dupla ou a polimerização podem ser evidenciados pelo desaparecimento de uma banda em  $3125\text{cm}^{-1}$ .
- A formação de aldeídos, cetonas ou ácidos resulta no surgimento de uma banda de estiramento referente à ligação C=O em cerca de  $1748\text{cm}^{-1}$ .
- A formação de ligações duplas conjugadas possivelmente seja atribuída às bandas nas regiões de  $1000$  e  $910\text{cm}^{-1}$ .
- A ligação O-O, característica do grupo peroxila, resulta no aparecimento de uma banda de estiramento muito fraca na região entre  $820$  e  $860\text{cm}^{-1}$ .

Todas as bandas mencionadas ocorrem na região do infravermelho médio, que começou a ser utilizada para análises quantitativas de amostras complexas após a exploração da região do infravermelho próximo. De fato, é a região mais amplamente utilizada tanto para análises qualitativas quanto para quantitativas, seja por absorção, reflexão ou emissão. Nesta região do espectro, observa-se a região denominada de “impressão digital”, de  $1200$  a  $600\text{cm}^{-1}$ ; diferenças de aparência e distribuição das bandas desta região são evidência de pequenas diferenças de estruturas e constituição de moléculas. Na região compreendida de  $3600$  a  $1250\text{cm}^{-1}$ , observam-se as frequências de grupos, cujas bandas referem-se aos grupos funcionais<sup>56</sup>.

Os alimentos, entre outras amostras sólidas de maior complexidade, podem ser avaliados com um mínimo de preparo por espectrometria no infravermelho médio utilizando os métodos de espalhamento, como a reflectância, os quais fornecem praticamente a mesma informação dos espectros de absorção. A reflectância da radiação pode ser especular, difusa, interna ou total atenuada

(*attenuated total reflection* – ATR). Na reflexão total atenuada, um feixe de radiação passa de um meio mais denso para um meio menos denso, ocorrendo reflexão. Entretanto, antes que a reflexão ocorra, o feixe acaba penetrando parcialmente no meio menos denso, sendo a profundidade de penetração dependente de fatores como o comprimento de onda da radiação incidente, índice de refração dos materiais e o ângulo do feixe incidente em relação à interface. A absorção desta radiação penetrante caracteriza o processo de atenuação da reflectância. Os espectros de reflectância total atenuada apresentam as mesmas bandas que os espectros de absorção, mas as intensidades relativas entre os mesmos variam. Nos espectros de ATR, as absorbâncias independem da espessura da amostra, uma vez que a penetração atinge apenas alguns micrômetros.

## **2.7. Análise Multivariada**

Alimentos e ingredientes alimentícios quase sempre são misturas bastante complexas quanto à sua composição e à interação entre seus componentes. Métodos clássicos para avaliação de seus constituintes requerem extensivo fracionamento, extração e derivatização prévios à caracterização e quantificação, tornando a análise dos alimentos um processo dispendioso e demorado. Ademais, muitos métodos clássicos envolvem o uso de solventes orgânicos em grande quantidade, o que se torna um problema quanto ao manuseio e descarte do ponto de vista ambiental.

Métodos espectroscópicos têm sido empregados na análise não destrutiva de alimentos, sem necessidade de tratamento prévio à análise, para a determinação quali e/ou quantitativa de seus principais componentes<sup>57</sup>. Os mesmos também têm sido empregados para a caracterização de materiais, identificação de adulteração e acompanhamento de alterações sofridas ao longo do tempo de armazenamento de insumos alimentícios<sup>51,53,58-62</sup>. Nestes casos, a quantidade de dados obtida é muito grande (da ordem de milhares de variáveis em uma única corrida analítica), o que requer técnicas para extração de informação útil, ou a maior parte desta informação coletada correrá o risco de não poder ser usada ou ainda ser mal utilizada.

De maneira geral, os laboratórios analíticos e as indústrias experimentaram um considerável avanço tecnológico nas últimas décadas no que se refere aos

instrumentais disponíveis para análises. Em primeiro, equipamentos e computadores ganharam uma interface, permitindo a digitalização dos dados analíticos. Após, tais equipamentos puderam ser incorporados na linha de processo, garantindo monitoramento instantâneo dos dados. Isso permitiu que equipamentos como espectrômetros passassem a fazer parte do trabalho de rotina, seja em laboratórios de controle de qualidade ou mesmo na produção. Estes avanços garantiram a possibilidade de observar uma grande quantidade de dados experimentais, além de maior precisão, facilidade e rapidez na obtenção de resultados de origem química. Como consequência, tais avanços ainda impulsionaram o uso de ferramentas matemáticas e estatísticas que pudessem converter grandes conjuntos de dados químicos no máximo de informação útil para o pesquisador ou analista<sup>63</sup>.

Há uma série destes métodos estatísticos que podem ser utilizados para simplificar grandes conjuntos de dados e ajudar na interpretação dos mesmos, seja pela identificação de padrões na estrutura dos dados ou na relação que pode haver entre objetos e variáveis. Tais métodos compreendem a Análise Multivariada que, para dados químicos, é uma das ferramentas que compõem a Quimiometria.

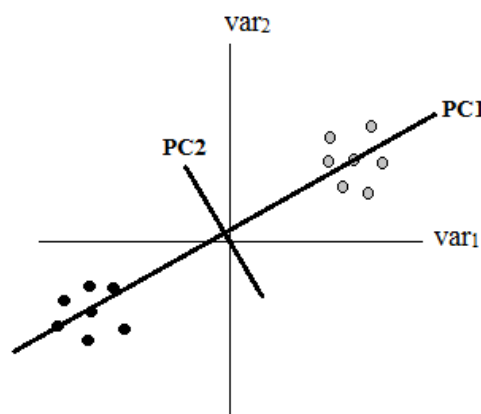
### **2.7.1. Análise de Componentes Principais - PCA**

A Análise de Componentes Principais ou PCA (da sigla em inglês para *Principal Component Analysis*) pode ser considerada a base da análise multivariada e tem diversas aplicações, como a determinação da relação entre objetos, a simplificação de informação através da redução de dimensionalidade, a detecção de *outliers* e a seleção de variáveis<sup>57,63-64</sup>. De maneira geral, é utilizada em etapas iniciais da análise, de forma exploratória, com o objetivo de visualizar a estrutura dos dados. Pode ser aplicada a qualquer matriz de dados, devidamente organizada e propriamente transformada e escalada.

A Análise de Componentes Principais se trata de um método de projeção de dados multivariados em um espaço de menor dimensão, onde variáveis que são correlacionadas, ou seja, que forneçam informações semelhantes, são combinadas linearmente para originar as variáveis de um novo espaço, denominadas componentes principais. Há, então, uma compressão de dados, sem que as relações

entre as amostras sejam afetadas, já que as combinações são lineares. De certa forma, há perda de informação neste processo, mas que é compensada por melhor compreensão de conjuntos de dados tão grandes que parecem (e são) difíceis de racionalizar.

Em termos geométricos, o método trata da busca por linhas e planos que abranjam a maior quantidade de informação do conjunto original de dados ou pontos, os quais se distribuem em um determinado espaço de  $J$  dimensões, como apresentado na Figura 25<sup>63</sup>. As componentes principais são ortogonais entre si e não correlacionadas, ou seja, a informação contida em uma componente principal não está presente na outra. Desta forma, a primeira componente principal (PC1) é definida pela direção que descreve a máxima variância dos dados originais; a segunda componente principal (PC2) tem a direção de máxima variância dos dados no subespaço ortogonal à PC1.

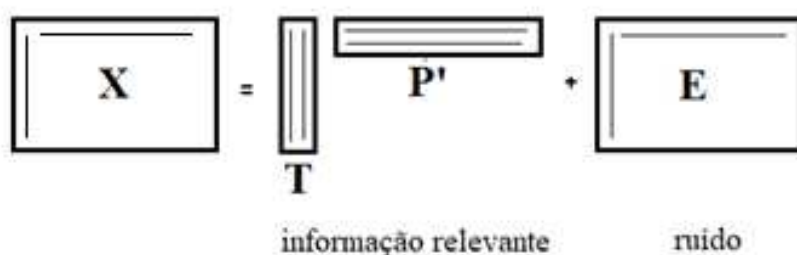


**Figura 25** – Representação geométrica de dois grupos de amostras no sistema original, definido pelas variáveis  $var1$  e  $var2$ , e as linhas que abrangem a maior quantidade de informação acerca dos objetos, chamadas de componentes principais.

Em termos matriciais, a decomposição de uma dada tabela ou matriz de dados  $\mathbf{X}$  é feita em termos do produto de duas outras matrizes  $\mathbf{T}$  e  $\mathbf{P}'$  ( $\mathbf{P}$  transposta), como representado na Figura 26. As matrizes  $\mathbf{T}$  e  $\mathbf{P}$  capturam os padrões essenciais nos dados de  $\mathbf{X}$ , que reúne os dados de  $I$  objetos (linhas) e  $J$  variáveis (colunas) medidas para cada um deles. A matriz  $\mathbf{T}$  (ou matriz de escores) contém informação acerca da relação entre os objetos ou amostras, já que representam as novas coordenadas de cada objeto no novo sistema de eixos das componentes principais. Já a matriz  $\mathbf{P}$  (ou matriz de pesos) indica a relação entre as variáveis e define a direção dos novos eixos; cada coluna de  $\mathbf{P}$  contém informação da contribuição de cada variável original na formação das componentes principais. Os escores  $\mathbf{t}$  são

combinações lineares dos dados originais com coeficientes  $\mathbf{p}'$ , da mesma forma que os pesos  $\mathbf{p}'$  são combinações lineares dos dados com os coeficientes  $\mathbf{t}$ ; desta forma, a análise de componentes principais consiste em um modelamento bilinear<sup>64</sup>.

O ajuste de uma componente principal a um dado conjunto de pontos é um processo similar ao de quadrados mínimos, no qual se minimiza não a soma dos quadrados das distâncias verticais, mas sim a soma dos quadrados das distâncias ortogonais. Os desvios entre as projeções e as coordenadas originais compõem a matriz de resíduos  $\mathbf{E}$ , representada na Figura 26, que é composta de informação irrelevante ou aleatória. A decomposição da matriz  $\mathbf{X}$  representada na Figura 26 pode ser obtida por diferentes métodos de cálculo, como a Diagonalização da Matriz de Variância, a Decomposição por Valores Singulares (SVD da sigla em inglês para *Singular Value Decomposition*) ou pelo Algoritmo NIPALS (sigla em inglês para *Nonlinear Estimation by Iterative Partial Least Squares*)<sup>63</sup>.



**Figura 26** – Representação gráfica da análise de componentes principais.

O número de fatores necessários para descrever um dado sistema é chamado posto químico  $Q$ , cuja interpretação química é o número de espécies distintas presente nas amostras. Em termos matriciais, o posto de uma matriz é o número de vetores linearmente independentes que compõem uma matriz.

### 2.7.2. Pré-tratamento de dados

Os resultados de uma análise de componentes principais (e de outros modelos multivariados) dependem da matriz de dados e, por isso, qualquer tipo de pré-tratamento, seja uma transformação ou pré-processamento de dados, deve ser

explicitamente indicado<sup>64</sup>. Após organizados os dados originais, procede-se com o pré-tratamento de dados para remover variações indesejáveis que podem influenciar os resultados previamente à análise multivariada. Entretanto, deve-se compreender o que cada tipo de pré-tratamento pode ocasionar nos dados, os quais podem ser distorcidos, comprometidos ou até mesmo inutilizados a depender do procedimento empregado.

Em linhas gerais, a transformação de dados é aplicada às linhas da matriz **X**, ou seja, às amostras, e tem como objetivo remover ou reduzir variações sistemáticas ou aleatórias no sinal medido, além de minimizar informações superpostas de espécies de interesse. O pré-processamento de dados é aplicado às colunas da matriz **X**, ou seja, às variáveis; os dados podem ser centrados na média ou escalonados. Centrar os dados na média significa mover o sistema de coordenadas para o centro dos dados<sup>63</sup>, prevenindo que pontos mais distantes do centro dos dados tenham influência diferente daqueles mais próximos. O escalamento é o ajuste do conjunto de dados de modo a igualar a variância de cada variável, ou seja, sua influência sobre o conjunto de dados<sup>64</sup>; as posições relativas dos dados são alteradas, mas a posição do centroide permanece a mesma.

Muitas transformações já são aplicadas automaticamente durante a aquisição de dados, devido ao interfaceamento de instrumentos analíticos a computadores. Outras devem ser escolhidas com cautela e aplicadas com auxílio de softwares utilizados para tratamento de dados.

O sinal medido em um espectrômetro, por exemplo, é formado pelo sinal chamado de verdadeiro mais o ruído aleatório, que pode ser reduzido, aumentando a razão sinal/ruído.

Já o sinal verdadeiro, por sua vez, contém informação relevante, mas também informação indesejada. Este sinal pode apresentar algumas características particulares, a depender da técnica analítica utilizada e das características das amostras, entre outros. Por exemplo, deslocamentos constantes da linha de base são usualmente observados como decorrência de instrumentos e amostras. Já os deslocamentos variáveis de linha de base, ou seja, de inclinação, são comumente observados em espectros de refletância difusa na região próxima ou média do infravermelho. Para estes casos, as derivadas (primeira ou segunda) são geralmente empregadas, resultando em alinhamento dos espectros como um todo em relação à linha de base, além de melhora de resolução de picos parcialmente sobrepostos.



Apesar de preservada a relação entre a área de um pico do espectro e a concentração, os sinais dos espectros derivados são significativamente menos intensos e pode haver também redução da relação sinal/ruído<sup>63,p.61</sup>.

Outra transformação que pode ser aplicada a dados de espectroscopia e que, ao contrário das derivadas, pode resultar em aumento da relação sinal/ruído é o alisamento pela média. Neste, uma faixa ou janela do espectro, com número ímpar de variáveis, é definida; calcula-se a média das intensidades do sinal analítico dentro deste intervalo, que é então atribuída ao centro da janela. Este procedimento é repetido ao longo de todo o espectro, resultando na compressão de dados e redução da componente aleatória. O aumento da janela deve reduzir o ruído; entretanto, janelas muito amplas podem distorcer o formato original do espectro. Desta forma, a definição do tamanho da janela deve ser iniciada com uma abertura pequena, que será aumentada gradativamente, monitorando a abertura e o formato de picos estreitos do espectro original, os quais devem sofrer maior impacto com o tipo de pré-processamento<sup>63,p.48</sup>.

Outro tipo de método de alisamento amplamente aplicado em espectroscopia e que pode ser utilizado para aumentar a relação sinal/ruído é aquele com filtros de Fourier. Espectrômetros com transformada de Fourier registram simultaneamente a informação de absorção de todos os comprimentos de onda emitidos por uma fonte de luz composta na região do infravermelho. A informação bruta determinada, que corresponde a um espectro no domínio da frequência, é então processada matematicamente e convertida ao espectro tal qual o conhecemos, no domínio físico (como tempo ou comprimento de onda)<sup>63,p.57</sup>.

O logaritmo também é uma transformação amplamente utilizada para a linearização de dados espectroscópicos. A quantidade de luz absorvida por uma dada amostra ( $I/I_0$ ), onde  $I_0$  é a intensidade inicial incidente e  $I$  é a intensidade que deixa a amostra, é proporcional à concentração de suas espécies, de acordo com a lei de *Beer-Lambert* (equação 4), onde  $A_\lambda$  é a absorbância no comprimento de onda  $\lambda$ ,  $a_\lambda$  é o respectivo coeficiente de absortividade molar,  $l$  é o caminho ótico e  $c$  é a concentração. A absorbância, por sua vez, apresenta relação logarítmica com a transmitância  $T$  e a reflectância  $R$  (equações 5 e 6); a transformação logarítmica destas grandezas fornece uma relação linear entre a intensidade de luz  $I$  e a concentração<sup>63,p.68</sup>.

$$A_\lambda = \alpha_\lambda lc \quad (4)$$

$$A_\lambda = -\log T_\lambda = -(\log I/I_0)_\lambda \quad (5)$$

$$A_\lambda = -\log R_\lambda = -(\log I/I_0)_\lambda \quad (6)$$

Por fim, há outros tipos de transformações que corrigem não apenas os efeitos aditivos mencionados até este ponto, mas também os efeitos multiplicativos de absorvância. Tais efeitos são provenientes de causas físicas como mudança no caminho ótico dada a multiplicidade de interfaces de espalhamento da luz entre partículas da amostra, variações de temperatura e pressão, sensibilidade do detector e amplificador, além de diferenças de tamanho e forma de partículas sólidas, emulsões e dispersões. Os efeitos multiplicativos não estão relacionados à composição da amostra, mas são dependentes do comprimento de onda e devem ser removidos. A transformação MSC (ou correção multiplicativa de sinal) e a padronização normal de sinal SNV corrigem ambas os efeitos aditivos e multiplicativos. No caso da MSC, cada espectro  $i$  é reescrito como uma função linear do espectro médio pela equação 7, sendo  $a_i$  e  $b_i$  constantes para todos os comprimentos de onda da amostra  $i$ . No método SNV,  $a_i$  é o valor médio das intensidades do  $i$ -ésimo espectro,  $\bar{x}_i$ , e  $b_i$  é o desvio-padrão,  $s_i$ , destas intensidades<sup>63,p.74</sup>.

$$x_i = a_i \mathbf{1} + b_i x_m + e_i \quad (7)$$

### 2.7.3. Métodos de regressão multivariados

Finda a análise exploratória realizada por meio da análise de componentes principais, os dados podem ainda ser modelados para conversão de dados de novas amostras em informação útil, seja qualitativa (classificação) como quantitativamente (calibração). No caso da calibração, o conjunto de dados da matriz  $\mathbf{X}$ , agora chamados de variáveis preditoras ou independentes, deve ser relacionado a um novo bloco ou matriz de dados ( $\mathbf{Y}$ ), composto das propriedades de interesse que se queira medir,

como o teor de proteínas, umidade, carboidratos e gordura, por exemplo. Se existir alguma relação por uma lei físico-química entre os dois blocos, deverá existir um modelo matemático empírico  $f(x)$  que possibilite quantificar essa correlação<sup>55</sup>.

A composição química de alimentos pode ser predita através de espectros de reflectância difusa ou de transmitância, dadas as propriedades de absorção específicas de seus componentes. Assim como é feito para métodos de calibração univariada, ou seja, por meio de regressão linear, modelos de calibração multivariados também podem ser construídos a partir de um conjunto de amostras. Tal conjunto deve fornecer informações quantitativas em alta quantidade e qualidade, representativa das demais amostras que possam vir a ser avaliadas na sequência<sup>63</sup>. Os modelos resultantes, devidamente validados, tornam-se ferramentas muito interessantes na análise de rotina, pois as medições espectroscópicas são mais rápidas e menos trabalhosas, levando a uma redução interessante de tempo e de custo em comparação com as análises tradicionais, além de evitar o manuseio e descarte de reagentes e subprodutos.

Métodos de regressão multivariados requerem o uso de dois conjuntos distintos de amostras: o de calibração e o de validação externa. O conjunto de calibração, composto pelas amostras padrão, deve ser bastante representativo, englobando as fontes de variação que as amostras de validação externa possam ter, como concentração de componentes, pH, interferentes e outros desvios. As amostras devem ser misturas preparadas a partir de substâncias puras ou padrões certificados; entretanto, o preparo de amostras pode não ser algo viável ou de fácil obtenção em muitos casos, sendo necessário trabalhar com amostras complexas provenientes de processos industriais, por exemplo. As propriedades de interesse destas amostras devem ser determinadas por algum método analítico de referência. A precisão dos valores de referência, por sua vez, consiste na principal fonte de erro na construção do modelo, o que pode ser melhorado com o uso de médias de réplicas. Dois ou mais espectros de cada amostra do conjunto de calibração também devem ser utilizados.

O conjunto de calibração, além de sua representatividade, possui recomendações quanto a seu tamanho (ou número de amostras). Para sistemas simples, o número mínimo de amostras  $n$  depende do número de componentes  $c$ , sendo  $n = 2c + 2$ . No caso de misturas complexas, o número mínimo de amostras depende do posto químico  $Q$ . Quando  $Q \leq 3$ , 24 amostras são necessárias, no mínimo; quando  $Q > 3$ , o número mínimo de amostras é de  $6(Q+1)$ <sup>63</sup>.

O uso contínuo de um modelo de calibração é permitido quando o mesmo é periódica e frequentemente verificado, ou seja, quando se verifica que seu uso permanece adequado ao longo do tempo, mesmo com a deterioração normal dos equipamentos ou possíveis mudanças de processo e de matérias-primas. Sempre que necessário, o modelo pode e deve ser atualizado com inclusão de novas amostras, o que o torna inclusive mais robusto.

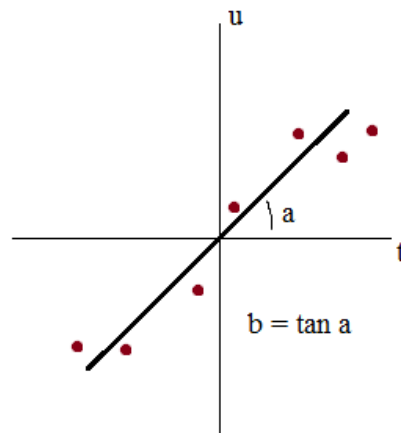
#### 2.7.4. Regressão pelo Método dos Quadrados Mínimos Parciais - PLS

Dentre os métodos de regressão disponíveis, o mais popular em Quimiometria é o PLS (da sigla em inglês para *Partial Least Squares*)<sup>65</sup>, com grande aplicação em espectroscopia na região do infravermelho médio e próximo. Assim como no método PCA, há uma aproximação do espaço das medidas originais por um de dimensão reduzida, porém com alguma restrição imposta nesta decomposição, direcionando-a para uma solução cujo alvo é a propriedade de interesse. Desta forma, a informação da propriedade de interesse é incluída no cálculo das componentes principais, agora chamadas de variáveis latentes. De maneira simplificada, a matriz **X** e o vetor **y** são decompostos, conforme representação da Figura 27. O vetor de regressão **u** é então estimado pelo método de quadrados mínimos, como representado na Figura 28, mas projetando o vetor de regressão no espaço-coluna de **X**, de acordo com a equação 8, onde **b** corresponde às estimativas dos coeficientes de regressão para *i* fatores<sup>65</sup>.

$$\begin{array}{c}
 \boxed{\mathbf{X}} = \underbrace{\boxed{\phantom{000}}}_{\mathbf{T}} \overbrace{\boxed{\phantom{000}}^{\mathbf{P}'}} + \boxed{\mathbf{E}} \\
 \\
 \underbrace{\boxed{\phantom{000}}}_{\mathbf{y}} = \underbrace{\boxed{\phantom{000}}}_{\mathbf{u}} \times \underbrace{\boxed{\phantom{000}}}_{\mathbf{f}}
 \end{array}$$

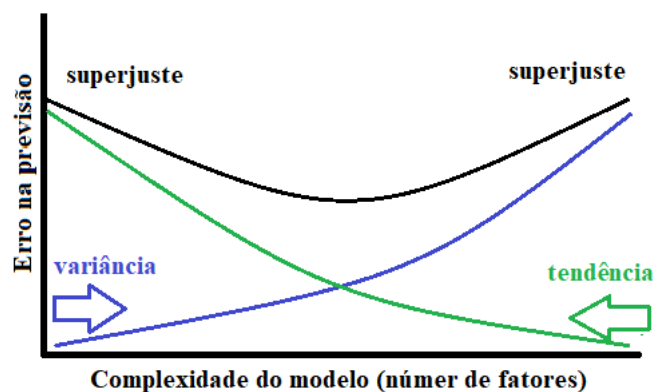
**Figura 27** – Representação gráfica da regressão pelo método dos quadrados mínimos parciais.

$$u_i = b_i t_i \quad (8)$$



**Figura 28** – Regressão linear de  $u$  contra  $t$  para dados centrados na média.

O número de fatores utilizados em um modelo PLS é um parâmetro bastante importante que deve ser otimizado, interferindo diretamente no balanço entre o ajuste e a previsão. A redução no número de componentes resulta em um modelo de menor complexidade, porém, mais tendencioso. Tendência é o nome que se dá ao erro sistemático gerado pelas informações de  $\mathbf{X}$  que não foram modeladas. Em contrapartida, o aumento no número de componentes causa um superajuste do modelo, com introdução de informação excessiva. Já um número ótimo de fatores garante a incorporação de informação relevante ao modelo, com aumento da variância explicada e a diminuição da tendência, conforme representado na Figura 29<sup>63</sup>.



**Figura 29** – Comportamento da variância e da tendência no modelo PLS, indicando o ponto de intersecção onde o superajuste é o mínimo.

Posteriormente à calibração, prossegue-se com a validação, utilizando-se um conjunto de amostras diferente daquele utilizado previamente. Para este, **X** e **y** também devem ser previamente conhecidos. Geralmente, este conjunto de amostras apresenta cerca de 30% do tamanho do conjunto de calibração. A validação é avaliada, principalmente, em relação aos resíduos (diferença entre o valor medido e o valor previsto), os quais devem ser pequenos, aleatórios, não correlacionados e seguir uma distribuição normal. Os resíduos também fornecem informação para a definição do número ótimo de fatores utilizados, sendo que diversos parâmetros podem ser calculados como<sup>63</sup>:

- Soma quadrática dos resíduos (ou *predicted residual error sum of squares* – PRESS), onde  $y_p$  é a resposta medida e  $\hat{y}_p$  é a resposta calculada pelo modelo:

$$PRESS = \sum_{p=1}^P (y_p - \hat{y}_p)^2 \quad (9)$$

- Raiz da média quadrática dos resíduos (ou *root mean squared error of prediction* – RMSEP), onde P é o número de amostras do conjunto de validação:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{PRESS}{P}} \quad (10)$$

O número de parâmetros para o qual o valor de PRESS ou RMSEP é o menor é então adotado para definição do modelo de regressão.

Na prática, costuma-se definir o número de variáveis latentes através da validação interna cruzada, procedimento no qual exclui-se a *i*-ésima amostra do conjunto de calibração, constrói-se o modelo sem esta e estima-se a propriedade de interesse para ela. O processo é repetido até que todas as amostras sejam retiradas do modelo e previstas, para vários números de variáveis latentes, calculando-se as medidas de erros já citadas. As equações 9 e 10 são então reescritas como 11 e 12, onde *I* é o número de amostras usadas na validação interna cruzada. O valor de RMSECV é um parâmetro que pode ser usado para avaliação da capacidade de previsão do modelo.

$$PRESS_{val} = \sum_{i=1}^I (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (11)$$

$$RMSECV = \sqrt{\frac{PRESS_{val}}{I}} \quad (12)$$

Além destas, outra figura de mérito que pode também ser utilizada é o erro padrão de calibração SEC (do inglês *Standard Error of Calibration*), definido pela equação 13. Neste caso, os valores da propriedade de interesse são estimados usando o modelo de regressão construído a partir de todas as amostras do conjunto de calibração e o resultado obtido pode diferir significativamente do valor de RMSEV para um conjunto pequeno de amostras.

$$SEC = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (y_i - \hat{y}_i)^2}{I - A - 1}} \quad (13)$$

Por fim, a capacidade preditiva de um dado modelo pode ser melhorada utilizando-se um conjunto selecionado de variáveis, mais representativas do problema químico em questão. Ademais, a seleção de variáveis faz o modelo mais robusto, ou seja, uma amostra que possa apresentar algum interferente que não foi avaliado durante a calibração não deverá afetar o poder preditivo desse modelo. Em espectroscopia, uma seleção de variáveis trata-se da definição das regiões espectrais de maior interesse para o problema químico, ou seja, com maior correlação com a variável dependente ou propriedade de interesse.

### 3. OBJETIVOS

Avaliar a estabilidade à oxidação de uma blenda de óleos vegetais microencapsulada pelo processo de *spray-drying*, com composição de ácidos graxos previamente definida, utilizando três diferentes antioxidantes de “rótulo limpo” isolados e em combinação, a fim de se determinar o tratamento antioxidante mais eficiente. Para isto, as amostras com combinações dos antioxidantes  $\alpha$ -tocoferol, extrato de alecrim e palmitato de ascobila foram preparadas segundo um planejamento experimental fatorial  $2^3$ . Os valores de índice de peróxidos de cada tratamento antioxidante foram determinados periodicamente, acompanhando assim o período de indução e o início da propagação do processo de rancidez oxidativo. Foi definido, então, o melhor tratamento antioxidante para o sistema sob estudo.

Avaliar técnicas alternativas ao método clássico para a determinação do índice peróxidos, como a determinação da estabilidade oxidativa e a espectroscopia na região do infravermelho, as quais poderiam ser mais facilmente aplicáveis no desenvolvimento e no controle de qualidade dos processadores de ingredientes funcionais e alimentos.

Aplicar e otimizar modelos quimiométricos para auxiliar no controle de qualidade de óleos microencapsulados.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Equipamentos**

- a. Cromatógrafo de fase líquida Perkin Elmer Series 2000 equipado com bomba isocrática Perkin Elmer 250 e detector de fluorescência LC240 Perkin Elmer;
- b. Sistema de secagem por atomização escala piloto;
- c. Homogeneizador de pistões Alitec;
- d. Balança termogravimétrica Ohaus, modelo MB25;
- e. Medidor de atividade de água Decagon, modelo 4TE;
- f. Analisador de tamanho de partícula por difração de laser a laser Malvern, modelo Mastersizer 2000;
- g. Câmara climática Quimis, modelo Q315C;
- h. Agitador magnético Fisatom, modelo 753a;
- i. Balança analítica Ohaus, modelo Adventurer;
- j. Medidor de estabilidade Oxidativa Anton Paar, modelo RapidOxy 100;
- k. Espectrofotômetro no infravermelho com Transformada de Fourier Agilent, modelo Cary 630 FTIR, equipado com acessório de reflectância total atenuada (ATR).

### **4.2. Materiais e reagentes**

- a. Xarope de glucose grau alimentício;
- b. Caseinato de sódio grau alimentício;
- c. Fosfato monossódico grau alimentício;
- d. Óleo de soja refinado Liza, lote 176-A, Fabricação: 04/02/16, Validade de 30 dias após a fabricação;
- e. Óleo de canola refinado Liza, lote 177-A, Fabricação: 04/02/16, Validade de 30 dias após a fabricação;

- f. Extrato de alecrim Naturex (5% de princípio ativo);
- g. Palmitato de ascorbila DSM (pureza mínima de 97%);
- h.  $\alpha$ -Tocoferol DSM (pureza mínima de 97%);
- i. Ácido acético grau analítico, marca Synth;
- j. Clorofórmio grau analítico, marca Synth;
- k. Iodeto de potássio grau analítico, marca Synth;
- l. Tiosulfato de sódio grau analítico, marca Synth;
- m. Amido grau analítico, marca Dinâmica;
- n. Papel de filtro faixa preta.

#### **4.3. Definição da matriz de amostra para estudo**

Os antioxidantes palmitato de ascorbila, extrato de alecrim e  $\alpha$ -tocoferol foram selecionados para o estudo por consistirem em opções comercialmente disponíveis e viáveis de aditivos, de fácil obtenção e com grande interesse por parte da indústria de alimentos. Para estudo do efeito antioxidante destes aditivos, uma blenda de óleos vegetais foi definida a partir da combinação dos óleos de soja e de canola, com base nos perfis de ácidos graxos individuais fornecidos nos certificados de análises e apresentados na Tabela 5, os quais foram selecionados por apresentarem um alto teor de ácidos graxos insaturados entre as opções de óleos vegetais de grau alimentício comercialmente disponíveis. Definiu-se a proporção de 40% de óleo de canola e 60% de óleo de soja de maneira que a composição final apresentasse alto grau de ácidos graxos poli-insaturados. Tal blenda de óleos foi definida como material a ser microencapsulado (recheio), consistindo em 50% em massa das cápsulas obtidas pelo processo de secagem por atomização. Para completar a fórmula das cápsulas, adotou-se uma formulação padrão para secagem por atomização usualmente utilizada no centro de Pesquisa & Desenvolvimento da Kerry Brasil, que consiste em uma mistura de xarope de glucose (agente encapsulante), caseinato de sódio (emulsificante), fosfato monossódico (regulador de acidez) e água, nas proporções e porcentagens de sólidos indicadas na Tabela 6.

**Tabela 5** - Perfis de ácidos graxos dos óleos de canola e de soja, os quais foram informados nos certificados de análises emitidos pelo fabricante.

Componente	Óleo de canola (%)	Óleo de soja (%)
<b>C14:0 Mirístico</b>	0,1	0,1
<b>C16:0 Palmítico</b>	5,5	11,0
<b>C16:1 Palmitolêico</b>	0,3	0,1
<b>C18:0 Esteárico</b>	2,6	3,9
<b>C18:1 Olêico – cis</b>	58,8	25,7
<b>C18:2 Linolêico – cis (<math>\omega</math>6)</b>	23,0	51,5
<b>C18:3 Linolênico – cis (<math>\omega</math>3)</b>	7,8	5,8
<b>C20:0 Araquídico</b>	0,3	0,3
<b>C20:1 Gadolêico</b>	0,2	0,2
<b>C22:0 Behênico</b>	0,4	0,5
<b>SFA</b>	9,0	15,9
<b>MUFA</b>	59,3	26,0
<b>PUFA</b>	30,8	57,3
<b><math>\omega</math>6:<math>\omega</math>3</b>	3:1	9:1

**Tabela 6** - Porcentagem de sólidos dos componentes do material micro encapsulado que não são lipídeos e sua composição no material encapsulado final.

Componente	Sólidos (%)	Composição no material encapsulado (%)
<b>Xarope de glucose</b>	78	42
<b>Caseinato de sódio</b>	95	5
<b>Fosfato dissódico</b>	50	0,14
<b>Água</b>	0	3

A blenda de óleos utilizada também foi caracterizada quanto ao conteúdo de tocoferóis, pois estes são antioxidantes naturalmente presentes em óleos de origem vegetal. Para esta determinação, o método oficial da Associação Americana dos Químicos de Óleos (AOCS da sigla em inglês para *American Oil Chemist's Society*), AOCS Ce 8-89, foi empregado.

#### 4.4. Delineamento de planejamento fatorial completo para estudo da atividade dos diferentes antioxidantes

As dosagens dos antioxidantes selecionados foram definidas com base na RDC160 de 2017<sup>66</sup>, que dispõe sobre os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em fórmulas para nutrição enteral. Nessa resolução, os limites máximos de  $\alpha$ -tocoferol e palmitato de ascorbila em fórmulas para nutrição enteral prontas para o consumo são estabelecidos como 0,003 e 0,01g/100mL sobre o material lipídico, respectivamente. Na utilização simultânea dos dois aditivos, a soma não deve ultrapassar o limite máximo estabelecido para o aditivo permitido em maior quantidade. No caso do extrato de alecrim, o mesmo pode ser declarado como aromatizante e sua dosagem é estabelecida como *quantum satis*, ou seja, quanto baste.

Desta forma, delineou-se o estudo por meio de um planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup>, respeitando a soma máxima permitida de  $\alpha$ -tocoferol e palmitato de ascorbila para cada teste a ser elaborado, como consta na Tabela 7. Para cada teste descrito, a massa de antioxidante adicionada foi compensada pela retirada de massa de xarope de glucose. Os testes foram produzidos todos em um único dia, em ordem aleatória (1, 7, 2, 6, 5, 8, 3 e 4).

**Tabela 7** - Matriz de planejamento fatorial completo 2<sup>3</sup> para obtenção de fórmulas com diferentes tratamentos antioxidantes.

Fatores		(-)	(+)
1 – Palmitato de ascorbila		0	0,007%
2 – Extrato de alecrim		0	0,01%
3 – $\alpha$ -tocoferol		0	0,003%
Teste	Fator 1	Fator 2	Fator 3
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

#### **4.5. Obtenção das amostras pelo processo de secagem por atomização**

Todos os testes provenientes do planejamento fatorial completo para uso de antioxidantes, aplicados à fórmula base discutida anteriormente, foram submetidos ao processo de microencapsulação com utilização de um secador por atomização em escala piloto, pertencente ao centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Kerry do Brasil, em Campinas. O processo de secagem por atomização adotado, assim como as etapas prévias de mistura e homogeneização, consiste em um processo usualmente empregado na planta piloto do centro de Pesquisa & Desenvolvimento da Kerry Campinas; o processo foi aplicado para a obtenção de todas as amostras, sem qualquer otimização para a matriz de estudo previamente definida.

Na primeira etapa do processo, todas as matérias-primas foram adicionadas em um tanque de mistura com uma quantidade excedente de água (equivalente a 90% da massa total de matérias-primas). A temperatura do tanque foi elevada à 70°C, mantendo-se a agitação do sistema por 20 minutos.

A mistura foi então transferida para um homogeneizador de pistões da marca Alitec (dois estágios, pressão média de 150/50bar e uma única passagem), garantindo a emulsificação e homogeneização do sistema. Uma bomba pneumática foi utilizada para a transferência da mistura homogeneizada para o secador, onde o produto foi então pulverizado dentro da câmara de secagem com correntes de ar quente à 178°C. A água foi evaporada e um pó fino foi recuperado na parte inferior do secador, o qual consiste nos sólidos e solúveis contidos na emulsão inicial.

#### **4.6. Avaliação dos pós obtidos pelo processo de secagem por atomização**

As amostras de pó obtidas foram caracterizadas quanto ao teor de umidade, atividade de água e distribuição do tamanho de partículas da emulsão original. O teor de umidade foi determinado com o uso de balança termogravimétrica, no modo automático e à temperatura de 105°C; alíquotas de  $2,5 \pm 0,001\text{g}$  foram utilizadas para esta determinação, em duplicata, por amostra. A atividade de água foi

determinada com auxílio de um medidor de atividade de água, também em duplicata. Por fim, a distribuição do tamanho de partículas da emulsão foi determinada utilizando-se um analisador de tamanho de partículas por difração a laser no modo úmido, empregando água como meio dispersante e adotando o índice de refração da glucose, igual a 1,447. Nesta técnica, um feixe de laser interage com as partículas dispersas e é espalhado em diferentes ângulos, de acordo com o tamanho da partícula (partículas grandes difratam a luz em pequenos ângulos em relação ao feixe de laser, enquanto as partículas pequenas espalham a luz em ângulos grandes). Produz-se, então, a distribuição de tamanho de partículas das menores para as maiores dimensões. Neste caso, assume-se formato esférico para o cálculo do diâmetro das partículas<sup>67</sup>.

#### 4.7. Armazenamento das amostras

As amostras obtidas foram fracionadas em pequenos sacos de polietileno com cerca de 70g cada, os quais foram distribuídos em três diferentes condições de armazenamento:

- **Controle:** equivalente à -20°C, em câmara fria, referente ao produto recém-produzido, período inicial ou tempo zero, assumindo que a velocidade da oxidação é aproximadamente nula nesta condição.
- **Ambiente (AMB):** equivalente à 27°C, que é a temperatura média observada no laboratório onde as amostras ficaram armazenadas, com exposição à luz fluorescente por cerca de 9 horas/dia.
- **Acelerada (ACL):** equivalente à 37°C, equivalente à temperatura ambiente mais 10°C, com exposição à luz fluorescente por cerca de 9 horas/dia.

As amostras da condição controle foram avaliadas uma única vez; as amostras armazenadas nas condições ambiente e acelerada foram retiradas de suas respectivas condições de armazenamento com 20, 40, 60, 80 e 100 dias, sendo mantidas na condição controle para sua preservação até a data da análise.

## **4.8. Avaliação da estabilidade oxidativa**

### **4.8.1. Determinação do índice de peróxidos**

Adotou-se o método referência AOAC 965.33 para a determinação do índice de peróxidos, a qual foram adicionadas etapas prévias de extração do recheio das cápsulas e evaporação parcial do solvente.

Para a extração a frio do material lipídico encapsulado, 5g de amostra foram pesados e dispersos em 50mL de éter de petróleo. A extração foi realizada em temperatura ambiente (cerca de 27°C), mantendo o sistema fechado e sob agitação por duas horas (Erlenmeyer de 150mL com tampa). O material foi então filtrado em béquer de 250mL previamente pesado e o solvente foi seco *overnight*, ao abrigo da luz, sob pressão atmosférica e em contato com o ar. A massa de extrato foi então determinada pela nova pesagem do béquer (cerca de 1,5g de material lipídico foi extraído segundo as condições adotadas).

O extrato resultante foi diluído em 30mL de uma mistura de ácido acético:clorofórmio (3:2 V:V) no mesmo béquer de secagem; adicionou-se 0,5mL de solução saturada de iodeto de potássio e manteve-se o sistema ao abrigo da luz por 1 minuto, antes de prosseguir com a titulação. Foram adicionados também 30mL de água fervida e 0,5mL de solução indicadora de amido a 1% (m/V). Titulou-se então com solução de tiosulfato de sódio  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,002N padronizada até descoloração total da mistura. Uma titulação com o branco também foi realizada. As titulações foram realizadas em duplicata por amostra, no mínimo.

### **4.8.2. Índice de estabilidade oxidativa**

A estabilidade oxidativa dos testes também foi determinada com auxílio do equipamento RapidOxy, que acelera o processo oxidativo e se baseia na norma ASTM D8206, que estabelece um método padrão rápido e em pequena escala para medição

da estabilidade à oxidação de graxas lubrificantes<sup>68</sup>. Uma pequena quantidade das amostras armazenadas na condição controle (cerca de 2g), sem tratamento prévio qualquer, foi colocada em uma célula de teste fechada, carregada com 700kPa de oxigênio. A temperatura foi elevada e mantida à 140°C, monitorando-se o consumo de oxigênio pela queda de pressão dentro da célula. Registrou-se, então, o tempo necessário para o consumo de 10% da pressão inicial de oxigênio, análogo ao índice de estabilidade oxidativa (*Oxidative Stability Index* OSI) obtido em outras técnicas de análise. Quanto maior o resultado obtido, menor o consumo de oxigênio e, portanto, menor o avanço da auto-oxidação e mais longa a etapa de iniciação da oxidação. Os resultados obtidos indicam a estabilidade relativa dos diferentes tratamentos com antioxidantes, mas não permitem calcular o tempo real de vida de prateleira do produto (ou *shelf life*), dado que seu armazenamento geralmente ocorre a temperaturas muito inferiores aos 140°C adotados na análise.

#### **4.8.3. Análise espectral: determinação dos espectros na região do infravermelho médio**

Os espectros na região do infravermelho médio (4000 a 400cm<sup>-1</sup>, com resolução de 2cm<sup>-1</sup>) foram adquiridos empregando a técnica de Reflectância Total Atenuada (ATR). As amostras foram avaliadas tal qual, ou seja, sem qualquer preparo prévio, obtendo de dois a três espectros por amostra.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Obtenção das blendas de óleos microencapsuladas

De acordo com os perfis de ácidos graxos dos óleos de canola e de soja utilizados no estudo, calculou-se a proporção de ácidos graxos resultante da blenda que foi encapsulada, obtendo teor final de ácidos graxos poli-insaturados igual a 46,7% e perfil de ácidos graxos de acordo com a Tabela 8.

Antes de ser encapsulada, a blenda de óleos também foi avaliada quanto ao teor de tocoferóis, os quais já são naturalmente encontrados em alguns tipos de óleos vegetais, como é o caso do óleo de soja. De acordo com os resultados determinados (Tabela 9), a blenda final possuía grande concentração do isômero alfa, que foi justamente um dos antioxidantes selecionados para estudo. Sendo assim, o incremento de  $\alpha$ -tocoferol foi de apenas 13% em relação à sua própria ocorrência natural na blenda obtida.

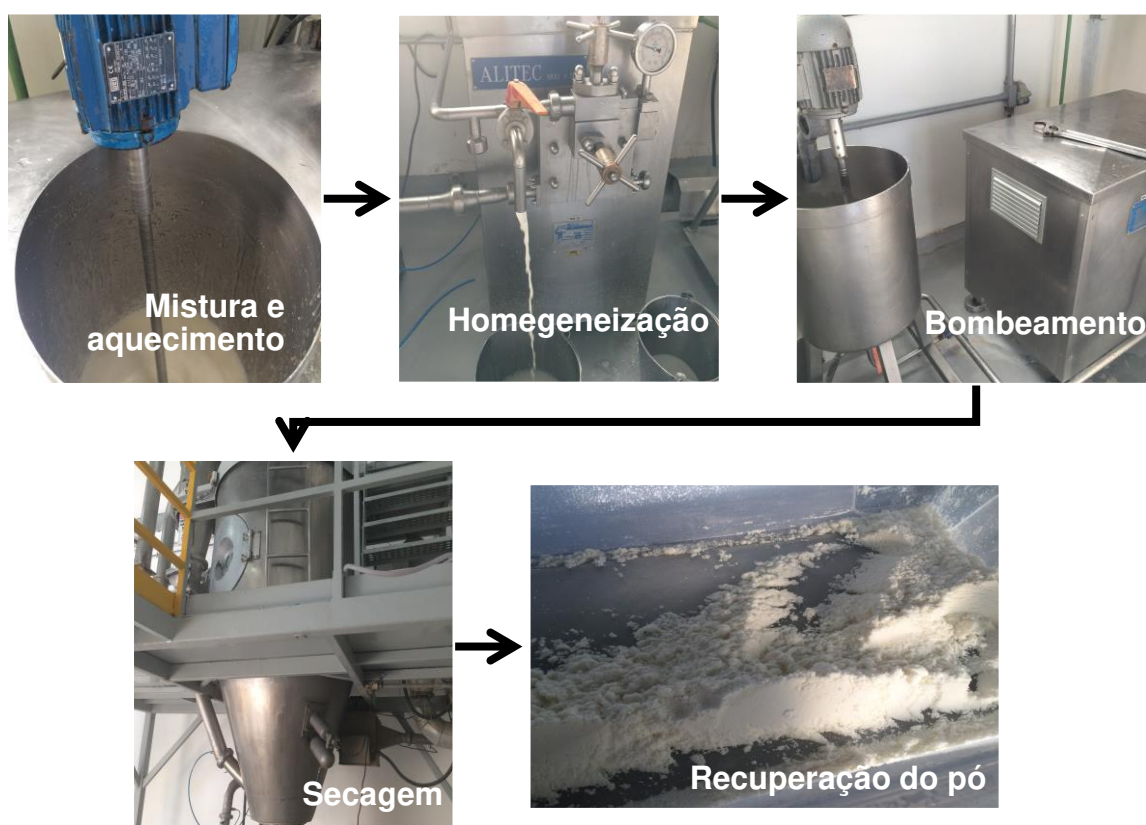
**Tabela 8** - Perfil de ácidos graxos da blenda de óleos vegetais encapsulada.

Componente	Blenda de óleos (%)	Material encapsulado (%)
<b>C14:0 Mirístico</b>	0,1	0,05
<b>C16:0 Palmítico</b>	8,8	4,4
<b>C16:1 Palmitoléico</b>	0,2	0,09
<b>C18:0 Esteárico</b>	3,4	1,7
<b>C18:1 Oléico – cis</b>	38,9	19,5
<b>C18:2 Linoléico – cis (<math>\omega</math>6)</b>	40,1	20,1
<b>C18:3 Linolênico – cis (<math>\omega</math>3)</b>	6,6	3,3
<b>C20:0 Araquídico</b>	0,3	0,15
<b>C20:1 Gadoléico</b>	0,2	0,1
<b>C22:0 Behênico</b>	0,5	0,23
<b>SFA</b>	13,1	6,57
<b>MUFA</b>	39,3	19,7
<b>PUFA</b>	46,7	23,4
<b><math>\omega</math>6:<math>\omega</math>3</b>	6:1	6:1

**Tabela 9** – Teores dos isômeros de tocoferóis determinados na blenda de óleos por cromatografia líquida de alta eficiência (média  $\pm$  estimativa do desvio padrão).

Isômero	Conteúdo (mg /100g)
$\alpha$ -tocoferol	$22,7 \pm 0,4$
$\gamma$ -tocoferol	$74 \pm 2$
$\delta$ -tocoferol	$16,1 \pm 0,1$

Em relação ao processo de secagem por atomização e obtenção das blendas de óleos microenpasuladas, processo este representado na Figura 30, o rendimento médio foi igual a 40%, com carregamento de cerca de 5kg de matérias-primas para o secador e recuperação de cerca de 2kg de pó seco. Para cada teste do planejamento experimental, os resultados obtidos de umidade, atividade de água e tamanho de partícula são apresentados na Tabela 10.



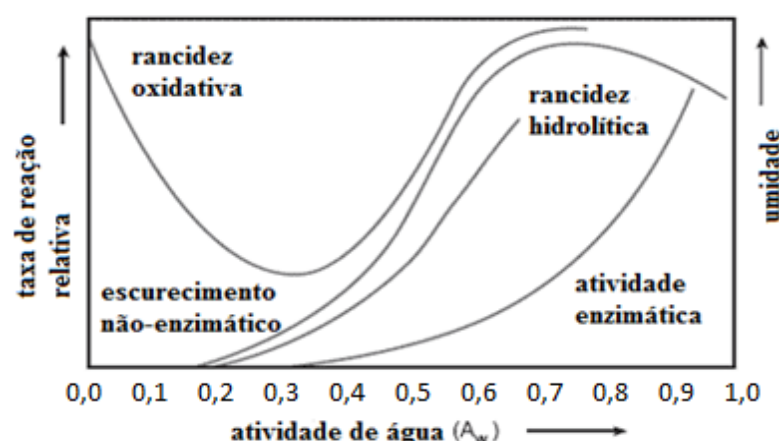
**Figura 30** – Fluxograma do processo de secagem por atomização e etapas prévias.

**Tabela 10** – Resultados físico-químicos médios obtidos logo após o processo de secagem por atomização para os oito testes com diferentes tratamentos antioxidantes. Números em parênteses consistem na estimativa do desvio padrão.

Teste	Umidade (%)	Atividade de água	D <sub>50</sub> (µm)	D <sub>90</sub> (µm)
1	1,56 (0,04)	0,287 (0,008)	1,55	11,02
2	1,38 (0,11)	0,281 (0,005)	1,47	9,43
3	1,34 (0,11)	0,283 (0,008)	1,62	14,57
4	1,32 (0,01)	0,263 (0,001)	4,13	23,68
5	1,46 (0,07)	0,303 (0,001)	1,42	8,14
6	1,49 (0,13)	0,319 (0,002)	2,37	23,78
7	1,93 (0,18)	0,305 (0,004)	1,27	3,65
8	1,68 (0,04)	0,352 (0,004)	1,56	8,67

Os valores de umidade observados indicam a eficiência de secagem entre os diferentes testes, resultando em produtos cujo teor de água variou em uma estreita faixa, de 1,3 a 1,9%. Tais valores indicam que o processo de secagem foi homogêneo quanto à retirada de água do sistema.

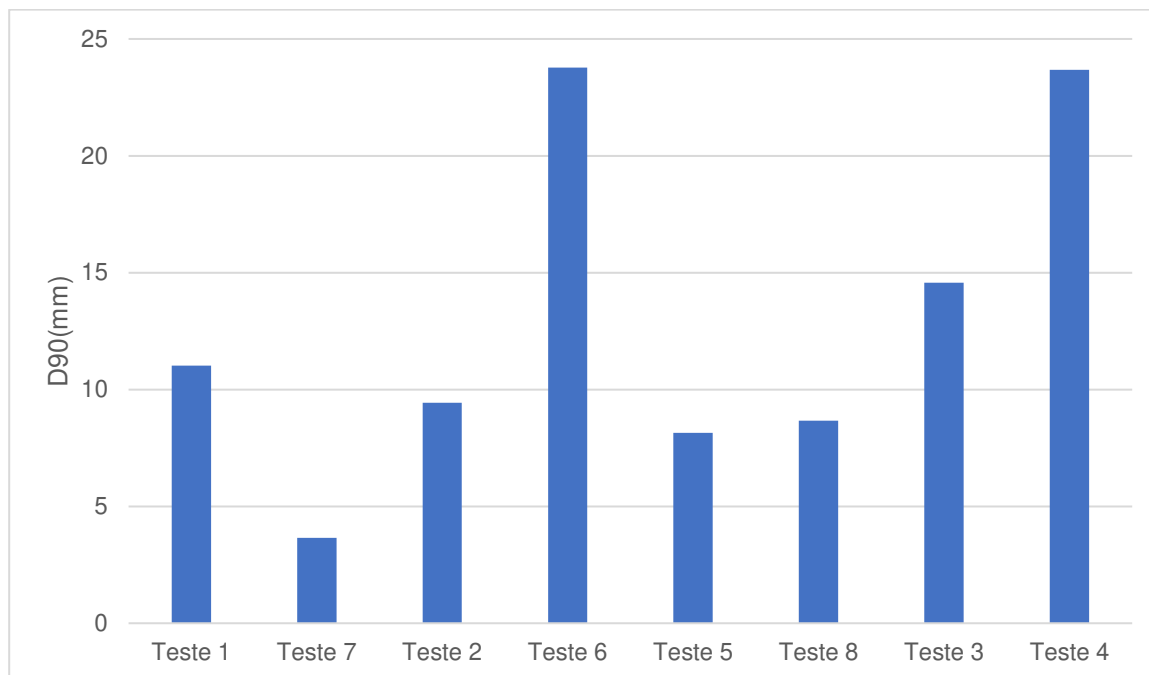
A atividade de água, por definição, é a relação entre a pressão de vapor de água em um sistema alimentício e a pressão de vapor da água pura na mesma temperatura. Quanto maior o valor de atividade de água, que vai de 0 a 1, maior é a disponibilidade desta para atuar em reações químicas e como meio para a atividade microbiológica. Entretanto, há processos que são favorecidos em valores mais baixos de atividade de água, por exemplo, a rancidez oxidativa, como pode ser visualizado na Figura 31<sup>69</sup>. No caso das amostras de microcápsulas obtidas pelo processo de secagem, obtiveram-se sistemas com valor de atividade de água da ordem de 0,30. Nessa faixa, a rancidez hidrolítica começa a ser favorecida, mas há maior susceptibilidade de ocorrência da rancidez oxidativa. Em contrapartida, valores de atividade de água próximos a 0,3 consistem em uma região ótima para o controle da rancidez oxidativa, pois ainda que este processo seja esperado, ele deve ocorrer com taxas relativas mínimas.



**Figura 31** – Mapa de reações de degradação de alimentos e suas taxas relativas de acordo com a atividade de água e a umidade.

Uma vez que a análise para determinação da distribuição do tamanho de partículas foi realizada em meio aquoso e que o material encapsulante utilizado é solúvel em água, os resultados observados estão mais relacionados ao tamanho dos glóbulos da emulsão que foi bombeada para a câmara de secagem que propriamente ao tamanho das partículas secas. Tal observação está em concordância com os resultados relativamente baixos para os valores de  $D_{50}$  (ou mediana), que representa o tamanho observado para 50% das partículas avaliadas. Observou-se certa homogeneidade para este parâmetro, cujos resultados variaram de 1,27 a 1,62  $\mu\text{m}$  entre as amostras, com exceção dos Testes 4 e 6, cujos valores de  $D_{50}$  chegaram a 4,13 e 2,37  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

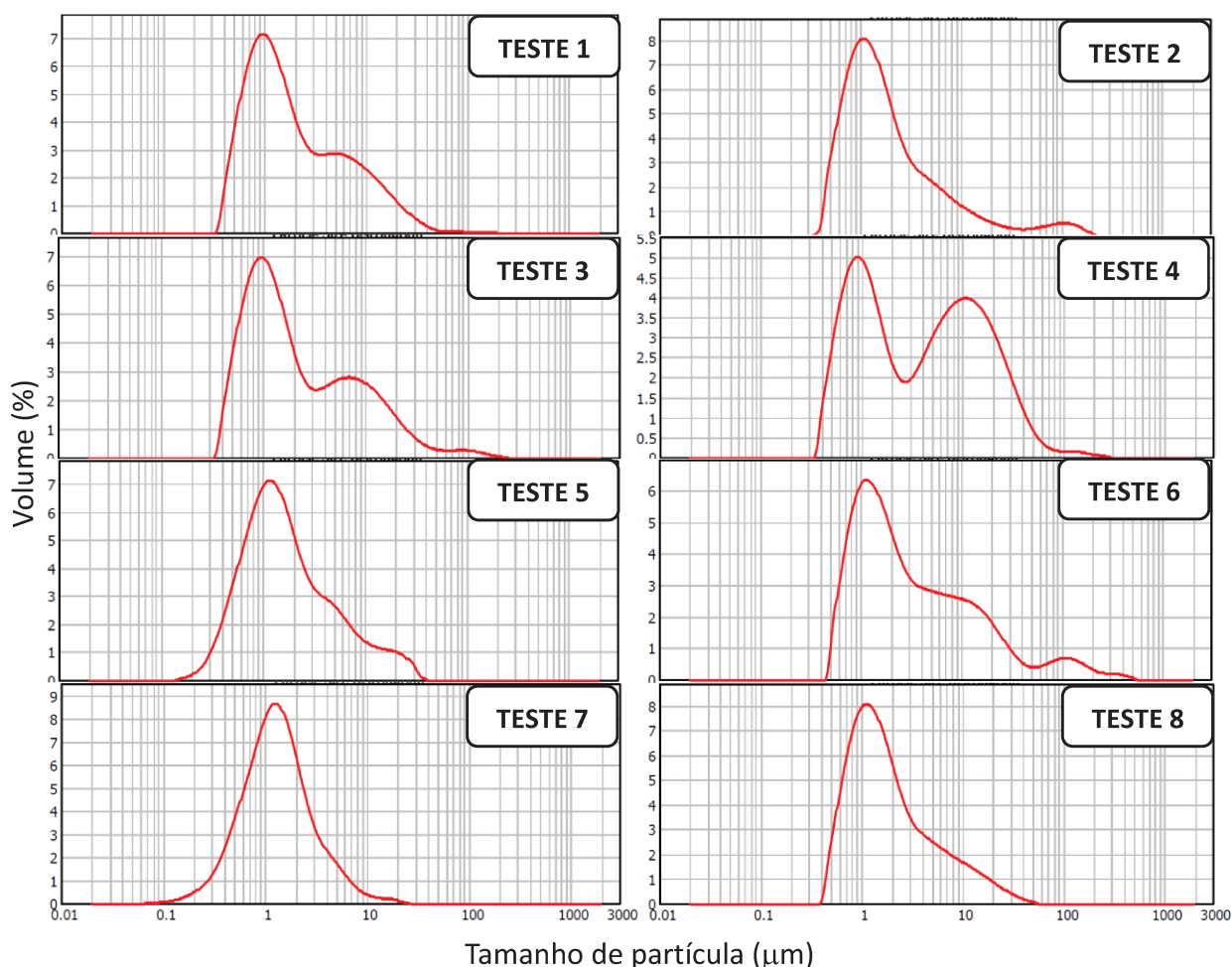
Quando tomados os valores de  $D_{90}$ , ou seja, o valor de tamanho de partícula observado para 90% das partículas avaliadas, observaram-se resultados bastante divergentes entre as amostras, indicando baixa uniformidade no tamanho das microcápsulas obtidas, possivelmente proveniente de uma má homogeneização. Os diferentes valores de  $D_{90}$  tampouco puderam ser correlacionados à ordem de obtenção dos testes pelo processo de secagem, conforme representado na Figura 32, o que reforça a importância da aleatoriedade na aplicação do planejamento fatorial, embora confirme a baixa reprodutibilidade do processo conduzido na planta piloto de secagem no que se refere ao tamanho das partículas obtidas e na necessidade de otimização das condições de processo para a matriz em estudo para o aumento desta reprodutibilidade.



**Figura 32** – Relação entre a ordem de secagem dos testes e os valores de  $D_{90}$  observados.

Esta heterogeneidade de processo pode ser mais facilmente observada pelos gráficos de distribuição de tamanho de partículas observados na Figura 33. Foram observadas distribuições de tamanho de partículas bi e trimodais, além de distribuição unimodal, como observado para o Teste 7. Para o Teste 4, as duas populações de partículas se mostraram bastante características. Nesse caso, em particular, os sistemas bimodais são bastante interessantes, pois as partículas de menor tamanho podem ocupar os interstícios de partículas maiores, reduzindo a interação do material com o oxigênio atmosférico e, portanto, a susceptibilidade à oxidação.

A eficiência e a reprodutibilidade do processo de secagem requerem otimização da emulsão que alimenta o secador, das condições de operação e do sistema a ser seco (material de parede mais recheio), o que não foi objetivo do presente estudo, resultando na baixa homogeneidade dos perfis de distribuição de tamanho de partículas entre os testes secos.



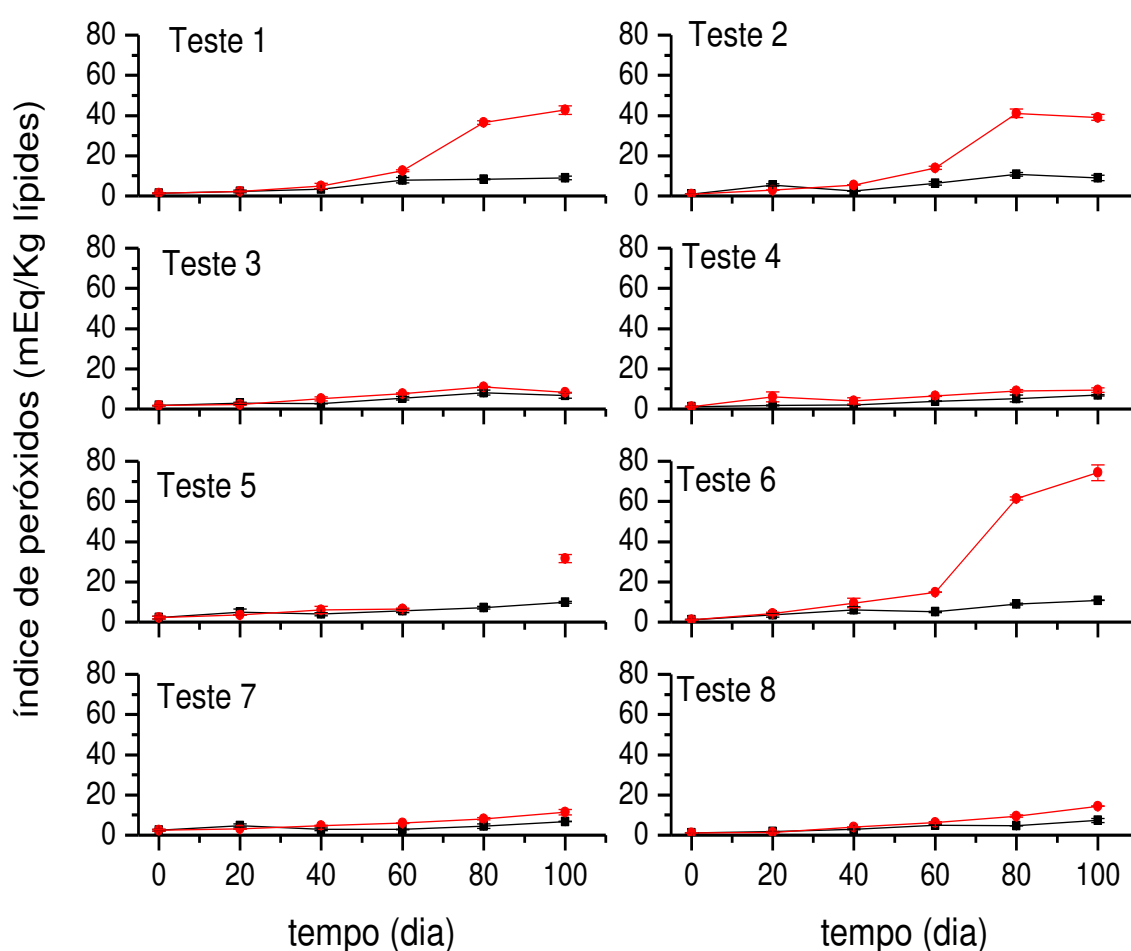
**Figura 33** – Gráficos de distribuição de tamanho de partículas para os diferentes tratamentos antioxidantes, obtidos em duplicata. Tais resultados são representativos do tamanho dos glóbulos da emulsão, ou seja, da blenda de óleos em água.

## 5.2. Determinação do índice de peróxidos

O índice de peróxidos foi avaliado a partir da fração lipídica acessível ao solvente orgânico utilizado durante a etapa de extração a frio, possivelmente pelo mecanismo de difusão, uma vez que não foi promovida a ruptura ou desintegração das microesferas. A extração não foi exaustiva, uma vez que a proporção de material lipídico extraído em relação às cápsulas foi equivalente a 30%, quando essa proporção deveria ser de 50%.

Os resultados de índice de peróxidos determinados ao longo de 100 dias de avaliação, em ambas as condições de armazenamento, são graficamente representados na Figura 34. Foi possível observar diferenças expressivas no formato

dos gráficos dos Testes 1, 2, 5 e 6 em relação aos demais; para estes, foi observado um incremento significativo do resultado de índice de peróxidos em 80 dias de armazenamento da condição acelerada, o que pode ser evidência do fim da etapa de indução e início da etapa de propagação da oxidação<sup>47</sup>. Para os demais testes, todos contendo extrato de alecrim em comum, o mesmo comportamento observado para a condição ambiente de armazenamento foi mantido na condição acelerada, até 100 dias de estudo, sem qualquer aumento expressivo do valor de índice de peróxidos.



**Figura 34** – Valores de índice de peróxidos observados para cada tratamento feito; resultados em preto referem-se à condição ambiente de armazenamento e resultados em vermelho, à condição acelerada.

Os resultados pontuais de índice de peróxidos obtidos para as amostras em condição de armazenamento ambiente e acelerado também constam nas Tabelas 11 e 12, respectivamente. Como pode ser observado na Tabela 11, ainda que todos os testes tenham sido feitos no mesmo dia e com os mesmos lotes de matérias-

primas, observaram-se ligeiras diferenças nos valores de índice de peróxidos entre os diferentes testes já na avaliação inicial. Tais diferenças podem ser atribuídas aos diferentes tempos de residência no secador, possibilitando maior ou menor tempo de exposição do produto a altas temperaturas, além das possíveis diferenças de estabilidade térmica dos antioxidantes selecionados. Ademais, a precisão do método de determinação de índice de peróxidos pelo método adotado é relativamente baixa, tendo o desvio padrão entre réplicas chegado a 40% em alguns casos, embora o desvio padrão relativo médio tenha sido igual a 11%. Esta baixa precisão pode ser justificada principalmente pela etapa de extração, quando peróxidos e hidroperóxidos ficaram expostos à atmosfera oxidante durante o processo de secagem *overnight*.

Aos resultados obtidos para cada período, aplicou-se o teste de comparação de médias de Dunnet, a fim de se comparar os resultados médios dos tratamentos com antioxidantes (Testes 2 a 8) ao controle sem antioxidantes (Teste 1). Para isto, procedeu-se com a análise de variância dos dados obtidos para um mesmo período e condição de armazenamento com uso do software OriginPro 8.5. Posteriormente, utilizou-se o valor do quadrado médio do resíduo ( $MQ_{\text{erro}}$ ) para cálculo da diferença mínima significativa (DMS) no nível de significância adotado, de acordo com a equação 14, onde  $d$  é um valor tabelado proposto por Dunnet<sup>70</sup> e  $r$  é o número de repetições de cada tratamento. Toda estimativa de contraste em módulo maior do que o valor de DMS significa diferença significativa em relação ao controle.

$$DMS = d \sqrt{\frac{2 \times MQ_{\text{erro}}}{r}} \quad (14)$$



**Tabela 11** – Valores de índice de peróxidos (mEq/Kg lípidos) observados a cada período de avaliação para as amostras armazenadas na condição ambiente (AMB). Números em parênteses consistem na estimativa do desvio padrão.

Teste	Inicial	20 dias	40 dias	60 dias	80 dias	100 dias
1	1,39 (0,18)	2,21 (0,64)	3,46 (0,08)	7,78 (1,35)	8,20 (0,24)	8,90 (0,92)
2	0,81 (0,01)	5,50* (0,60)	2,45 (0,01)	6,33 (0,89)	10,78 (0,85)	9,00 (1,39)
3	1,69 (0,04)	2,83 (0,63)	2,69 (0,09)	5,40* (0,81)	8,10 (1,26)	6,70 (1,35)
4	1,11 (0,17)	1,84 (0,22)	2,03 (0,05)	3,84* (0,12)	5,25* (1,74)	6,84 (0,27)
5	2,24 (0,60)	4,99* (1,42)	3,95 (0,78)	5,63* (0,91)	7,21 (0,61)	9,84 (0,43)
6	1,05 (0,23)	3,51 (1,04)	6,08* (1,54)	5,10* (0,31)	8,98 (0,46)	10,85 (0,18)
7	2,47* (0,52)	4,70 (0,80)	2,97 (0,64)	2,81* (0,16)	4,52* (1,06)	6,78 (0,12)
8	1,08 (0,05)	1,88 (0,00)	2,98 (0,21)	4,98* (0,11)	4,73* (0,05)	7,29 (1,02)
DMS	1,01	2,58	2,17	2,40	3,10	2,84

*Nota: o asterisco indica diferença significativa em relação ao Teste 1 ao nível de 95% de confiança, segundo teste de comparação de médias de Dunnet.*

**Tabela 12** – Valores de índice de peróxidos (mEq/Kg lípidos) observados a cada período de avaliação para as amostras armazenadas na condição acelerada (ACL). Números em parênteses consistem na estimativa do desvio padrão.

Teste	Inicial	20 dias	40 dias	60 dias	80 dias	100 dias
1	1,39 (0,18)	2,19 (0,24)	5,03 (1,33)	12,51 (0,47)	36,54 (0,93)	42,73 (2,10)
2	0,81 (0,01)	2,91 (0,05)	5,40 (0,12)	13,98* (0,79)	41,10* (2,21)	39,09 (1,42)
3	1,69 (0,04)	2,25 (0,56)	5,08 (1,02)	7,70* (0,28)	11,07* (0,23)	8,20* (0,17)
4	1,11 (0,17)	6,12* (2,45)	4,00 (1,58)	6,42* (0,21)	8,94* (0,69)	9,33* (1,12)
5	2,24 (0,60)	3,51 (0,00)	5,99 (1,85)	6,39* (0,49)	NA	31,49* (2,02)
6	1,05 (0,23)	4,26 (0,58)	9,51* (2,45)	14,89* (0,05)	61,51* (0,83)	74,29* (3,82)
7	2,47* (0,52)	3,05 (0,04)	4,78 (0,24)	5,95* (0,20)	8,10* (0,50)	11,47* (1,30)
8	1,08 (0,05)	1,41 (0,25)	4,05 (0,03)	6,32* (0,44)	9,50* (0,60)	14,45* (0,20)
DMS	1,01	3,02	4,47	1,40	3,90	6,16

*Nota: o asterisco indica diferença significativa em relação ao Teste 1 ao nível de 95% de confiança, segundo teste de comparação de médias de Dunnet.*

*NA = A amostra referente ao Teste 5, no período de 80 dias, não pôde ser avaliada, pois apresentou problemas dentro da câmara climática.*

A seguir, é apresentado o procedimento para aplicação do teste de Dunnet aos dados de índice de peróxidos do período inicial.

**Tabela 13** – Tabela de análise de variância para o conjunto de dados de índice de peróxidos do período inicial.

	Graus de liberdade	Soma quadrática	Média quadrática	F	p-valor
Modelo	7	5,076	0,725	7,668	0,005
Erro	8	0,756	0,0946		
Total	15	5,832			

$$DMS = 3,29 \sqrt{\frac{2 \times 0,0946}{2}} = 1,012 \quad (15)$$

Os contrastes de cada teste em relação ao controle foram calculados de acordo com a Tabela 14, observando que, no período inicial, o único teste que apresentou diferença significativa no valor de índice de peróxidos em relação ao Teste 1 foi o Teste 7 (mistura de  $\alpha$ -tocoferol e extrato de alecrim).

De maneira geral, as amostras com antioxidantes armazenadas na condição ambiente (Tabela 11) não apresentaram grande diferenciação em relação à amostra controle até 100 dias de estudo; embora diferenças estatisticamente significativas tenham sido apontadas em 60 dias, não houve consistência destas evidências nos períodos posteriores. Ademais, exceto pelo Teste 6, todas as amostras apresentaram valor igual ou inferior ao valor de 10mEq/Kg de lípidos, valor este adotado como limite máximo para a qualidade de óleos e gorduras refinados (*Codex Alimentarius*).

**Tabela 14** – Tabela de contrastes dos tratamentos com antioxidantes (testes 2 ao 8) em relação ao tratamento controle (teste 1) para o período inicial.

Teste	Índice de peróxidos (mEq/Kg lípidos) - inicial	Diferença em relação ao controle	Diferença maior que o DMS
1 (Controle)	1,39	-	-
2	0,81	- 0,58	Não
3	1,69	0,30	Não
4	1,11	- 0,28	Não
5	2,24	0,85	Não
6	1,05	-0,34	Não
7	2,47	1,08	Sim
8	1,08	-0,31	Não

Na condição acelerada (Tabela 12), diferenças significativas dos diferentes tratamentos com antioxidantes em relação ao controle foram observadas principalmente a partir de 60 dias de armazenamento. Algumas diferenças observadas evidenciaram maior efetividade no controle da formação dos peróxidos e hidroperóxidos para os Testes 3, 4 e 7, que contêm, todos eles, o extrato de alecrim como agente antioxidante, isolado ou em combinação com uma das demais espécies. O alecrim contém a maior concentração de compostos fenólicos e flavonóides dentre os extratos aquosos de diversas ervas<sup>34</sup>, destacando-se os diterpenos fenólicos como o ácido carnósico, carnosol e rosmanol, e alguns ácidos fenólicos, como o rosmarínico. Os resultados satisfatórios observados para o tratamento com alecrim devem-se principalmente à presença de anéis aromáticos nas estruturas dos ácidos carnósico e rosmarínico, as quais possuem dois grupos -OH que podem atuar como doadores de prótons para as espécies radicalares geradas na propagação da oxidação, evitando assim a abstração de um próton de outra molécula de ácido graxo insaturado. Ademais, estes mesmos grupos -OH vicinais possivelmente atuem como quelantes de metais, os quais são substâncias pró-oxidantes.

Por outro lado, outros tratamentos apresentaram valores de índice de peróxidos próximo ou até mesmo maior que aqueles da amostra controle, podendo indicar um efeito pró-oxidante destes; tais resultados foram observados para os Testes 2, 5 e 6, os quais possuem palmitato de ascorbila e  $\alpha$ -tocoferol, isolados e combinados. O  $\alpha$ -tocoferol é um antioxidante lipossolúvel que corresponde ao composto majoritário da vitamina E. Seu mecanismo de atuação é semelhante àquele dos ácidos carnósico e rosmarínico, ou seja, doando prótons para radicais peroxila e hidroperoxila e terminando a propagação da oxidação<sup>37</sup>. Essa doação ocorre devido ao grupo -OH ligado ao anel aromático que estabiliza a estrutura após abstração do próton por ressonância. Entretanto, a estrutura molecular do  $\alpha$ -tocoferol difere da estrutura dos ácidos encontrados no extrato de alecrim por apresentar apenas um grupo -OH ligado ao anel aromático. O  $\alpha$ -tocoferol também apresenta uma diferença de atividade antioxidante frente a outros tocoferóis que compõem a vitamina E, além de apresentar estabilidade térmica que limita sua aplicação (acima de 150°C, perde sua atividade antioxidante<sup>34</sup>, o que pode ter ocorrido na etapa de secagem). Por fim, o palmitato de ascorbila é a forma lipossolúvel do ácido ascórbico; sua estrutura possui dois grupos -OH que podem doar prótons para as espécies peroxila e hidroperoxila. Entretanto, o radical formado pela doação de um próton não é estabilizado pela

ressonância do anel aromático como acontece nas espécies provenientes do alecrim e no  $\alpha$ -tocoferol. A posição em átomos de carbono adjacentes também permite que os grupos -OH atuem como agente quelante de espécies metálicas, que catalisam a oxidação. Para o ácido ascórbico, aplicações em baixa concentração podem resultar em atividade pró-oxidante; a baixa eficiência do palmitato de ascorbila observada no presente estudo pode também ser proveniente de aplicação em dosagem inadequada.

Com apenas oito experimentos diferentes, sem réplicas, não foi possível calcular o erro experimental e, portanto, a significância dos efeitos de cada tratamento antioxidante empregado. Desta forma, adotou-se uma primeira análise dos resultados por meio de gráficos normais<sup>71</sup>, com o objetivo de distinguir os possíveis efeitos dos valores que compreendem apenas ruído experimental. Nesta aproximação, os efeitos são inicialmente considerados como uma amostra aleatória proveniente de uma distribuição aproximadamente normal e que devem refletir apenas erros aleatórios.

Para a construção do gráfico normal, os efeitos primários, secundários e terciários foram primeiramente calculados, tomando apenas os resultados de índice de peróxidos das amostras armazenadas por 100 dias na condição acelerada. O efeito principal do palmitato de ascorbila foi calculado, por exemplo, pela média dos efeitos deste tratamento nos dois níveis praticados (0 e 0,01%), de acordo com a equação 16:

$$Efeito_{palmitato} = \frac{(IP_2 + IP_4 + IP_6 + IP_8) - (IP_1 + IP_3 + IP_5 + IP_7)}{4} \quad (16)$$

$$Efeito_{palmitato} = \frac{(39,09 + 9,33 + 74,29 + 14,25) - (42,73 + 8,20 + 31,49 + 11,47)}{4} = 10,8$$

Os efeitos secundários e terciários, por sua vez, foram calculados da mesma forma, atribuindo-se o sinal negativo ou positivo ao valor de índice de peróxidos de acordo com a multiplicação de sinais da Tabela 7.

$$Efeito_{palmitato \times alecrim} = \frac{(IP_1 + IP_4 + IP_5 + IP_8) - (IP_2 + IP_3 + IP_6 + IP_7)}{4} \quad (17)$$

$$Efeito_{palmitato \times alecrim} = \frac{(43,73 + 9,33 + 31,49 + 14,25) - (39,09 + 8,20 + 74,29 + 11,47)}{4}$$

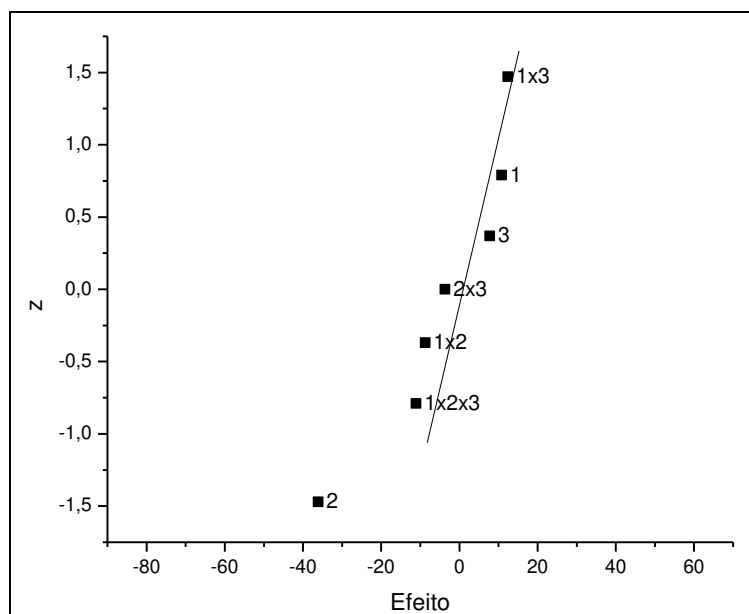
$$Efeito_{palmitato \times alecrim} = -8,7$$

Após calculados todos os efeitos (sete no total), os mesmos foram utilizados para construção de um gráfico normal, onde os valores são apresentados em ordem crescente e cada um deles deve representar cerca de 14,3% da área total da distribuição, de acordo com a Tabela 15. Entretanto, utilizam-se os valores correspondentes da distribuição normal padronizada  $z$ , com o auxílio de uso de tabelas de área da cauda da distribuição normal padronizada.

Como pode ser observado pelo gráfico da Figura 35, todos os pontos referentes aos efeitos calculados, exceto aquele referente ao efeito 2, parecem vir de uma população normal de média zero e, portanto, representam apenas ruído. Em contrapartida, o efeito 2, referente ao efeito principal do extrato de alecrim, é o único que parece ser significativo, não pertencendo à mesma população que originou os demais pontos. O efeito do extrato de alecrim é negativo, o que significa que sua utilização resulta na redução do valor de índice de peróxidos observado.

**Tabela 15** – Correspondência entre os efeitos calculados para o planejamento 2<sup>3</sup> e os valores de probabilidade cumulativa, com base nos resultados de índice de peróxidos da condição acelerada, com 100 dias de armazenamento.

Tratamento	Código	Efeito	Região de probabilidade cumulativa (%)	Ponto central	$z$
<b>extrato de alecrim</b>	2	-36,1	0 - 14,3	7,1	-1,47
<b>palmitato + alecrim + <math>\alpha</math>-tocoferol</b>	1x2x3	-11,1	14,3 - 28,6	21,4	-0,79
<b>palmitato + alecrim</b>	1x2	-8,7	28,6 - 42,9	35,7	-0,37
<b>alecrim + <math>\alpha</math>-tocoferol</b>	2x3	-3,7	42,9 - 57,2	50,0	0
<b><math>\alpha</math>-tocoferol</b>	3	7,8	57,2 - 71,4	64,3	0,37
<b>palmitato de ascorbila</b>	1	10,8	71,4 - 85,7	78,5	0,79
<b>palmitato + <math>\alpha</math>-tocoferol</b>	1x3	12,4	85,7 - 100	92,8	1,47



**Figura 35** – Gráfico normal dos valores dos efeitos principais, secundários e terciários para os tratamentos com antioxidantes com base nos resultados de índice de peróxidos da condição acelerada, com 100 dias de armazenamento.

Uma segunda aproximação adotada foi a aplicação do teste t pareado aos dados obtidos<sup>71</sup>, avaliando cada tratamento com um dos antioxidantes puros de maneira isolada. Para isso, utilizou-se a blocagem, segregando pares de amostras cuja única diferença seria a presença de um único fator, ou seja, o tratamento antioxidante. Por exemplo, ao se avaliar a significância do efeito do extrato de alecrim, os Testes 1 e 3, 2 e 4, 5 e 7, e 6 e 8 foram agrupados e tiveram a diferença (d) de suas médias então calculada (Tabela 16). Caso os resultados do tratamento com extrato de alecrim difiram de maneira sistemática em relação aos resultados do tratamento sem extrato de alecrim, o efeito significativo do tratamento com este antioxidante será confirmado (diferença média  $\Delta$  significativa). Caso não exista diferença entre os tratamentos com e sem extrato de alecrim, então o intervalo de confiança da média das diferenças  $\Delta$ , calculada de acordo com a equação 18, deve conter o valor zero.

**Tabela 16** – Comparação dos resultados obtidos pelo tratamento com extrato de alecrim com base nos resultados de índice de peróxidos da condição acelerada, com 100 dias de armazenamento.

Bloco	Sem extrato de alecrim	Com extrato de alecrim	Diferença (d = x <sub>A</sub> – x <sub>B</sub> )
<b>Teste 1 vs. Teste 3</b>	43	8,2	34,8
<b>Teste 2 vs. Teste 4</b>	39	9	30
<b>Teste 5 vs. Teste 7</b>	31	11	20
<b>Teste 6 vs. Teste 8</b>	74	14,4	59,6
<b>Diferença Média (<math>\Delta</math>)</b>			36,1
<b>Desvio-padrão</b>			16,8
<b>Graus de liberdade</b>			4
<b><math>t_{4,95\%}</math></b>			2,776

O intervalo de confiança de  $\Delta$  é dado por:

$$\Delta = d \pm t_v \frac{s_d}{\sqrt{N}} \quad (18)$$

$$\Delta_{\text{extrato de alecrim}} = 36,1 \pm 2,776 \frac{16,8}{\sqrt{4}} = 36,1 \pm 23,3 = [12,8; 59,4]$$

Usando os valores da tabela de pontos de probabilidade da distribuição  $t$  com  $\nu$  graus de liberdade, para 95% de confiança, o intervalo de confiança de  $\Delta$  para o extrato de alecrim foi calculado. Esse intervalo não compreende o valor zero e, então, pode-se inferir que houve diferença sistemática entre os tratamentos com e sem extrato de alecrim.

Da mesma forma, procedeu-se com a avaliação dos efeitos dos tratamentos com palmitato de ascorbila e  $\alpha$ -tocoferol. Diferente do que foi observado para o extrato de alecrim, o intervalo de confiança de  $\Delta$  para os tratamentos com os demais antioxidantes incluíram o valor zero, indicando que a diferença entre os tratamentos com e sem os respectivos antioxidantes não apresentam diferença sistemática.

$$\Delta_{\text{palmitato de ascorbila}} = -10,6 \pm 2,776 \frac{21,8}{\sqrt{4}} = -10,6 \pm 30,3 = [-40,9; 9,7]$$

$$\Delta_{\alpha\text{-tocoferol}} = -7,8 \pm 2,776 \frac{19,7}{\sqrt{4}} = -7,8 \pm 27,3 = [-35,1; 19,5]$$

Tais resultados corroboram com as observações feitas a partir do gráfico normal, no que se refere aos efeitos principais.

### 5.3. Determinação do índice de estabilidade oxidativa

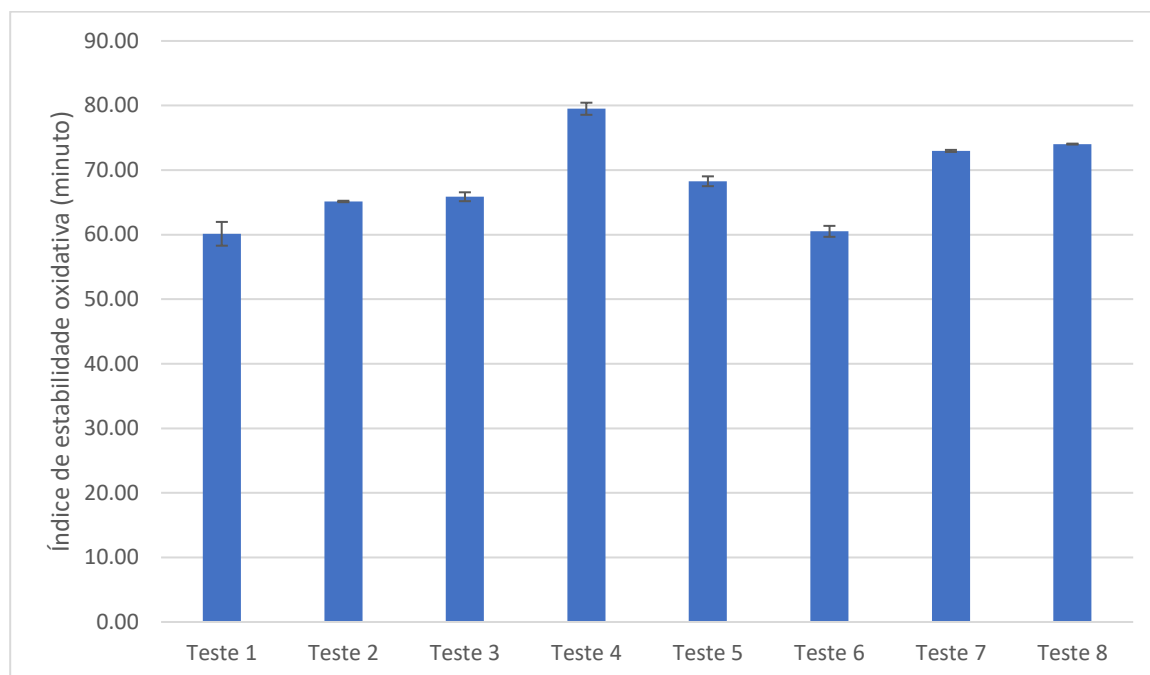
O índice de estabilidade oxidativa consiste no tempo de duração da etapa de iniciação ou indução, a partir da qual o consumo de oxigênio é acelerado. Os resultados para este parâmetro constam na Tabela 17 e são representados graficamente na Figura 36. Todos os tratamentos com antioxidantes, exceto pelo Teste 6, apresentaram ganho de estabilidade frente à oxidação, com destaque para os Testes 4, 7 e 8. De fato, todas as amostras, exceto pelo Teste 6, apresentaram diferença significativa no valor de índice de estabilidade oxidativa em relação ao Teste 1, segundo teste de Dunnet com 95% de confiança.

**Tabela 17** – Valores de índice de estabilidade oxidativa (minuto) observados para as amostras em condição controle (período inicial).

Teste	Índice de estabilidade oxidativa
<b>1 (controle)</b>	60,13 (1,84)
<b>2</b>	65,14* (0,11)
<b>3</b>	65,87* (0,69)
<b>4</b>	79,50* (0,94)
<b>5</b>	68,27* (0,76)
<b>6</b>	60,51 (0,85)
<b>7</b>	72,97* (0,16)
<b>8</b>	74,03* (0,07)
<b>DMS</b>	2,87

*Nota: o asterisco indica diferença significativa em relação ao Teste 1 ao nível de 95% de confiança, segundo teste de comparação de médias de Dunnet.*





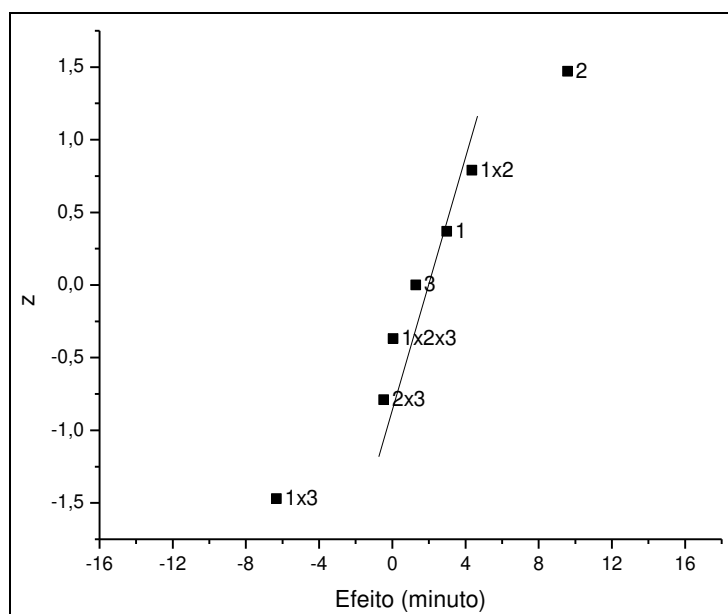
**Figura 36** – Valores de índice de estabilidade oxidativa (minuto) observados para as amostras em condição controle (período inicial).

Da mesma forma como feito para os resultados de índice de peróxidos referente a 100 dias de armazenamento na condição acelerada, o gráfico de distribuição normal dos efeitos primários, secundários e terciário foi construído a partir dos resultados de índice de estabilidade oxidativa. Os dados calculados são apresentados na Tabela 18 e o gráfico normal obtido é representado na Figura 37.

**Tabela 18** – Correspondência entre os efeitos calculados para o planejamento 2<sup>3</sup> e os valores de probabilidade cumulativa, com base nos resultados de índice de estabilidade oxidativa.

Tratamento	Código	Efeito	Região de probabilidade cumulativa (%)	Ponto central	Z
<b>palmitato + <math>\alpha</math>-tocoferol</b>	1x3	-6,331	0 - 14,3	7,1	-1,47
<b>alecrim + <math>\alpha</math>-tocoferol</b>	2x3	-0,469	14,3 - 28,6	21,4	-0,79
<b>palmitato + alecrim + <math>\alpha</math>-tocoferol</b>	1x2x3	0,049	28,6 - 42,9	35,7	-0,37
<b><math>\alpha</math>-tocoferol</b>	3	1,286	42,9 - 57,2	50,0	0
<b>palmitato de ascorbila</b>	1	2,984	57,2 - 71,4	64,3	0,37
<b>palmitato + alecrim</b>	1x2	4,359	71,4 - 85,7	78,5	0,79
<b>extrato de alecrim</b>	2	9,581	85,7 – 100	92,8	1,47

De acordo com o gráfico normal da Figura 37, o efeito significativo do tratamento com extrato de alecrim foi novamente confirmado. Para a resposta índice de estabilidade oxidativo, o uso de extrato de alecrim teve efeito positivo, ou seja, sua utilização fez aumentar a estabilidade oxidativa da blenda de óleos encapsulada.



**Figura 37** – Gráfico normal dos valores dos efeitos principais, secundários e terciários para os tratamentos com antioxidantes com base nos resultados de índice de estabilidade oxidativa.

Entretanto, a avaliação do índice de estabilidade oxidativa como resposta do planejamento experimental apontou um novo efeito que pareceu ser significativo, desta vez decorrente da interação entre palmitato de ascorbila e  $\alpha$ -tocoferol. O valor negativo do efeito indica que os dois antioxidantes utilizados possivelmente apresentem antagonismo, dado que o uso combinado deles, nas concentrações adotadas experimentalmente, resultou em redução do índice de estabilidade oxidativa. O Teste 6, cujo tratamento combinou estes antioxidantes, foi justamente o único a não apresentar diferença significativa em relação ao Teste 1, sem qualquer tratamento protetivo.

O uso combinado de tocoferóis e ácido ascórbico foi reportado na literatura como um par eficiente de antioxidantes para uma matriz de óleo microencapsulada, devido à capacidade do ácido ascórbico de regenerar as moléculas de tocoferóis (antioxidante principal) após abstração de prótons destas<sup>72</sup>. Já em uma matriz de carne, por exemplo, o ácido ascórbico resultou em atividade pró oxidante na ausência de  $\alpha$ -tocoferol, possivelmente devido ao fato de este reduzir espécies metálicas que

atuam na decomposição dos hidroperóxidos de lipídeos, mas esse efeito foi cancelado pela suplementação de  $\alpha$ -tocoferol. Entretanto, não foram observadas diferenças ao longo do tempo entre amostras com  $\alpha$ -tocoferol e amostras com o uso combinado de  $\alpha$ -tocoferol e ácido ascórbico<sup>73</sup>. Já o uso do  $\alpha$ -tocoferol com o palmitato de ascorbila em outra matriz de carne foi determinado como sinérgico, dada a redução significativa da concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico quando utilizados juntos os dois antioxidantes<sup>38</sup>. O efeito da interação do  $\alpha$ -tocoferol e do palmitato de ascorbila no presente estudo, ao contrário, foi antagônico. O desempenho antioxidante aparentemente nulo do palmitato de ascorbila puro, assim como seu efeito pró oxidante em combinação com o  $\alpha$ -tocoferol, pode estar associado à distribuição deste aditivo nas microesferas obtidas, uma vez que sua molécula possui regiões hidrofílicas e hidrofóbicas (caráter anfipático) que possivelmente permitiram que o mesmo se concentrasse nas regiões de interface entre as fases aquosa e oleosa da emulsão inicial, limitado sua ação. Ademais, a regeneração do  $\alpha$ -tocoferol pelo ácido ascórbico deve se dar de maneira mais rápida pelo uso do ácido ascórbico que pelo uso do palmitato de ascorbila, o qual precisaria estar dissociado para doar prótons mais facilmente para o antioxidante principal.

O teste *t* pareado também foi aplicado aos resultados de índice de estabilidade oxidativa, determinando-se os intervalos de confiança para cada tratamento. Como esperado de acordo com o gráfico normal da Figura 37, somente o extrato de alecrim apresentou um efeito significativo no aumento do índice de estabilidade oxidativa.

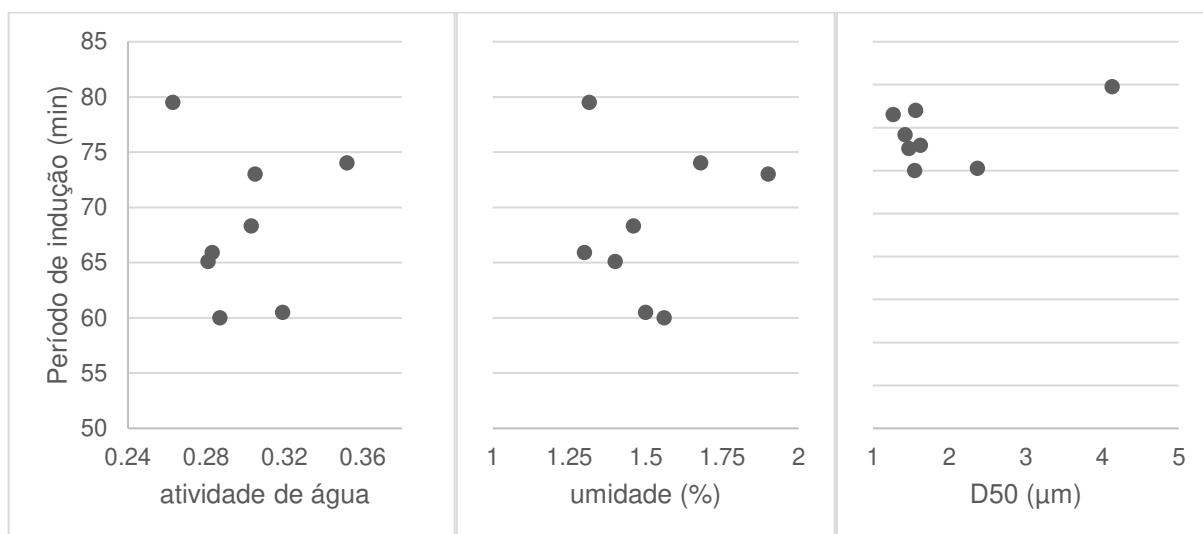
$$\Delta_{\text{extrato de alecrim}} = -9,6 \pm 2,776 \frac{5,1}{\sqrt{4}} = -9,6 \pm 7,1 = [-16,7; -2,5]$$

$$\Delta_{\text{palmitato de ascorbila}} = -3,0 \pm 2,776 \frac{8,9}{\sqrt{4}} = -3,0 \pm 12,4 = [-15,4; 9,4]$$

$$\Delta_{\alpha\text{-tocoferol}} = -1,29 \pm 2,776 \frac{7,3}{\sqrt{4}} = -1,29 \pm 10,13 = [-11,4; 8,84]$$

Por fim, tomaram-se os resultados de índice de estabilidade oxidativa para verificar se alguma característica físico-química dos diferentes tratamentos, proveniente do processo de secagem, apresentaria correlação com a estabilidade do produto. De acordo com os gráficos da Figura 38, não se observou qualquer

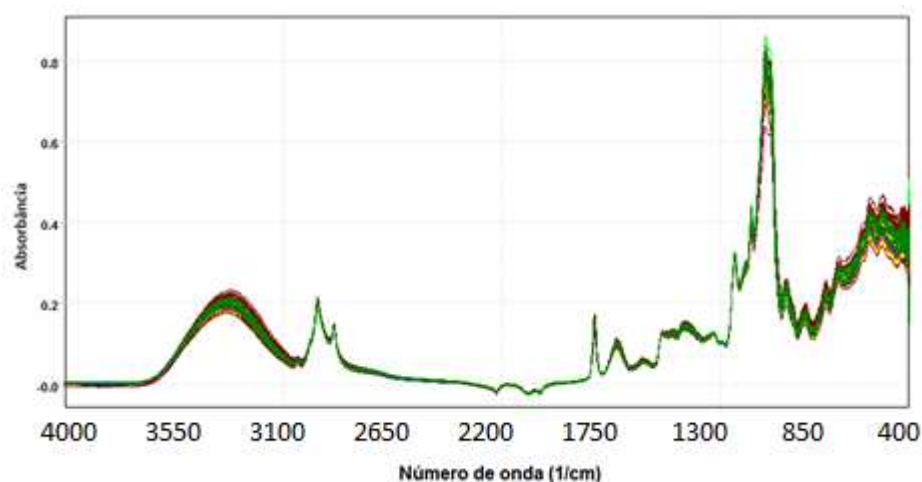
correlação entre os resultados de tempo de indução e os valores de atividade de água, umidade e tamanho de partícula determinados para cada teste.



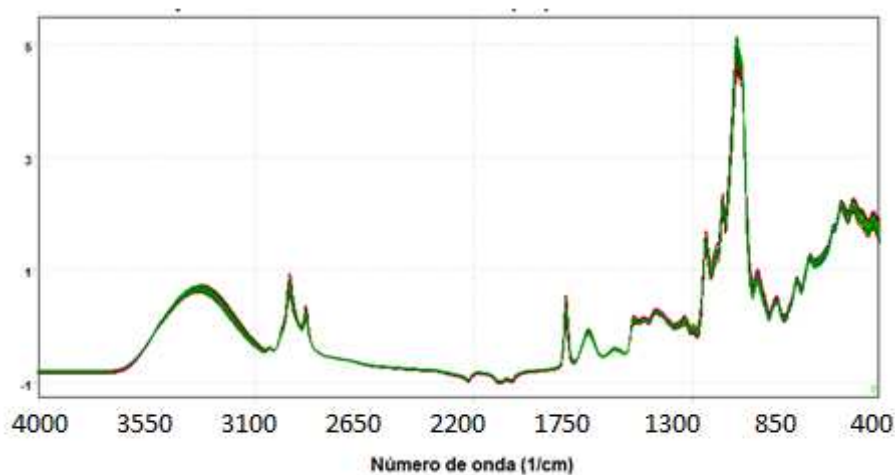
**Figura 38** – Resultados de período de indução (min) em função da atividade de água, umidade e tamanho de partícula determinados para cada tratamento antioxidantes.

#### 5.4. Análise espectral e quimiométrica

Alternativo ao método oficial para determinação do índice de peróxidos, procedeu-se com a obtenção dos espectros na região do infravermelho médio, os quais são reportados na Figura 39. Com objetivo de aumentar a razão sinal/ruído dos espectros obtidos, diminuindo assim a componente aleatório dos espectros, aplicou-se o alisamento pelo método da média como processo de transformação de dados, adotando janela de tamanho igual a 15. Também se aplicou a Padronização Normal de Sinal (SNV) aos dados com o objetivo de corrigir efeitos de espalhamento aditivos e multiplicativos na absorbância, os quais podem ser causados, neste caso, pelas diferenças de tamanho e forma das partículas sólidas das amostras. Como pré-processamento, os dados foram todos centrados na média. O aumento da razão S/R pode ser observado na Figura 40.

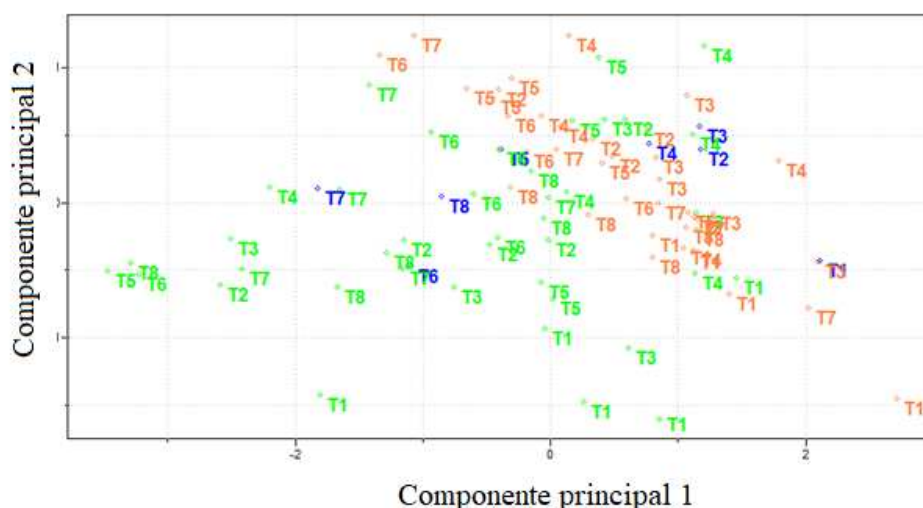


**Figura 39** – Espectros na região do infravermelho médio originais, da região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .



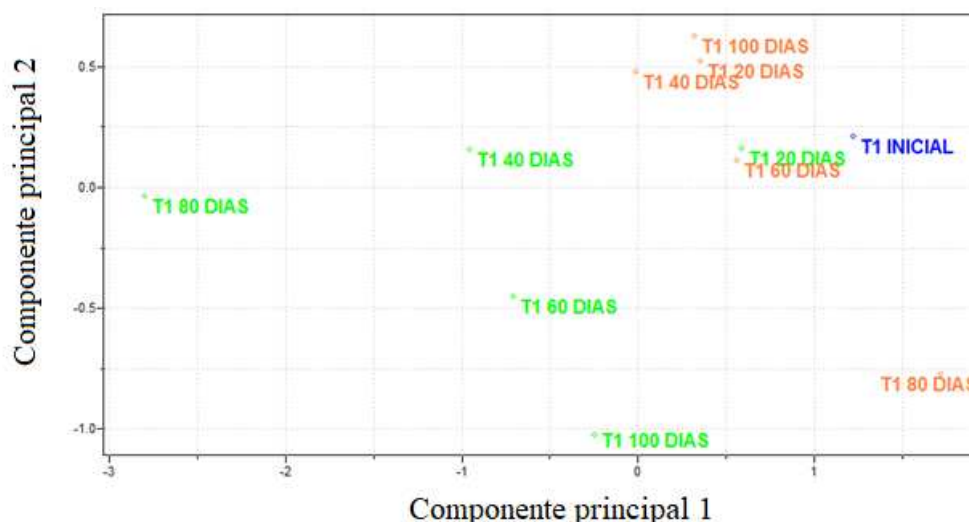
**Figura 40** – Espectros na região do infravermelho médio alisados e tratados por SNV, da região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

O conjunto de dados obtidos é constituído de 307 amostras, entre diferentes testes obtidos pelo planejamento experimental, condição de armazenamento e tempo de avaliação, e de 1932 variáveis, resultando em uma matriz 307 x 1932. A este conjunto de dados, realizou-se inicialmente uma análise exploratória por meio da Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis – PCA*) com objetivo de verificar se a análise espectral poderia prever tendências e agrupamentos entre três diferentes classes: (1) tratamento (diferentes testes), (2) condição de armazenamento (ambiente e acelerado) e, principalmente, (3) tempo de armazenamento. Não foram observadas tendências que pudessem ser correlacionadas a nenhuma das classes pré-estabelecidas, conforme pode ser visto na Figura 41.

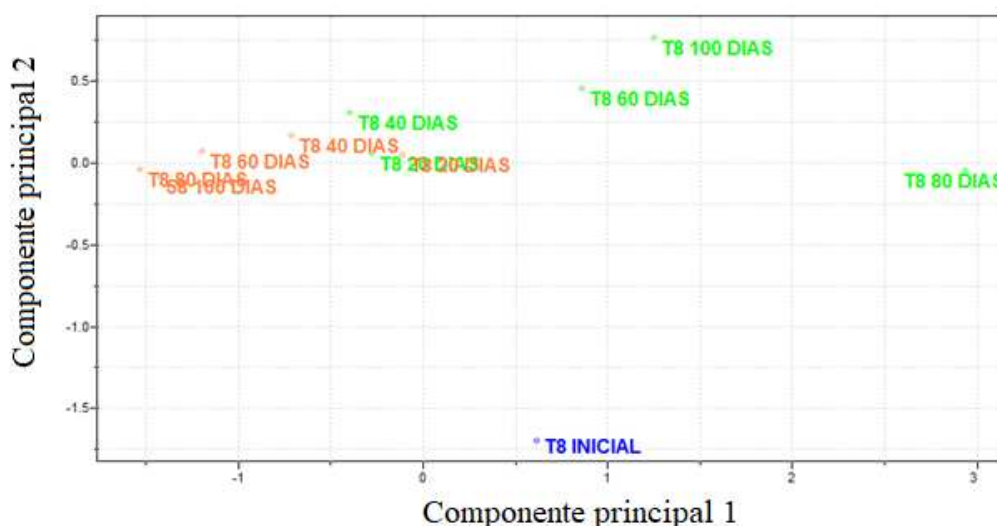


**Figura 41** – Gráfico de escores das componentes principais PC1 e PC2 (amostras no tempo inicial em azul, armazenamento ambiente em verde e armazenamento acelerado em laranja).

Avaliando o gráfico de escores da análise de componentes principais referente somente ao conjunto de amostras referentes ao Teste 1 (Figura 42), observou-se maior diferenciação entre as amostras armazenadas na condição ambiente. A amostra inicial e as amostras em armazenamento acelerado apresentaram maior proximidade no novo espaço formado pelas componentes principais 1 e 2 quando comparadas às amostras em condição ambiente. Esse não consiste em um comportamento esperado, dado que o armazenamento em condição acelerada fornece mais energia para a ocorrência de reações de degradação do produto e, portanto, em diferenças de composição. Diferente do Teste 1, que não recebeu nenhum tratamento antioxidante, o Teste 8 foi formulado com os 3 antioxidantes propostos e sua análise de componentes já demonstra uma tendência de diferenciação evidente entre a amostra inicial em relação às demais, como pode ser visto na Figura 43. Também se observou maior segregação entre amostras armazenadas em condição ambiente e em condição acelerada, embora as amostras armazenadas em temperatura mais elevada permaneçam muito menos dispersas.



**Figura 42** – Gráfico de escores das componentes principais PC1 e PC2, resultantes da PCA das amostras referentes ao Teste 1 do planejamento experimental proposto (amostra no tempo inicial em azul, armazenamento ambiente em verde e armazenamento acelerado em laranja).

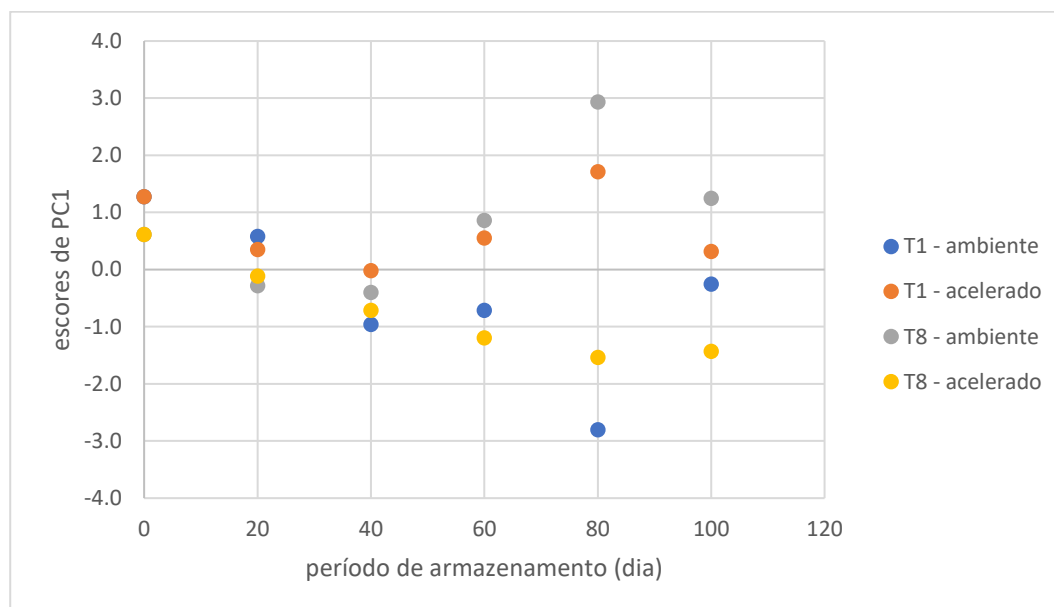


**Figura 43** – Gráfico de escores das componentes principais PC1 e PC2, resultantes da PCA das amostras referentes ao Teste 8 do planejamento experimental proposto (amostra no tempo inicial em azul, armazenamento ambiente em verde e armazenamento acelerado em laranja).

De maneira geral, a maior diferenciação entre as amostras da condição ambiente que entre as amostras da condição acelerada pode sugerir que o armazenamento em temperaturas mais elevadas foi drástico o suficiente para que alterações graduais não fossem detectadas nos espectros obtidos, as quais fornecem informação sobre o mecanismo de oxidação da matriz estudada. Para capturar tais variações espectrais, menores períodos de avaliação seriam indicados.

Outra tendência esperada, porém, não confirmada, seria a relação temporal dos espectros, representados em menor dimensão pelos escores das primeiras

componentes principais. Avaliando separadamente os resultados da análise de componentes principais para os Teste 1 e 8, não se observou correlação dos escores da primeira componente principal (nem de qualquer uma das demais componentes) com o tempo de armazenamento, como pode ser observado na Figura 44.



**Figura 44** – Valores de escores das primeiras componentes principais das PCA dos Teste 1 e 8 em função do tempo de armazenamento.

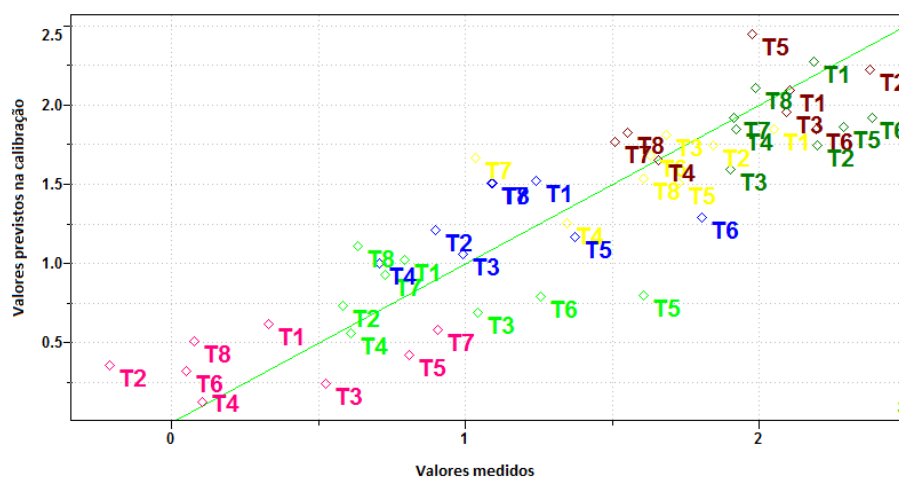
Procedeu-se, em seguida, com o método de Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (*Partial Least Squares – PLS*) utilizando como propriedade de interesse o logaritmo natural do índice de peróxidos. Para o conjunto de dados que considera amostras em condição ambiente e acelerada, o modelo cujo posto químico foi igual a 8 apresentou baixa capacidade de predição e de validação, com coeficientes de correlação de validação e de calibração iguais a 0,653 e 0,793, respectivamente. Quando as amostras em condição acelerada foram excluídas, o posto químico foi reduzido para 3 e os coeficientes de correlação de validação e de calibração subiram para 0,848 e 0,881, respectivamente.

Avaliando o gráfico que compara os valores medidos aos valores previstos pela calibração (Figura 45), pode-se inferir que:

- Amostras com menor tempo de armazenamento (inicial até  $t_2$ ) foram mais facilmente diferenciadas que aquelas com maior tempo de armazenamento, seguindo a mesma tendência observada quando foram comparadas as duas condições de armazenamento.



- O modelo ainda não foi adequado para os propósitos de substituição do método clássico de determinação de índice de peróxidos pelas técnicas espectroscópicas e quimiométricas propostas, uma vez que os resultados previstos e calculados divergiram quanto ao limite máximo de peróxidos em 6% das observações. Por exemplo, na amostra Teste 6 do período  $t_5$ , o valor medido estava acima do limite máximo de 10mEq/kg, mas o previsto estava abaixo. Ademais, o erro relativo médio entre valores previstos na calibração e os valores medidos foi de 28%, indicando relativa falta de ajuste do modelo.



**Figura 45** – Valores previstos e valores medidos do logaritmo natural do índice de peróxidos no modelo de calibração obtido para o conjunto de dados da condição ambiente (amostras iniciais em rosa, 20 dias em verde claro, 40 dias em azul, 60 dias em amarelo, 80 dias em marrom e 100 dias em verde escuro).

A falta de ajuste observada para o modelo reflete a generalização feita ao considerar toda a região espectral medida para a calibração; o processo oxidativo é bastante complexo dada a variedade de compostos que podem ser formados, tanto na etapa de propagação como na etapa de terminação. Na etapa de propagação, pode ser formada grande variedade de peróxidos e hidroperóxidos, inclusive aqueles dos antioxidantes utilizados, que deverão ser originados em detrimento da formação de peróxidos a partir dos ácidos graxos poli-insaturados. No caso dos antioxidantes que doam prótons e são estabilizados pela ressonância do anel aromático (compostos ativos do alecrim e do  $\alpha$ -tocoferol), estes próprios transformam-se em radicais livres, ou seja, geram novas espécies. Neste sentido, construíram-se modelos PLS individuais por tratamento, ainda que com poucas amostras (seis por modelo), apenas para entendimento do mecanismo de atuação de cada antioxidante de acordo com a região espectral com maior variação.

Na Tabela 19 podem ser visualizados alguns parâmetros de cada modelo obtido, assim como o resíduo médio em porcentagem e a região espectral selecionada para os casos em que se aplica. De modo geral, houve melhora significativa nos valores de coeficiente de calibração e do resíduo médio dos modelos individuais em relação ao modelo geral, que compreende todos os testes.

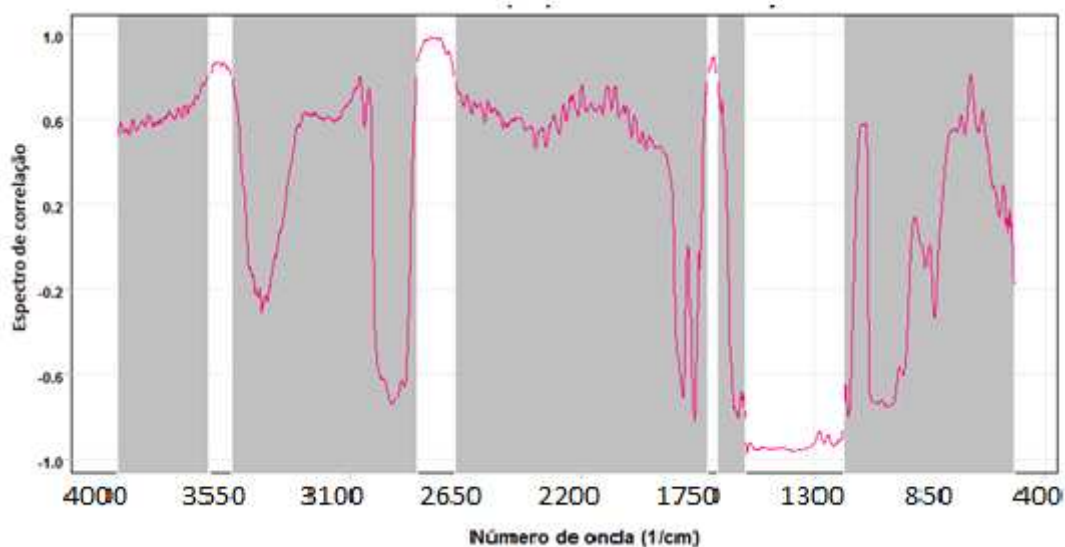
**Tabela 19** – Parâmetros de calibração e validação do modelo FTIR-PLS para determinação do índice de peróxidos para cada tratamento de amostra.

Modelo	rVal <sup>2</sup>	rCal <sup>2</sup>	Resíduo médio (%)	Número de variáveis latentes	Seleção de variáveis	RMSECV	SEC
Teste 1	0,907	0,992	8	3	sem seleção	0,238	0,108
Teste 2	0,913	0,990	7	2	sem seleção	0,308	0,134
Teste 3	0,972	0,998	2	2	sem seleção	0,119	0,037
Teste 4	0,734	0,965	8	3	sem seleção	0,394	0,206
Teste 5	0,680	0,879	12	2	3701-3468 cm <sup>-1</sup> 1677-1467 cm <sup>-1</sup>	0,270	0,229
Teste 6	0,448	0,931	15	2	3636-3547 cm <sup>-1</sup> 2799-2648 cm <sup>-1</sup> 1629-1595 cm <sup>-1</sup> 1480-1085 cm <sup>-1</sup>	0,575	0,284
Teste 7	0,540	0,869	11	2	1659-1649 cm <sup>-1</sup> 1508-1480 cm <sup>-1</sup> 988-984 cm <sup>-1</sup> 703-608 cm <sup>-1</sup>	0,336	0,204
Teste 8	0,867	1,000	0,1	4	sem seleção	0,253	0,018
Todos os testes	0,718	0,776	28	3	sem seleção	0,365	0,339

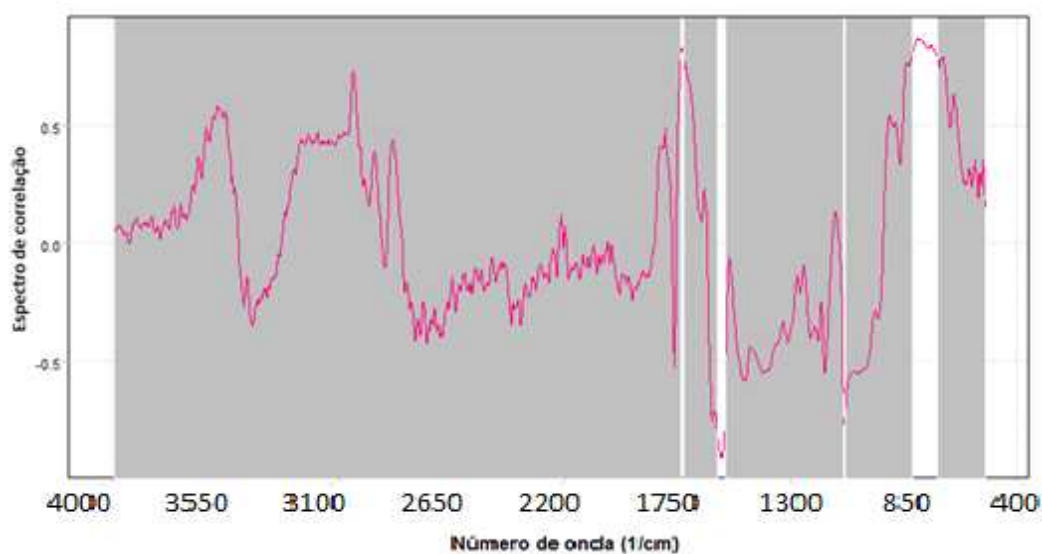
Foi necessário trabalhar com seleção de variáveis para os Testes 5, 6 e 7, todos apresentando  $\alpha$ -tocoferol em comum. No caso dos Testes 6 e 7, a seleção de variáveis foi feita a partir do correlograma gerado nos respectivos modelos PLS, sendo selecionadas regiões cuja correlação foi superior a 0,8 (Figuras 46 e 47). O Teste 5 apresentou um correlograma com diversas regiões com correlação superior a 0,8, mas a seleção destas não resultou em melhoria dos modelos. Então se recorreu ao vetor regressão, selecionando duas bandas bastante resolvidas neste (Figura 48).

Regiões para as quais o coeficiente de correlação é positivo são aquelas onde se observam bandas relacionadas a espécies químicas formadas no processo de oxidação. Da mesma forma, regiões espectrais cujo coeficiente de correlação é negativo fornecem informação sobre espécies que estão sendo consumidas durante o processo de oxidação. Entretanto, a avaliação espectral do grau de oxidação, especialmente referente à etapa de propagação, pode tornar-se bastante difícil, já que

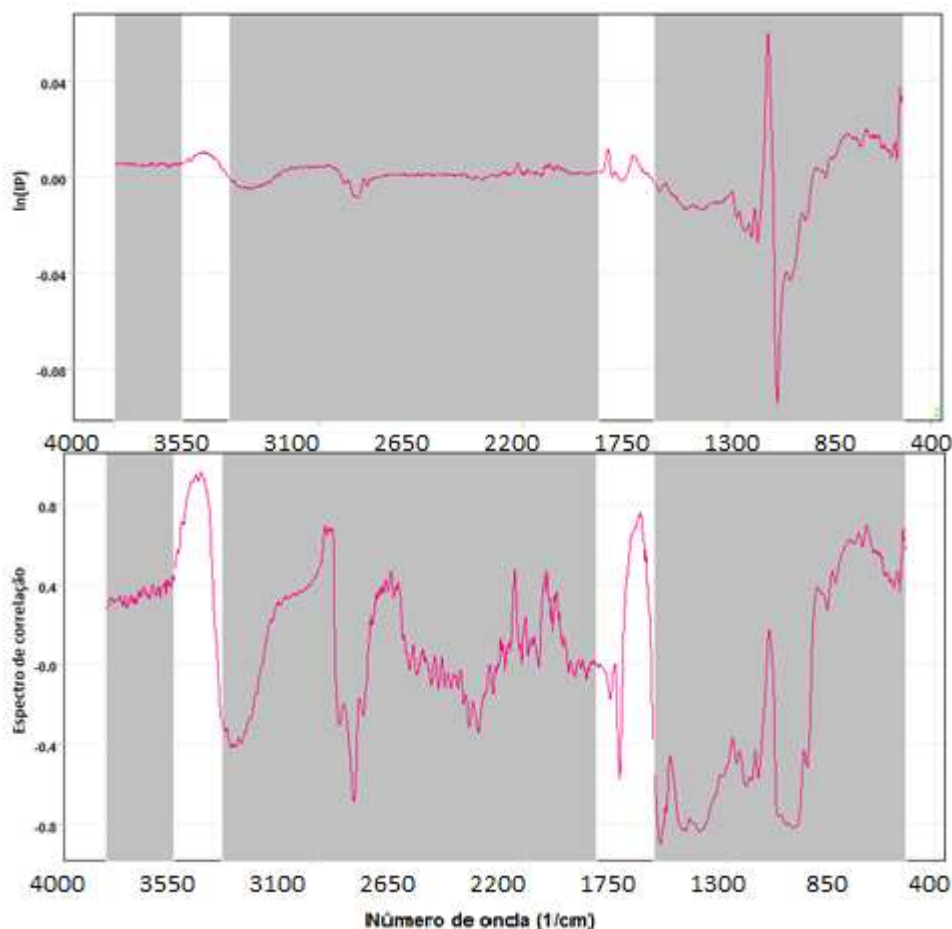
a produção de peróxidos e hidroperóxidos líquida pode ser nula ou próxima de nula após a iniciação da oxidação, uma vez que as espécies radicalares formadas também são prontamente consumidas.



**Figura 46** – Espectro de correlação gerado no modelo PLS do Teste 6 com espectros totais; regiões selecionadas correspondem à correlação superior a 0,8.



**Figura 47** – Espectro de correlação gerado no modelo PLS do Teste 7 com espectros totais; regiões selecionadas correspondem à correlação superior a 0,8.



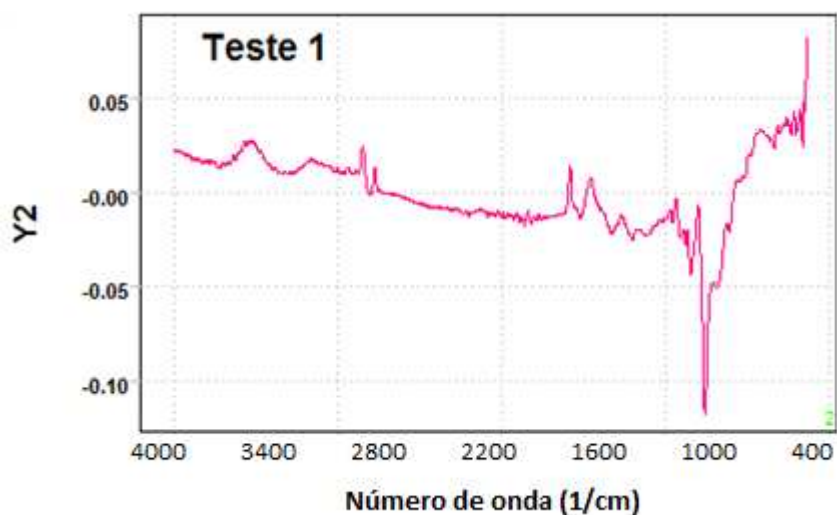
**Figura 48** – Vetor regressão e espectro de correlação gerado no modelo PLS do Teste 5 com espectros totais; regiões selecionadas correspondem a bandas resolvidas no vetor regressão e com correlação superior a 0,7.

Avaliando os vetores regressão de todos os testes avaliados (Figuras 49 a 57), observaram-se algumas regiões comuns a todos os tratamentos de amostra:

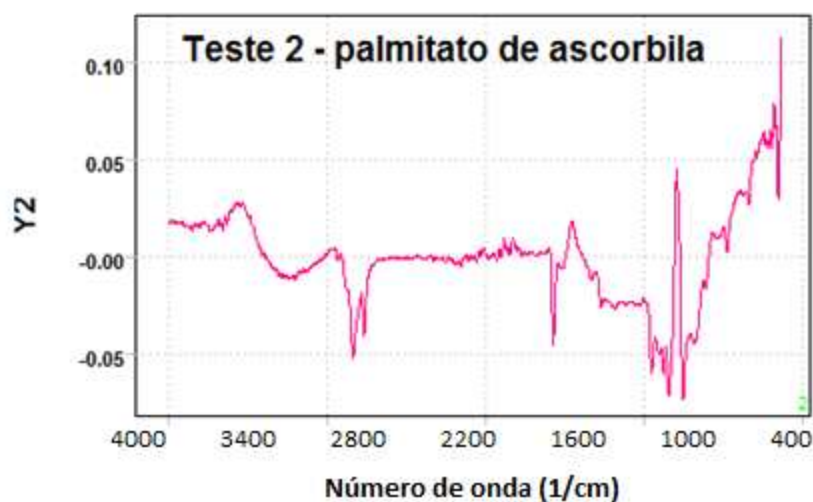
- **3701-3452 $\text{cm}^{-1}$** : de acordo com Maggio et al.<sup>51</sup>, a banda de estiramento atribuída à ligação O-H dos hidroperóxidos, cujo sinal é pouco intenso, está localizada na região de 3444  $\text{cm}^{-1}$ , sendo de fato esperada uma variação positiva nesta região para todos os testes dada a geração destas espécies.
- **1696-1556 $\text{cm}^{-1}$** : pode ser atribuída à ligação C=O dos aldeídos e cetonas que se formam no processo de terminação da oxidação; por isso, seu sinal positivo.
- **1059-924 $\text{cm}^{-1}$** : pode ser atribuída às ligações C=C referentes às insaturações ao longo das cadeias dos ácidos graxos insaturados; apresenta sinal negativo no vetor regressão pois a intensidade da banda é diminuída devido à deslocalização do elétron após abstração de um próton localizado entre duas ligações duplas conjugadas.

Outras duas regiões relevantes, de acordo com os vetores regressão, são as bandas de intensidade média de  $3000\text{-}2700\text{ cm}^{-1}$ , que se refere ao estiramento da ligação O-H, e de  $1782\text{-}1682\text{ cm}^{-1}$ , referente ao estiramento da ligação C=C dos alcenos. Os valores do vetor regressão destas duas bandas para os Testes 2 e 6, ambos contendo palmitato de ascorbila, são negativos. Isso ocorre devido à abstração de um próton do antioxidante e devido à abstração do próton localizado entre duas ligações duplas de uma molécula de ácido graxo poli-insaturado, como mencionado anteriormente. De fato, estes foram os tratamentos com os maiores valores de índice de peróxidos e corroboram com a observação de que o palmitato de ascorbila apresentou atividade pró-oxidante. Nos Testes 4 e 8, que também contêm palmitato de ascorbila, não foi observada relevância destas regiões de acordo com seus respectivos vetores de regressão; nestes tratamentos, o alecrim, que foi considerado o melhor antioxidante, estava presente, compensando a atividade insatisfatória do palmitato de ascorbila.

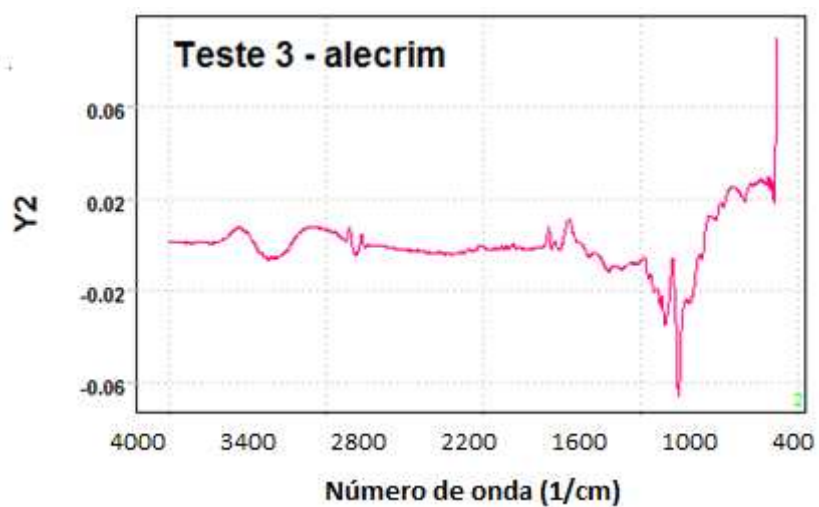
Além do fato de que cada tratamento antioxidante apresenta um diferente mecanismo de reação, gerando espécies químicas que respondem em diferentes regiões do espectro do infravermelho médio, é importante destacar que a matriz estudada apresenta uma distribuição heterogênea da fase lipídica<sup>45</sup>. A maior parte do conteúdo lipídico consiste em uma fração propriamente encapsulada, mas também há uma outra fração chamada de livre, que fica na superfície da microcápsula e, por isso, fica mais exposta ao oxigênio e à luz. Na determinação do índice de peróxidos, a extração realizada previamente à análise tem por objetivo alcançar essa fração mais interna. Já a determinação do espectro na região do infravermelho médio, pela técnica adotada no presente estudo (reflectância total atenuada), trata-se de uma análise mais superficial, possivelmente restrita em grande parte à fração de óleo livre. Tais divergências podem dificultar a correlação entre os dados obtidos pelo método clássico e pelo método proposto.



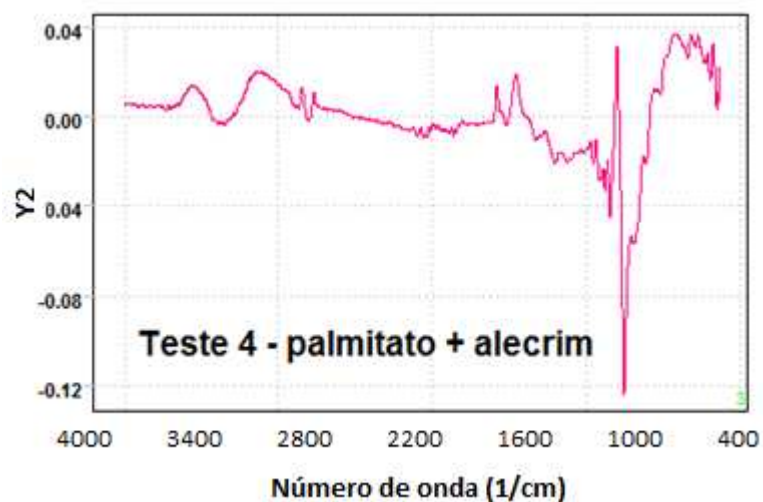
**Figura 49** – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 1, gerado sem seleção de variáveis.



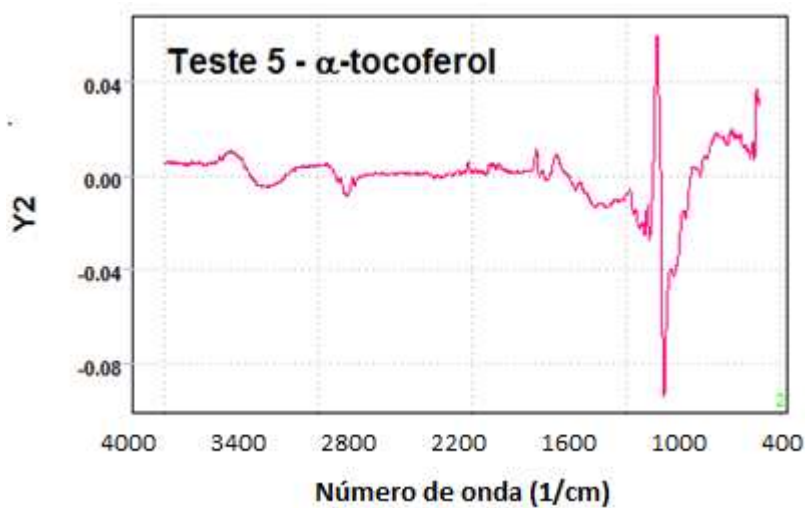
**Figura 50** – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 2, gerado sem seleção de variáveis.



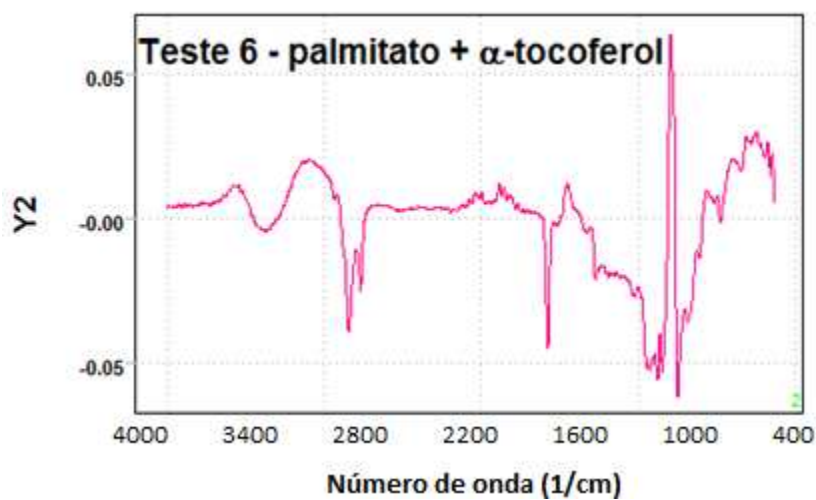
**Figura 51** – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 3, gerado sem seleção de variáveis.



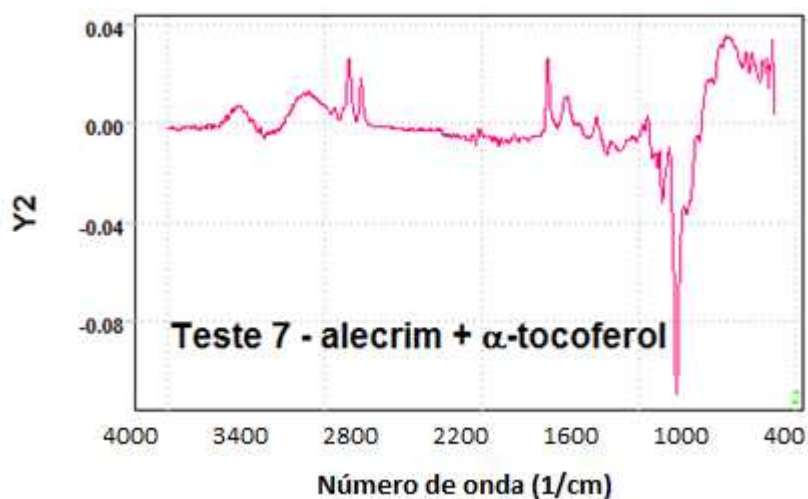
**Figura 52** – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 4, gerado sem seleção de variáveis.



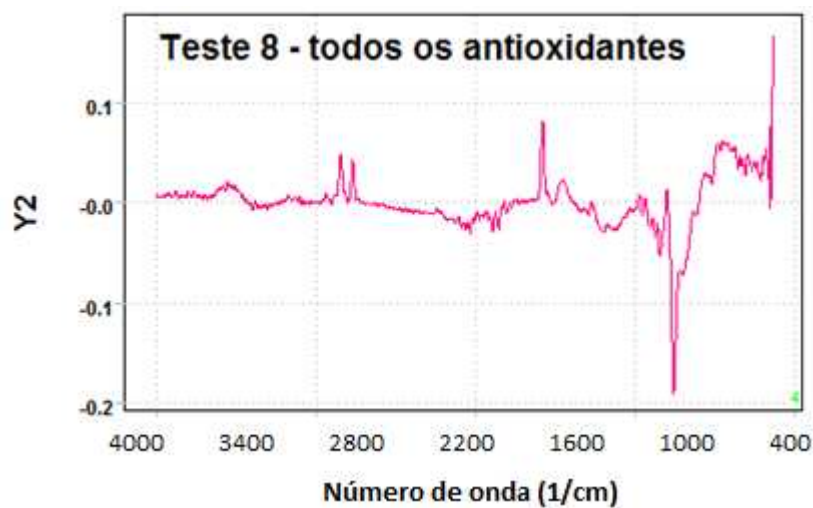
**Figura 53** – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 5, gerado sem seleção de variáveis.



**Figura 54** – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 6, gerado sem seleção de variáveis.



**Figura 55** – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 7, gerado sem seleção de variáveis.



**Figura 56** – Vetor regressão obtido para o modelo PLS da amostra Teste 8, gerado sem seleção de variáveis.



## 6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, é possível inferir que o extrato de alecrim puro apresenta efeito significativo na estabilidade à oxidação da blenda constituída dos óleos de canola e de soja, garantindo maior período de indução para a matriz avaliada se comparado ao palmitato de ascorbila e ao  $\alpha$ -tocoferol, sejam estes puros ou em combinação. Graficamente, todos os testes contendo o extrato de alecrim (puro ou em combinação) não apresentaram evidência de início da etapa de propagação, que seria marcada pela aceleração da produção dos peróxidos a partir de um dado período de armazenamento. Ademais, os valores para índice de peróxidos observados para estas amostras foram significativamente inferiores ao controle e expressivamente menores que os demais testes em 100 dias de armazenamento acelerado, corroborando com o efeito positivo do extrato de alecrim na retardação da oxidação para a matriz estudada.

Como técnica alternativa ao método clássico para determinação do índice de peróxidos, principalmente para a etapa de pesquisa e desenvolvimento de produtos, observou-se grande potencial para o método de determinação da estabilidade oxidativa. Os resultados obtidos com tal técnica confirmaram o efeito positivo do uso do extrato de alecrim como tratamento antioxidante da blenda de óleo microenpasulada avaliada, além de revelar outro efeito que não pôde ser detectado a partir dos resultados do método clássico, que é o efeito antagônico entre palmitato de ascorbila e  $\alpha$ -tocoferol. Ademais, os resultados de índice de estabilidade oxidativa foram determinados em uma única análise, com duração de pouco mais de uma hora, sem necessidade de preparo prévio de amostra ou de monitoramento em diversos períodos. Para setores de pesquisa e desenvolvimento, a aplicação de uma técnica rápida e de simples execução como essa se torna interessante para acelerar a triagem de protótipos, definindo assim os melhores aditivos a serem empregados e suas respectivas dosagens.

No caso do emprego da espectroscopia na região do infravermelho como método alternativo, principalmente para o controle de qualidade, encontraram-se certas limitações, principalmente quanto à baixa discriminação de amostras em diferentes condições e períodos de armazenamento e, desta forma, ao grau de oxidação. Observou-se maior dificuldade do método na discriminação de amostras,

principalmente aquelas em estágio de oxidação mais avançado, ou seja, com maiores valores de índice de peróxidos. O método mostrou-se mais sensível e preciso para a avaliação do grau de oxidação para amostras armazenadas em condição ambiente, ainda em etapa de indução. Desta forma, modelos quimiométricos poderiam ser construídos como ferramenta no controle de qualidade da blenda de óleos microenpasulados avaliada, com base nos resultados obtidos para a regressão por mínimos quadrados. Entretanto, conclui-se que o modelo tenha de ser específico para um dado tratamento antioxidante, dada as diferenças espectrais observadas devido ao mecanismo de ação de cada espécie antioxidante possível.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) TNONLINE. SBC alerta: 170 mil pessoas já morreram de doenças cardiovasculares no Brasil em 2018. Disponível em: <https://tnonline.uol.com.br/noticias/cotidiano/67,468443,17,07,sbc-alerta-170-mil-pessoas-ja-morreram-de-doencas-cardiovasculares-no-brasil-em-2018>. Acesso em: 17/08/2018.
- (2) GOVERNO DO BRASIL. Número de brasileiros com diabetes cresceu 61,8% em 10 anos. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2017/11/numero-de-brasileiros-com-diabetes-cresceu-61-8-em-10-anos>. Acesso em: 17/08/2019.
- (3) AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Documento de referência para guia de boas práticas industriais, 2017.
- (4) INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Pesquisa Nacional de Saúde, Percepção do estado de saúde, estilos de vida e doenças crônicas. Rio de Janeiro, 2014.
- (5) INSTITUTE FOR HEALTH METRICS AND EVALUATION. Disponível em: <http://www.healthdata.org/brazil?language=129>. Acesso em: 17/08/2019.
- (6) INTERNATIONAL FOOD INFORMATION COUNCIL FOUNDATION. Disponível em: <https://www.foodinsight.org/newsletters/heart-heart-discussion-about-saturated-fats>. Acesso em: 17/08/2019.
- (7) INTERNATIONAL FOOD INFORMATION COUNCIL FOUNDATION. Dietary fats: balancing health & flavor. Disponível em: [https://www.foodinsight.org/Dietary\\_Fats\\_Balancing\\_Health\\_Flavor](https://www.foodinsight.org/Dietary_Fats_Balancing_Health_Flavor). Acesso em: 17/08/2019.
- (8) CONSUMIDOR MODERNO. O que é *clean label*? Especialista aponta conceito como tendência na alimentação. Disponível em: <https://www.consumidormoderno.com.br/2019/04/22/o-que-e-clean-label/>. Acesso em: 22/12/2019.
- (9) KERRY HEALTH AND NUTRITION INSTITUTE™. Webinar – Clean Label: More Than Ingredients. Disponível em: <https://khni.kerry.com/news/blog/webinar-clean-label-more-than-ingredients/>. Acesso em: 22/12/2019.

- (10) KERRY. Rótulo Limpo. Disponível em: <https://www.kerry.com/br-pt/expertise/product-innovation/clean-label>
- (11) AKOH, C.C.; MIN, D.B. Food lipids. Chemistry, nutrition and biotechnology. New York: Marcel Dekker, 2002.
- (12) FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Codex Standard for named vegetable oils Codex-Stan 210-1999. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/004/y2774e/y2774e04.htm>. Acesso em: 20/09/2018.
- (13) BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. Biochemistry, 6<sup>o</sup> Edition. New York: W.H. Freeman and Company, 2006.
- (14) DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. Fennema's food chemistry. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2008.
- (15) NELSON, D.L.; COX, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- (16) SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. Organic Chemistry, 8<sup>o</sup> Edition. John Wiley & Sons, Inc., 2004.
- (17) ARNOLDI, A. Functional foods, cardiovascular disease and diabetes. Boca Raton: Woodhead Publishing/CRC Press, 2004.
- (18) MORRIS, M.C.; EVANS, D.A.; BIENIAS, J.L.; TANGNEY, C.C.; BENNET, D.A.; AGGARWAL, N.; SCHNEIDER, J.; WILSON, R.S. Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. Arch Neurol, 60, p. 194-201, 2003.
- (19) HAMMAD, S.; PU, S.; JONES, P.J. Current evidence supporting the link between dietary fatty acids and cardiovascular disease. Lipids, 51 (5), p. 507-517, 2016.
- (20) THERANY, E.A.; JACQUOT, M.; GAIANI, C.; IMRAN, M.; DESOBRU, S.; LINDER, M. Beneficial effects and oxidative stability of  $\omega$ -3 long-chain polyunsaturated fatty acids. Trends in Food Science & Technology, 25, p. 24-33, 2012.
- (21) MOZAFFARIAN, D. Dietary and Policy Priorities for Cardiovascular Disease, Diabetes, and Obesity. Circulation, 133 (2), p.187-225, 2016.
- (22) LEVI, Y.F.; JONHAGEN, E.; CEDERHOLM, T.; BASUN, H.; IRVING, G.F.; GARLIND, A.; VEDIN, I.; VESSBY, B.; WAHLUND, L.O.; PALMBLAD, J.  $\omega$ -3 Fatty acid treatment in 174 patients with mild to moderate Alzheimer disease: Omega study. Archives of Neurology, 63, p.1402-1408, 2006.

- (23) RODRIGUES, N.R.; BELTRÁN, S.; JAIME, I.; DIEGO, S.M.; SANZ, M.T.; CARBALLIDO, J.R. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: a review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, p. 1-12, 2010.
- (24) FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *Fats and fatty acids in human nutrition: report of an expert consultation*. Geneva, 2008.
- (25) RUXTON, C.H.S.; REED, S.C.; SIMPSON, M.J.A.; MILLINGTON, K.J. The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 17, p. 449-459, 2004.
- (26) SIMOPOULOS, A.P. Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *Journal of the American College of Nutrition*, 21:6, p.495-505, 2002.
- (27) MORRIS, M.C.; EVANS, D.A.; BIENIAS, J.L.; TANGNEY, C.C.; BENNET, D.A.; AGGARWAL, N.; SCHNEIDER, J.; WILSON, R.S. Dietary fats and the risk of incident Alzheimer disease. *Archives of Neurology*, 60, p. 194-201, 2003.
- (28) MORRIS, M.C.; EVANS, D.A.; BIENIAS, J.L.; TANGNEY, C.C.; BENNET, D.A.; WILSON, R.S.; AGGARWAL, N.; SCHENIDER, J. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Archives of neurology Neurol*, 60, p.940-946, 2003.
- (29) QUINN, J.F.; RAMAN, R.; THOMAS, R.G.; MAURO, K.Y.; NELSON, E.B.; DYCK, C.V.; GALVIN, J.E.; EMOND, J.; JACK, C.R.; WEINER, M.; SHINTO, L.; AISEN, P.S. Docosahexaenoic acid supplementation and cognitive decline in Alzheimer disease. *Journal of the American Medical Association*, 304 (17), p.1903-1911, 2010.
- (30) FOTUHI, M.; MOHASSEL, P.; YAFFE, K. Fish consumption, long-chain omega-3 fatty acids and risk of cognitive decline or Alzheimer disease: a complex association. *Nature Clinical Practice: Neurology*, 5(3), p.140-152, 2009.
- (31) GU, Y.; NIEVES, J.W.; STERN, Y.; LUCHSINGER, J.A.; SCARMEAS, N. Food combination and Alzheimer disease risk. *Archives of Neurology*, 67 (6), p.699-706, 2010.
- (32) CHAN, H.W.S. *Autoxidation of unsaturated lipids*. Michigan: Academic Press, 1987.

- (33) ELDIN, A.K.; POKORNÝ, J. Analysis of lipid oxidation. Illinois: AOCS Press, 2005.
- (34) BREWER, M.S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive reviews in food Science and food safety*, 10, p.221-247, 2011.
- (35) EM, O. Rancidez Oxidativa: os tipos e os efeitos da rancidez oxidativa em alimentos. *Food Ingredients Brasil*, 29, p.38-45, 2014.
- (36) OMURA, K. Antioxidant synergism between butylated hydroxy anisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72, p.1565-1570, 1995.
- (37) NIMSE, S.B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *Royal Society of Chemistry Advances*, 5, p.27986-28006, 2015.
- (38) JENSEN, L.B.; SKOVGAARD, I.M.; SKIBSTED, L.H.; BERTELSEN, G. Antioxidant synergism between tocopherols and ascorbyl palmitate in cooked, minced turkey. *Zeitschrift für Lebensm Unters Forsch*, 199, p.201-213, 1994.
- (39) SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, 22(1), p.94-103, 1999.
- (40) ATKINS, P.; JONES, L. Princípios de Química – Questionando a vida moderna e o meio ambiente. Porto Alegre: Bookman, 2001.
- (41) SIMOPOULOS, A.P. Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 60, 502-507, 2006.
- (42) JEYAKUMARI, A.; ZYNUDHEEN, A.A.; PARVATHY, U. Microencapsulation of bioactive food ingredients and controlled release – a review. *MOJ Food Processing & Technology*, v.2, n.6, 00059, 2016.
- (43) ERATTE, D.; GENGENBACH, T.R.; DOWLING, K.; BARROW, C.J.; ADHIKARI, B. Survival, oxidative, and surface characteristics of spray dried co-microcapsules containing omega-3 fatty acids and probiotic bacteria. *Drying Technology*, v.34, n.16, 1926-1935, 2016.
- (44) AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v.16, n.1, 89-97, 2005.
- (45) BAKRY, A.M.; ABBAS, S.; ALI, B.; MAJEED, H.; ABOUELWAFI, M.Y.; MOUSA, A.; LIANG, L. Microencapsulation of oils: a comprehensive review of

- benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews In Food Science & Food Safety*, 15, P.143-182, 2016.
- (46) NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation Technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815, 2011.
- (47) CALCO, P.; CASTAÑO, A.L.; LOZANO, M.; GÓMEZ, D.G. Micro-encapsulation of refined olive oil: influence of capsule wall components and the addition of antioxidant additives on the shelf life and chemical alteration. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92, 2689-2695, 2012.
- (48) CARNEIRO, H.C.F.; TONON, R.V.; GROSSO, C.R.F.; HUBINGER, M.D. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of Food Engineering*, 115, p.443-451, 2013.
- (49) BRASIL. Resolução RDC nº21, de 13 de maio de 2015. Aprova o Regulamento técnico de fórmulas para nutrição enteral. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br).
- (50) FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). *Fats and fatty acids in human nutrition*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2010.
- (51) MAGGIO, R.M.; VALLI, E.; BENDINI, A.; CARAVACA, A.M.G.; TOSCHI, T.G.; CERRETANI, L. A spectroscopic and chemometric study of virgin olive oils subjected to thermal stress. *Food Chemistry*, 127, p.216-221, 2011.
- (52) DUTCOSKY, S.D. *Análise sensorial de alimentos*. Pucpress, 2013.
- (53) MAGGIO, R.M. KAUFMAN, T.S.; CARLO, M.D.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; CICHELLI, A.; COMPAGNONE, D. Monitoring of fatty acid composition in virgin olive oil by Fourier transformed infrared spectroscopy coupled with partial least squares. *Food Chemistry*, 114, p.1549-1554, 2009.
- (54) PARREIRA, T.F.; FERREIRA, M.M.C.; SALES, H.J.S.; ALMEIDA, W.B. Quantitative Determination of Epoxidized Soybean Oil Using Near-Infrared Spectroscopy and Multivariate Calibration. *Applied Spectroscopy*, 56 (12), p.1607-1614, 2002.

- (55) MORGANO, M.A.; FARIA, C.G.; FERRÃO, M.F.; BRAGAGNOLO, N.; FERREIRA, M.M.C. Determinação de proteína em café cru por espectroscopia NIR e regressão PLS. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 25(1), 25-31, 2005.
- (56) SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. *Princípios de Análise Instrumental*, 5ª Edição. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- (57) MARTENS, H.; RUSWURM Jr, H. *Food Research and Data Analysis*. London and New York: Applied Science Publishers LTD, 1983.
- (58) SCHULZ, H.; BARANSKA, M.; BELZ, H.H.; ROSCH, P.; STREHLE, M.A.; POPP, J. Chemotaxonomic characterization of essential oil plants by vibrational spectroscopy measurements. *Vibrational Spectroscopy*, 35, 81-86, 2004.
- (59) LEE, D.S.; NOH, B.S.; BAE, S.Y.; KIM, K. Characterization of fatty acids composition in vegetable oils by gas chromatography and chemometrics. *Analytica Chimica Acta*, 358, 163-175, 1998.
- (60) SINANOGLU, V.J.; KOKKOTOU, K.; FOTAKIS, C.; STRATI, I.; PROESTOS, C.; ZOUMPOULAKIS, P. Monitoring the quality of  $\gamma$ -irradiated macadamia nuts based on lipid profile analysis and Chemometrics. Traceability models of irradiated samples. *Food Research International*, 60, 38-47, 2014.
- (61) NI, Y.; MEI, M.; KOKOT, S. Analysis of complex, processed substances with the use of NIR spectroscopy and chemometrics: Classification and prediction of properties – The potato crisps example. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 105, 147-156, 2011.
- (62) GEORGIEVA, M.; NEBOJAN, I.; MIHALEV, K.; YONCHEVA, N.; KLJUSURIC, J.G.; KURTANJEK, Z. Application of NIR spectroscopy and chemometrics in quality control of wild berry fruit extracts during storage. *Croatian Journal of Food Technology, Biotechnology and Nutrition*, 8, 67-73, 2013.
- (63) FERREIRA, M.M.C. *Quimiometria – Conceitos, Métodos e Aplicações*. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2015.
- (64) WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. *Principal Component Analysis*. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2, p.37-52, 1987.
- (65) GELADI, P.; KOWALSKI, B.R. Partial Least-Squares regression: a tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 185, 1-17, 1986.
- (66) BRASIL. Resolução RDC nº160, de 06 de junho de 2017. Dispõe sobre os aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em



fórmulas para nutrição enteral e dá outras providências. Disponível em:  
[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br).

- (67) MALVERN PANALYTICAL. Difração laser (LD, Laser diffraction). Disponível em: <https://www.malvernpanalytical.com/br/products/technology/light-scattering/laser-diffraction>. Acesso em: 29/12/2019.
- (68) ANTON PAAR. Medidor da estabilidade à oxidação: RapidOxy 100. Disponível em: <https://www.anton-paar.com/br-pt/produtos/detalhes/medidor-de-estabilidade-da-oxidacao-rapidoxy-100/>. Acesso em: 29/12/2019.
- (69) CÁNOVAS, G.V.B.; MOLINA, J.J.F.; ALZAMORA, S.M.; TAPIA, M.S.; MALO, A.L.; CHANES, J.W. Handling and Preservation of Fruits and Vegetables by Combined Methods for Rural areas. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2003.
- (70) Critical Values of Dunnett's Test [www.stat.ufl.edu/~winner/tables/dunnett-2side.pdf](http://www.stat.ufl.edu/~winner/tables/dunnett-2side.pdf).
- (71) NETO, B.B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Como Fazer Experimentos – Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria, 4ª Edição. Porto Alegre: Bookman, 2010.
- (72) VELASCO, J.; MARMESAT, S.; DOBARGANES, C.; RUIZ, G.M. Heterogeneous aspects of lipid oxidation in dried microencapsulated oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 1722-1729, 2006.
- (73) GRAU, A.; GUARDIOLA, F.; GRIMPA, S.; BARROETA, A.C.; CODONY, R. Oxidative Stability of Dark Chicken Meat Through Frozen Storage: Influence of Dietary Fat and  $\alpha$ -Tocopherol and Ascorbic Acid Supplementation. Poultry Science, 80, 1630-1642, 2001.