

ESTUDO DA EFICIÊNCIA DE ANTIOXIDANTES ATRAVÉS DO EMPREGO DO DELINEAMENTO SIMPLEX-CENTRÓIDE

DIONIÍSIO BORSATO^a
UBIRAJARA DORIVAL DINIZ^b
PATRÍCIA VALÉRIA PALADINO^c

RESUMO

O efeito antioxidante do EDTA, ácido ascórbico e ácido cítrico e o sinergismo entre eles foram investigados em óleo de soja produzido na região de Londrina. Os ensaios seguiram o delineamento simplex-centróide utilizando como resposta o índice de peróxido (IP). A função resposta obtida foi analisada em relação a sua variabilidade e significância. Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que o ácido cítrico e a mistura de ácido ascórbico com ácido cítrico são bastante eficazes na prevenção da autoxidação de lipídios de óleo de soja.

PALAVRAS-CHAVE: *Edta; Ácido ascórbico; Ácido cítrico; Autoxidação do óleo de soja; Antioxidantes; Sinergismo; Simplex-centróide.*

1 - INTRODUÇÃO

A adição de produtos químicos aos alimentos, para a sua conservação, não é um processo novo. O homem pré-histórico, com a descoberta do fogo, criou o processo de

defumação. Depois, aprendeu a utilizar o sal na conservação de carnes, condimentos para melhorar a palatabilidade de certos alimentos e a realizar fermentações de produtos vegetais e animais¹⁰.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca

^a- Departamento de Química — CCE/Universidade Estadual de Londrina

^b- Departamento de Matemática Aplicada — CCE/Universidade Estadual de Londrina.

^c- Bolsista CNPq.

de 20% da alimentação produzida no mundo perde-se por deterioração. Levando-se em conta que milhares de seres humanos perecem, diariamente, vitimados pela fome; é injustificável essa perda, o que motivou a muito tempo a adoção de processos de preservação de alimentos².

Os processos de preservação de alimentos tem como principal objetivo o aumento da sua vida útil, de modo a permitir o transporte e a distribuição convenientes. As limitações da vida útil de produtos alimentícios são estabelecidas principalmente pelo crescimento microbiano, atividade enzimática, reações de escurecimento não enzimico e oxidação de lipídios^{1, 3, 8, 9, 11}.

O processo de oxidação é o principal fator envolvido na deterioração dos componentes lipídicos dos alimentos¹¹. Os componentes lipídicos, via oxidação, sofrem transformações que freqüentemente conduzem ao desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, tornando os alimentos impróprios para o consumo e, eventualmente, dando origem a compostos de natureza tóxica¹⁶.

As principais alterações das substâncias graxas e dos alimentos ricos em gorduras estão relacionadas à ausência ou à insuficiência de compostos naturais de ação antioxidante, ao desaparecimento dos protetores naturais, devido ao processamento industrial, a presença do ar, composição química das gorduras, luz (especialmente na faixa do U.V.), calor e íons de metais pesados^{4, 6}.

A preservação de alimentos contra a autooxidação de lipídios é de particular importância em um país como o Brasil, que apresenta condições climáticas tropicais e subtropicais, responsáveis em grande parte pela perda de milhões de toneladas de produtos alimentícios por ano¹⁷.

Para estabilizar as gorduras, os antioxidantes são utilizados nos E.U.A. desde 1947 e seus efeitos inibitórios são atribuídos a doação de elétrons ou hidrogênio ao radical livre formado⁵.

Nos últimos anos, a tendência de se empregar gorduras polinsaturadas, na dieta alimentar, tem provocado um aumento na susceptibilidade de certos alimentos à degradação oxidativa. Essa tendência parece que vai continuar e novos sistemas antioxidantes mais potentes serão necessários para preservar esses alimentos contra a autooxidação de substâncias gordurosas¹⁷.

Para serem efetivos, os antioxidantes, precisam ser adicionados o mais cedo possível no processo de fabricação, pois não revertem o processo de rancidez oxidativa do óleo⁶. Em muitos casos, um antioxidante sozinho não oferece uma proteção segura contra a oxidação. Por isso, muitas vezes, uma mistura de antioxidantes pode, através do efeito sinérgico, apresentar uma ação mais eficaz¹³.

De acordo com HARE⁷, em experimentos envolvendo mistura de dois ou mais componentes, a resposta que interessa depende da proporção dos ingredientes e não da soma total (massa ou volume) destes na mistura. O mesmo autor cita, ainda, que é impossível variar um dos componentes e manter os outros constantes, pois a medida que um deles sofre variação, mantendo-se a soma total, os outros sofrerão modificações em seus percentuais. Por esta razão, delineamentos experimentais convencionais como, por exemplo, a metodologia da superfície de resposta (MSR)

não podem ser aplicados em experimentos que envolvem mistura de componentes.

SCHEFFÉ^{14, 15} propôs uma representação polinomial, obtida por um arranjo de vértices ordenados uniformemente no espaço (simplex-centróide), que é muito conveniente por não apresentar os problemas que os delineamentos fatoriais apresentam nos casos dos experimentos que envolvem misturas de componentes.

No presente trabalho a intenção foi introduzir as idéias de Scheffé para verificar a eficiência e a ação sinérgica de antioxidantes (EDTA, ácido ascórbico e ácido cítrico) em óleo de soja comestível, utilizando como resposta o índice de peróxido.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

Óleo vegetal - Foi empregado óleo de soja refinado da marca "Ouro Azul" gentilmente cedido pela indústria "Braswey S.A."

Antioxidantes - Os antioxidantes testados foram: EDTA, ácido ascórbico e ácido cítrico.

Preparo da amostra - Amostras de aproximadamente 2 gramas de óleo contendo o antioxidante ou a mistura de antioxidantes (no máximo 0,01% em ambos os casos) foram pesadas em copos de becker de 25ml e estocadas em estufa a 50°C, juntamente com o controle, seguindo o delineamento experimental apresentado na figura 1.

Índice de peróxido — Os dados dos índices de peróxido foram obtidos em triplicata (7x3 ensaios) utilizando o método Cd 8-53 da AOCS (12).

Simplex-Centróide - Foi utilizado o delineamento experimental simplex-centróide com 2q-1 combinações de misturas onde q é o número de componentes (variáveis) cuja soma é 1,0 ou 100%, isto é:

$$\sum_{i=1}^q x_i = 1,0$$

A figura 1 é a representação gráfica quando q=3. Os três pontos (1,0,0) ou $x_1 = 1$ e $x_2 = x_3 = 0$; (0,1,0) ou $x_2 = 1$ e $x_1 = x_3 = 0$ e (0,0,1) ou $x_3 = 1$ e $x_1 = x_2 = 0$ são os três vértices do triângulo. Os pontos (1/2, 1/2, 0); (1/2, 0, 1/2) e (0, 1/2, 1/2) representam a mistura binária e estão localizados no meio das arestas do triângulo. O ponto $(x_1, x_2, x_3) = (1/3, 1/3, 1/3)$ é o centróide do triângulo^{7, 14, 15}.

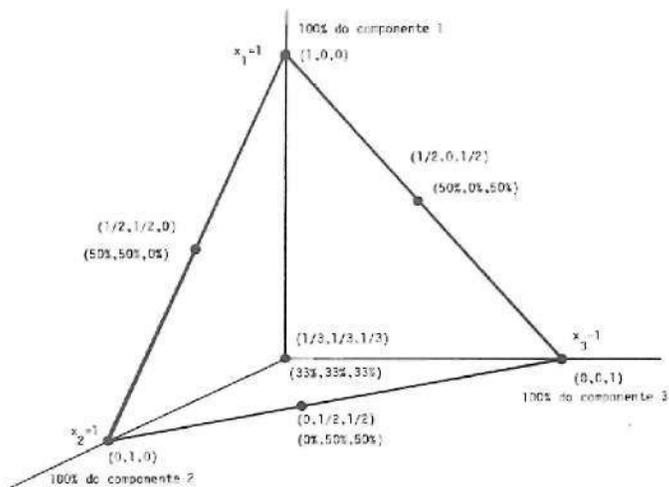


Figura 01 – Delineamento Simplex-Centróide para mistura com 3 componentes

Modelo Matemático – A função utilizada foi do tipo

$$\eta(x,z) = \sum_{1 \leq i \leq q} \gamma_{ix_i}^{\circ} + \sum_{1 \leq i \leq j \leq q} \gamma_{ijx_i x_j}^{\circ} + \gamma_{123}^{\circ} x_1 x_2 x_3 \dots \dots \dots \text{eq. 1}$$

onde, η representa a função resposta dos dados experimentais, x_1 , x_2 e x_3 são as variáveis independentes e correspondem a percentagem de EDTA, ácido ascórbico e ácido cítrico, na mistura, respectivamente, z é a variável tempo que foi codificada para $z = -1$ para o tempo de 7 dias e $z = +1$ para o tempo de 15 dias. Os parâmetros γ_i° , γ_{ij}° e γ_{123} foram estimados, utilizando as médias das respostas (Y) observadas nos pontos do delineamento simplex-centróide, de acordo com as equações:

$$\gamma_i^{\circ} = \bar{Y}_i, i = 1, 2, 3, \dots \dots \dots \text{eq.2}$$

$$\gamma_{ij}^{\circ} = 4 \bar{Y}_{ij} - 2(\bar{Y}_i + \bar{Y}_j), i < j, ij = 1, 2, 3 \text{ eq.3}$$

$$\gamma_{123}^{\circ} = 27 \bar{Y}_{123} - 12(\bar{Y}_{12} + \bar{Y}_{13} + \bar{Y}_{23}) + 3(\bar{Y}_1 + \bar{Y}_2 + \bar{Y}_3) \dots \dots \dots \text{eq.4}$$

A função utilizada para o modelo combinado foi do tipo:

$$\eta(x,z) = \hat{\gamma}_1^{\circ} x_1 + \hat{\gamma}_1^1 x_1 z + \hat{\gamma}_2^{\circ} x_2 + \hat{\gamma}_2^1 x_2 z + \hat{\gamma}_3^{\circ} x_3 + \hat{\gamma}_3^1 x_3 z + \hat{\gamma}_{12}^1 x_1 x_2 z + \hat{\gamma}_{13}^1 x_1 x_3 z + \hat{\gamma}_{23}^1 x_2 x_3 z + \hat{\gamma}_{123}^1 x_1 x_2 x_3 z + \hat{\gamma}_{12}^{\circ} x_1 x_2 + \hat{\gamma}_{13}^{\circ} x_1 x_3 + \hat{\gamma}_{23}^{\circ} x_2 x_3 + \hat{\gamma}_{123}^{\circ} x_1 x_2 x_3 \dots \dots \dots \text{eq.5}$$

onde os valores dos coeficientes $\hat{\gamma}_i^{\circ}$ são a média aritmética dos coeficientes $\hat{\gamma}_i^{\circ}$ das equações $\hat{\eta}(x, +1)$ e $\hat{\eta}(x, -1)$ e os coeficientes $\hat{\gamma}_i^1$, $\hat{\gamma}_{ij}^1$ e $\hat{\gamma}_{123}^1$ são a semi-diferença entre os coeficientes $\hat{\gamma}_i^1$ das mesmas equações.

3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

As tabelas 1 e 3 aqui apresentadas são constituídas pelos valores médios do índice de peróxido, obtidos em triplicata, segundo o delineamento apresentado na figura 1. Os ensaios foram realizados, com a mesma amostra, em dias diferentes que foram codificados como $z = -1$ e $z = +1$ para $t = 7$ dias e $t = 15$ dias respectivamente. Para cada um dos casos, a estimativa dos coeficientes foi obtida através das equações 2, 3 e 4 e a função resposta foi obtida através da equação 1. O modelo combinado foi desenvolvido a partir da equação 5.

Consideremos o caso onde $z = -1$.

Tabela 1 – Média dos índices de peróxido do óleo de soja obtidos de sete combinações de três antioxidantes após sete dias.

Tratamento	1	2	3	4	5	6	7
Mistura	(1,0,0)	(0,1,0)	(0,0,1)	(1/2, 1/2, 0)	(0, 1/2, 1/2)	(1/2, 0, 1/2)	(1/3, 1/3, 1/3)
Média dos IIP	185	208	55	173	31	100	160

I.P. em μg de O_2/g de lípide

A função resposta obtida foi:

$$\hat{\eta}(x,-1) = 185x_1 + 208x_2 + 55x_3 - 94x_1x_2 - 80x_1x_3 - 402x_2x_3 + 2016x_1x_2x_3$$

Aplicando o teste de Tukey, ao nível de 5%, podemos verificar (tabela 1) que o tratamento 3 diferiu significativamente dos tratamentos 1 e 2, o que indica que o ácido cítrico é mais eficaz, quando utilizado isoladamente, que o EDTA e o ácido ascórbico; (2) o tratamento 5, que representa a mistura de ácido ascórbico com ácido cítrico, apresentou o menor índice de peróxido e só não apresentou diferença significativa com o tratamento 3 o que indica um certo grau de sinergismo entre essas duas substâncias.

Uma amostra isenta de antioxidante (controle) apresentou um índice de peróxido (198 µg de O₂/g de lípide) que só diferiu, significativamente, dos tratamentos 3 e 5.

A análise de variância (tabela 2), segundo o delineamento inteiramente casualizado, apresentou diferença significativa entre as médias dos tratamentos e, o coeficiente de variação do experimento foi de 27,46%, o que indica uma grande variabilidade entre os dados, por tratamento.

Tabela 2 – Análise de variância para o índice de peróxido após sete dias.

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F _{cal.}	F _{tab.}
Tratamentos	6	85.095,61	14.182,60	11,07*	2,85
Resíduo	14	17.930,67	1.280,76		
Total	20	103.026,29			

*significativo ao nível de 5%

Consideremos agora o caso onde z = + 1:

Tabela 3 – Médias dos índices de peróxido do óleo de soja obtidos de sete combinações de três antioxidantes após quinze dias.

Tratamento	1	2	3	4	5	6	7
Mistura	(1,0,0)	(0,1,0)	(0,0,1)	(1/2, 1/2, 0)	(0, 1/2, 1/2)	(1/2, 0, 1/2)	(1/3, 1/3, 1/3)
Média dos I.P.	525	557	272	460	215	380	543

I.P. em µg de O₂/g de lípide

A função resposta obtida foi:

$$\hat{\eta}(x,+1) = 525x_1 + 557x_2 + 272x_3 + 324x_1x_2 - 74x_1x_3 - 798x_2x_3 + 6.063x_1x_2x_3$$

Analisando a tabela 3 e através do teste de significância, verifica-se que o comportamento dos antioxidantes, em relação aos tratamentos e ao controle (I.P. = 533 µg de O₂/g de lípide), não se alterou.

A análise de variância (tabela 4) apresentou diferença significativa entre as médias dos tratamentos e o coeficiente de variação do experimento foi de 11,06%.

Tabela 4 – Análise de variância para o índice de peróxido após quinze dias.

	G.L.	S.Q.	Q.M.	F _{cal.}	F _{tab.}
Tratamentos	6	336.743,62	56.123,94	25,78*	2,85
Resíduos	14	30.474,67	2.176,76		
Total	20	367.218,29			

*significativo ao nível de 5%

O modelo combinado nos x's e z's ajustados para todos os dados das tabelas 1 e 3 é dado por :

$$\begin{aligned} \hat{\eta}(x,z) = & 355x_1 + 170x_1z + 382,5x_2 + 174,5x_2z + 163,5x_3 \\ & + 108,5x_3z + 115x_1x_2 + 209x_1x_2z - 77x_1x_3 + 3x_1x_3z \\ & - 600x_2x_3 - 198x_2x_3z + 4.039,5x_1x_2x_3 \\ & + 2.023,5x_1x_2x_3z \end{aligned}$$

Para verificar a significância desses coeficientes, estima-se (teste t):

$$t_{x_1} = \frac{170}{16,97} = 10,01^{**} \quad t_{x_2} = \frac{174}{16,97} = 10,25^{**}$$

$$t_{x_3} = \frac{108,5}{16,97} = 6,39^{**} \quad t_{x_1x_2} = \frac{209}{83,15} = 2,51(\text{ns})$$

$$t_{x_1x_3} = \frac{3}{83,15} = 0,04(\text{ns}) \quad t_{x_2x_3} = \frac{198}{83,15} = 2,38(\text{ns})$$

$$t_{x_1x_2x_3} = \frac{2023,5}{585,06} = 3,46^{**}$$

(ns) não significativo ao nível de 1% (p < 0,01)

**significativo ao nível de 1% (p < 0,01)

Como t(0,01;28) = 2,76 e comparando os ensaios para sete e quinze dias verifica-se uma diferença significativa de I.P., nos óleos contendo os antioxidantes isoladamente. No entanto, as misturas binárias não apresentaram diferença significativa ao nível de 1% indicando que o aumento natural do índice de peróxido se torna menos acentuado com o passar do tempo.

4 – CONCLUSÕES

Através dos resultados obtidos podemos concluir que: (1) o ácido cítrico, quando utilizado isoladamente, é mais eficiente que o EDTA e o ácido ascórbico na prevenção da autooxidação de lipídios do óleo de soja; (2) a partir da comparação com o controle, o EDTA e o ácido ascórbico não previnem o óleo contra a oxidação podendo o segundo ser considerado como sinergista; (3) a mistura con-

tendo ácido ascórbico e ácido cítrico apresentou os menores índices de peróxido, o que indica um certo sinergismo entre essas duas substâncias; (4) o método simplex-centrói-

de é uma boa "ferramenta" quando se deseja avaliar a eficiência de antioxidantes ou a mistura destes, em óleos de soja.

ABSTRACT

The anti-oxidant effect of EDTA, ascorbic acid and citric acid and the synergism among them were investigated in soy bean oil produced in the Londrina region. The essays followed the simplex-centrôid method using as a response the peroxid index (PI). The function response obtained was analyzed in relation to variability and significance. Based on the results obtained it can be seen that the citric acid and the mixture ascorbic acid-citric acid are much more effective in preventing autoxidation of soy-bean oil lipids.

KEY WORDS: EDTA; Ascorbic acid; Citric acid; Antioxidant; Autoxidation of soy-bean oil; Synergism; Simplex-centroid.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – AURAND, L.W.; BOONE, N.H.; GIDDINGS, G.G. Superoxid and singlet oxygen in milk lipid peroxidation. *J. Dairy sci.*, 60:363, 1977.
- 2 – BANDEIRA, R. *Polluição, doença da terra*. Petrópolis, Vozes, 1980.
- 3 – BRAVERMAN, J.B.S. *Introducion a la bioquímica de los alimentos*. Barcelona, Omeda, 1967. p.268-272.
- 4 – DESROSIER, N.W. *The technology of food preservation*. Westport, Avi Publisching, 1977.
- 5 – DZIEZAK, J.D. *Preservatives: antioxidants*. *Food Technol.*, 9:40, 1986.
- 6 – GAVA, A.J. *Principios de tecnologia de alimentos*. 6.ed. São Paulo, Nobel, 1984. p.253-270.
- 7 – HARE, L.B. Mixture designs applied to food formulation. *Food Technol.*, 28:50, 1974.
- 8 – JAY, J.M. *Microbiologia moderna de los alimentos*. Zaragoza, Acribia, 1973.
- 9 – KHAN, T.M.M. & MARTELL, E. Metal ion and metal catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. I cupric and Ferric catalyzed oxidation. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1967, 88: 4176.
- 10 – LAGOA, A. Segredo dos aditivos químicos. *Revista Saúde*, São Paulo, (43):20-33.
- 11 – MELTON, S.L. Methodology for following lipid oxidation in muscle food. *Food Technol.*: 105-110, jul., 1983.
- 12 – Official and Tentative Methods of the American Oil Chemist's Societies. 3.ed. Champaign, Amer. Oil Chemists Soc., 1977.
- 13 – RITACO, M. & DI LUCIANO, V. Grau de absorção do oxigênio durante a auto-oxidação de substâncias gordurosas. *Revista Indústria Alimentar*, (10):14-26, 1977.
- 14 – SCHEFFE, H. Experiments with mixture. *J. Roy. Statist. Soc.*, B20:344, 1958.
- 15 – ————. The simplex-centrôide design for experiments with mixtures. *J. Roy. Statist. Soc.*, B25:235, 1963.
- 16 – SIMÃO, A.M. *Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico*. Nobel, São Paulo, 1985.
- 17 – TOLEDO, M.C.; ESTEVES, W.; HARTMANN, V.E.M. Eficiência de antioxidantes em óleo de soja. *Ciênc. Tecnol. Alim.*, Campinas, 5(11): 1-11, 1985.

Recebido para publicação em 1^o/12/88