

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

Pró-Reitoria de Pesquisa e de Pós-Graduação

Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu*

Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos

EXTRAÇÃO DE ÁCIDO FÍTICO DE FONTES ALTERNATIVAS, PURIFICAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUELANTE E
ANTIOXIDANTE

PONTA GROSSA

2010

FRANCIELI KANUMFRE

EXTRAÇÃO DE ÁCIDO FÍTICO DE FONTES ALTERNATIVAS, PURIFICAÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUELANTE E
ANTIOXIDANTE

Dissertação apresentada à banca examinadora como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Neiva Deliberali Rosso

PONTA GROSSA

2010

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

K16e	Kanumfre, Francieli Extração de ácido fítico de fontes alternativas, purificação, caracterização e avaliação do potencial quelante e antioxidante. / Francieli Kanumfre. Ponta Grossa, 2010. 137 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Ponta Grossa. Orientadora : Profa. Dra. Neiva Deliberali Rosso 1. Ácido fítico. 2. Extração. 3. Purificação. 4. Caracterização. 5. Potencial quelante e antioxidante. I. Rosso, Neiva Deliberali. II. T CDD: 641.1
------	--

TERMO DE APROVAÇÃO

FRANCIELI KANUMFRE

“ EXTRAÇÃO DE ÁCIDO FÍTICO DE FONTES ALTERNATIVAS, PURIFICAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUELANTE E ANTIOXIDANTE “

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte Banca Examinadora:

Ponta Grossa, 04 de Fevereiro 2010.



Profa. Dra. Neiva Deliberali Rosso
UEPG/PR



Prof. Dr. Paulo Irajara Borba Carneiro
UEPG/PR



Profa. Dra. Noemi Nagata
UFPR/PR

Ponta Grossa
2010

Dedicatória

*Aos meus pais Vilma e Germano,
pelo amor incondicional e
incentivo constante...*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que entre tantos caminhos conduziu a minha vida sempre pelo caminho correto e permitiu que este sonho fosse possível.

Aos meus pais, Vilma e Germano, pelo amor e dedicação, e por estarem ao meu lado nos momentos mais importantes da minha vida. Amo vocês!

À minha avó Emma, que do lugar maravilhoso em que está, deve estar partilhando a alegria deste momento comigo.

À minha família: Fernando, Juliana, Luciano, Bárbara, Ana Júlia, Davi, Mateus, Nicole, Bruno e Felipe, por compreenderem a minha ausência e me apoiarem em todas as decisões.

Ao meu namorado Edson, pelo companheirismo, carinho e incentivo, e por me fazer olhar a vida de maneira diferente.

À minha querida orientadora Prof.^a Neiva, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos e lições de vida, amizade sincera, conselhos valiosos e incentivo profissional, e pela linda maneira com que conduziu este trabalho.

Ao Prof. Ademir e à Aline, pela preocupação, conselhos e auxílio durante estes anos.

À Prof.^a Noemi Nagata, pelos ensinamentos, e por acompanhar esta trajetória desde o desenvolvimento do projeto, sempre com sugestões valiosas para melhoria do trabalho.

Ao Prof. Paulo Borba, pela presença amiga e exemplo profissional, sempre pronto em nos atender e nos ajudar, e por fazer tudo parecer simples.

À Coordenação, ao corpo docente, aos funcionários e colegas do Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

À Instituição UNICEMP pela parceria formada, em especial ao Professor Dr. Marco Aurélio e à técnica Cristiane pela ajuda profissional.

A todos os professores e funcionários da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelo sorriso sincero e acolhida nesta Instituição que se tornou a minha segunda casa durante estes dois anos.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade e condições oferecidas para a realização deste trabalho.

À Fundação CAPES pelo apoio financeiro.

Às verdadeiras amigas que conquistei nestes dois anos, Samantha e Andrea, pelo companheirismo, ombro amigo e amizade sincera.

Aos colegas de mestrado Elisângela, Rafael, Sue e Flávia, pela companhia e momentos de descontração.

Aos amigos que desempenharam papel fundamental na torcida.

Às alunas de iniciação científica Cíntia, Danila, Diokely e Eliane, pela companhia sempre animadora, auxílio para a realização das atividades de laboratório e dicas para melhoria do trabalho.

Aos alunos do curso de Bacharelado em Química com quem tive o privilégio de trabalhar durante o estágio e com os quais muito aprendi.

A todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, a minha eterna gratidão.

*“... Recebei a instrução e não o dinheiro.
Preferi a Ciência ao fino ouro, pois a
Sabedoria vale mais que as pérolas e
jóia alguma a pode igualar... Porque
Deus é quem dá a Sabedoria, de sua
boca é que procedem a Ciência
e a Prudência...”*

Provérbios 8:10-11;2:6.

RESUMO

O ácido fítico, componente de ocorrência natural em sementes, possui elevado potencial quelante e a depender do pH pode interagir com íons metálicos que atuam como co-fatores de diversas enzimas, interferindo em processos metabólicos essenciais. O ácido fítico possui funções antioxidantes em virtude da formação de quelatos com ferro, suprimindo as reações oxidativas catalisadas por este metal, o que implica em uma pronunciada função antioxidante na preservação de sementes. O custo do ácido fítico puro é muito elevado, desta forma, técnicas de extração e purificação podem ser melhoradas para obtenção do ácido fítico com elevado grau de pureza. O objetivo deste trabalho consistiu em extrair o ácido fítico de sementes de abóbora, melancia, melão e mamão, purificá-lo e caracterizá-lo por meio de técnicas analíticas, avaliar sua habilidade quelante frente ao íon metálico Fe (III), e investigar seu potencial antioxidante para possível utilização como aditivo seguro na indústria de alimentos. O ácido fítico foi extraído em meio ácido e em condições brandas. Para a purificação, foi utilizada uma resina de troca aniônica fraca, livre de base, e a eluição do ácido fítico foi realizada com uma solução de ácido clorídrico $0,70 \text{ mol L}^{-1}$. As soluções obtidas apresentaram pureza de aproximadamente 34 %, comparável às soluções de ácido fítico disponíveis comercialmente, e as sementes de abóbora apresentaram o maior conteúdo de ácido fítico, $2,6325 (\pm 0,1994) \text{ g/100 g}$, base seca. Os conteúdos de fósforo para as diferentes amostras foram semelhantes entre si e próximos à quantidade de fósforo encontrada para o padrão através da curva analítica. A cromatografia em camada delgada revelou que os procedimentos de extração e purificação não liberaram fosfato da molécula de ácido fítico, pois o hexafosfato de inositol foi o principal componente obtido a partir das diferentes sementes. Os dados obtidos dos estudos de infravermelho e potenciométricos revelaram que as amostras de ácido fítico encontraram-se com grau de pureza relativamente elevado. Os estudos espectroscópicos no UV-Vis mostraram que o complexo ácido fítico-Fe (III), sal de dodecassódio apresentou uma banda de absorção referente à transferência de elétrons do ligante para o metal. Os espectros para os complexos ácido fítico-Fe (III), obtidos das sementes foram semelhantes, com elevados valores de energia de ligação, que sugerem que a interação entre o ácido fítico e o íon metálico foi efetiva. O ácido fítico atua como um antioxidante secundário, assim não respondeu aos ensaios de FRAP e DPPH, contudo, como evidenciado pelos estudos UV-Vis, o ácido fítico possui uma pronunciada função antioxidante na preservação de alimentos devido à formação de quelatos estáveis com Fe (III).

Palavras-chave: ácido fítico, extração, purificação, caracterização, potencial quelante e antioxidante.

ABSTRACT

The phytic acid, a component of naturally occurring seeds, has a high chelating potential and depends on the pH can interact with metal ions that act as cofactors of several enzymes, interfering with essential metabolic processes. Phytic acid has antioxidant functions due to the formation of iron chelates, by suppressing the oxidative reactions catalyzed by this metal, which implies in a pronounced antioxidant function in the preservation of seeds. The price of pure phytic acid is very high, thus, techniques for extraction and purification can be improved to obtain the phytic acid with high purity degree. The purpose of this study consisted in to extract the phytic acid from pumpkin, watermelon, melon and papaya seeds, purify and characterize it by means of analytical techniques, to evaluate their chelating ability against the metal ion Fe (III), and investigate their antioxidant potential for possible use as a safe additive in food industry. Phytic acid was extracted in acid middle and mild conditions. For purification, was used a weak anion exchange resin, free base, and phytic acid elution was performed with a solution of hydrochloric acid 0.70 mol L^{-1} . The solutions obtained had a purity of about 34 % compared to phytic acid solutions commercially available, and pumpkin seeds showed the highest content of phytic acid, $2.6325 (\pm 0.1994) \text{ g/100 g}$, dry matter. The phosphorus content in the different samples was similar and close to the amount of phosphorus found in the standard through the analytical curve. The thin-layer chromatography revealed that the extraction and purification procedures did not release phosphate from phytic acid molecule, as the inositol hexaphosphate was the main component obtained from different seeds. The data obtained from infrared and potentiometric studies revealed that phytic acid samples showed purity degree relatively high. The spectroscopic studies on UV-Vis showed that the phytic acid-Fe (III) complex, dodecassodium salt, presented an absorption band relating on the electron transfer from ligand to metal. The spectra for the phytic acid-Fe (III) complexes, obtained from seeds were similar, with high values of binding energy, suggesting that the interaction between phytic acid and the metal ion was effective. The phytic acid acts as a secondary antioxidant, thus it has not responded to trials of FRAP and DPPH, however, as evidenced by UV-Vis studies, phytic acid has a pronounced antioxidant function in preserving food due to the formation of stable chelates with Fe (III).

Keywords: phytic acid, extraction, purification, characterization, antioxidant and chelating potential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Estrutura do hexafosfato de mioinositol em solução.	25
Figura 02	Conformações do ácido fítico: (a) uma posição axial e cinco equatoriais (1ax./5eq.) e (b) cinco posições axiais e uma equatorial (5ax. / 1eq) (fonte: PATON; NOAILLY; MOSSOYAN, 1999).	27
Figura 03	Comportamento do Reagente de Wade diante do extrato de abóbora eluído com água deionizada ultra pura.	84
Figura 04	Comportamento do Reagente de Wade diante do extrato de abóbora eluído com solução de NaCl 0,10 mol L ⁻¹ .	85
Figura 05	Comportamento do Reagente de Wade diante do extrato de abóbora eluído com solução de NaCl 0,70 mol L ⁻¹ .	85
Figura 06	Comportamento do Reagente de Wade diante do extrato de abóbora eluído com solução de HCl 0,10 mol L ⁻¹ .	88
Figura 07	Comportamento do Reagente de Wade diante do extrato de abóbora eluído com solução de HCl 0,70 mol L ⁻¹ .	88
Figura 08	Efeito do aumento da concentração de ácido fítico na absorbância do Reagente de Wade.	91
Figura 09	Curva analítica Reagente de Wade - ácido fítico padrão, na faixa de concentração de 0,0 a 1,2 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ .	92
Figura 10	Espécies de abóbora (a), melancia (b), melão (c) e mamão (d) utilizadas para extração do ácido fítico.	95
Figura 11	Eluato final em NaCl 0,70 mol L ⁻¹ de abóbora.	96
Figura 12	Eluato final em HCl 0,70 mol L ⁻¹ de abóbora.	96
Figura 13	Complexo [(MoO ₂ .4MoO ₃) ₂ .H ₃ PO ₄] formado para determinação de fósforo.	100
Figura 14	Curva analítica de fósforo, faixa linear de 0,0 a 1,8 x 10 ⁻³ mg P/mL.	101
Figura 15	Curva analítica de fósforo, coeficiente de correlação, r, de 0,99939.	101
Figura 16	Determinação de fósforo nas amostras de ácido fítico de mamão, abóbora, melão e melancia e ácido fítico padrão dodecassódico.	102

Figura 17	Cromatograma obtido após a cromatografia em camada delgada. Da esquerda para a direita: padrão, melancia, mamão, melão, abóbora e padrão.	106
Figura 18	Espectro de infravermelho de uma amostra do ácido fítico à temperatura ambiente (fonte: QUIRRENBACH, 2007).	108
Figura 19	Espectro de infravermelho do ácido fítico dodecassódico à temperatura ambiente.	109
Figura 20	Espectro de infravermelho das amostras AB 6, MEL 1, MLAO 1, MAO 1 e do ácido fítico padrão cristalizado em pH 2,800.	110
Figura 21	Curva de titulação ácido fítico padrão dodecassódico e obtido a partir de sementes de melão.	113
Figura 22	Curvas de distribuição das espécies em função do p[H] para o sistema contendo 0,1 mmol de ácido fítico dodecassódico, $\mu = 0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$, a $25 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e atmosfera de argônio.	117
Figura 23	Curvas de distribuição das espécies em função do p[H] para o sistema contendo 0,1 mmol de ácido fítico de melão, $\mu = 0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$, a $25 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e atmosfera de argônio.	118
Figura 24	Espectro de UV-Vis do complexo ácido fítico - Fe(III), sal de dodecassódio, a $36 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, força iônica $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, atmosfera de argônio.	120
Figura 25	Espectro de UV-Vis do complexo ácido fítico - Fe(III), obtido de sementes de melão, a $36 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, força iônica $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, atmosfera de argônio.	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Condições experimentais adotadas para as diferentes amostras.	90
Tabela 02	Valores de absorbância e volumes das amostras utilizados para determinar o conteúdo de ácido fítico nas amostras concentradas com o Reagente de Wade, e conteúdo de ácido fítico nas diferentes sementes.	93
Tabela 03	Determinação da densidade e da percentagem de pureza das soluções concentradas de ácido fítico obtidas de diferentes sementes.	98
Tabela 04	Conteúdo de fósforo nas amostras de ácido fítico obtidas das diferentes sementes.	104
Tabela 05	Valores de R_f obtidos para as amostras de AF em cromatografia de camada delgada.	107
Tabela 06	Frequências do grupamento $O=PO_3H_2$ obtidas em espectros de infravermelho do ácido fítico dipotássico, dodecassódico e das amostras de ácido fítico obtidas das diferentes sementes.	111
Tabela 07	Logaritmos das constantes de protonação do ácido fítico dodecassódico e ácido fítico obtido das diferentes sementes, a $25 \pm 0,1$ °C, $\mu = 0,10$ mol L ⁻¹ (NaCl), atmosfera de argônio.	115
Tabela 08	Valores de frequência e energias de ligação para os complexos formados pelo ácido fítico padrão dodecassódico e ácido fítico obtido das diferentes sementes com o íon metálico Fe(III).	122

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 01	Reação química simbólica no equilíbrio entre reagentes e produtos.	65
Equação 02	Equação de balanço de massa, quociente envolvendo as concentrações das espécies de produtos pelas concentrações das espécies reagentes no equilíbrio.	65
Equação 03	Cálculo da percentagem de pureza das soluções concentradas de ácido fítico.	72
Equação 04	Cálculo do conteúdo de ácido fítico nas diferentes sementes, g/100 g, em base seca.	72
Equação 05	Reação química entre reagentes e produtos no equilíbrio de ionização.	77
Equação 06	Equação de balanço de massa utilizada pelo programa BEST7 (Martell; Motekaitis, 1992) para calcular as constantes de protonação do ácido fítico.	77
Equação 07	Cálculo de porcentagem de radicais DPPH consumidos pelo antioxidante.	79
Equação 08	Equação da reta obtida para a determinação do conteúdo de ácido fítico a partir da curva analítica.	92
Equação 09	Equação da reta obtida para a determinação de fósforo nas amostras de ácido fítico.	102
Equação 10	Cálculo do fator de retenção (R_f) para a cromatografia planar.	105

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^1H NMR	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio.
^{13}C NMR	Ressonância magnética nuclear de carbono.
^{31}P NMR	Ressonância magnética nuclear de fósforo.
A	Absorbância.
AB	Abóbora.
AF	Ácido fítico.
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
AOAC	Association of Official Analytical Chemists.
ATP	Trifosfato de adenosina.
BHA	Hidroxianisol butilado.
BHT	Hidroxitolueno butilado.
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência.
DNA	Ácido desoxirribonucléico.
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil.
DPPHH	Hidrazina, forma reduzida do radical DPPH.
DM	Dry matter.
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético.
Et_4NClO_4	Perclorato de tetraetil amônio.
FRAP	Ferric reducing ability of plasma.
FTIR	Infravermelho operando no modo de transformada de Fourier.
GRAS	Generally recognized as safe.
GGM	Germe grosso de milho.
ΔH	Variação de entalpia.

IC ₅₀	Concentração de ácido fítico necessária para reduzir em 50% a formação de radicais hidroxil.
InsP ₆	Ácido fítico.
IP	Mioinositóis.
IP1	Monofosfato de inositol.
IP2	Difosfato de inositol.
IP3	Trifosfato de inositol.
IP4	Tetrafosfato de inositol.
IP5	Pentafosfato de inositol.
IP6	1,2,3,4,5,6-hexaquis(dihidrogeno)fosfato- <i>mio</i> -inositol, ácido fítico.
IR	Infravermelho.
KH ₂ PO ₄	Dihidrogenofosfato de potássio.
MAO	Mamão.
MEL	Melancia.
MLAO	Melão.
NMe ₄ Cl	Cloreto de tetrametilamônio.
PA	Para análise.
p[H]	Segundo Martell e Motekaitis (1992), medidas precisas da concentração de íon hidrogênio (ou atividade) obtidas por um sistema de eletrodos de vidro-referência são restritas para a região de pH 2-12. Assim, para tornar esta distinção clara, o termo usado pH é substituído por p[H], que indica concentração.
R _f	Fator de retenção.
TΔS	Termo entrópico.
TAE	Tannic acid equivalent.
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.
TBHQ	t-butil hidroquinona.
TLC	Cromatografia em camada delgada.

TPTZ	2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazeno.
U. A.	Unidades de absorbância.
UV	Ultravioleta.
UV-Vis	Ultravioleta-visível.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	23
2.1	OBJETIVO GERAL	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
3	REVISÃO DA LITERATURA	25
3.1	ÁCIDO FÍTICO	25
3.1.1	Estrutura e Estabilidade	25
3.1.2	Ocorrência e Papel Fisiológico	29
3.1.3	Extração, Purificação e Determinação do Ácido Fítico em Alimentos	33
3.2	APLICAÇÕES	37
3.2.1	Estados Patológicos	37
3.2.2	Melhoramento de Materiais	39
3.3	POTENCIAL ANTIOXIDANTE	39
3.3.1	Oxidação Lipídica e Antioxidantes	39
3.3.2	Antioxidantes e Metabolismo	41
3.3.3	Antioxidantes e Preservação de Alimentos	43
3.3.4	Métodos para Determinação da Capacidade Antioxidante	47
3.4	PROPRIEDADES ÁCIDO-BÁSICAS	51
3.4.1	Ionização do Ácido Fítico	51
3.4.2	Formação de Compostos de Coordenação	53
3.5	AVALIAÇÃO TECNOLÓGICA DA MATÉRIA-PRIMA	57
3.6	MÉTODOS ANALÍTICOS	60
3.6.1	Cromatografia	60

3.6.1.1	Cromatografia de Troca Iônica	60
3.6.1.2	Cromatografia em Camada Delgada	61
3.6.2	Espectroscopia no Ultravioleta-Visível	62
3.6.3	Espectroscopia no Infravermelho	62
3.6.4	Potenciometria	64
4	MATERIAIS E MÉTODOS	67
4.1	MATERIAIS	67
4.1.1	Matéria-Prima	67
4.1.2	Reagentes	67
4.2	MÉTODOS	68
4.2.1	Preparação da Amostra	68
4.2.2	Extração do Ácido Fítico	69
4.2.3	Purificação do Ácido Fítico	69
4.2.4	Deteção e Determinação do Conteúdo de Ácido Fítico	70
4.2.5	Determinação da Percentagem de Pureza da Solução Concentrada de Ácido Fítico	71
4.2.6	Determinação do Conteúdo de Ácido Fítico nas Sementes	72
4.2.7	Cristalização do Ácido Fítico	73
4.2.8	Determinação de Fósforo Total nas Amostras de Ácido Fítico	73
4.2.9	Cromatografia em Camada Delgada	74
4.2.10	Estudos Espectroscópicos de Absorção na Região do Infravermelho	75
4.2.11	Estudos Potenciométricos	75
4.2.12	Estudos Espectroscópicos de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível	77
4.2.13	Ensaio do Potencial Antioxidante pelo Método de FRAP	78
4.2.14	Ensaio da Capacidade Consumidora de Radicais DPPH	79

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
5.1	EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO	80
5.2	DETECÇÃO E DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDO FÍTICO	84
5.2.1	Detecção do Ácido Fítico nos Eluentes Utilizados	84
5.2.2	Curva Analítica Reagente de Wade – Ácido Fítico Padrão, Sal de Dipotássio	90
5.2.3	Determinação do Conteúdo de Ácido Fítico a partir da Curva Analítica	92
5.2.4	Comparação entre os Eluentes NaCl e HCl	95
5.3	DETERMINAÇÃO DA PERCENTAGEM DE PUREZA DA SOLUÇÃO CONCENTRADA DE ÁCIDO FÍTICO	97
5.4	DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO NAS AMOSTRAS DE ÁCIDO FÍTICO	99
5.4.1	Método AOAC 995.11	99
5.4.1.1	Curva Analítica	100
5.4.1.2	Determinação de Fósforo nas Amostras de Ácido Fítico	102
5.5	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	104
5.6	ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO	107
5.7	ESTUDOS POTENCIOMÉTRICOS	112
5.7.1	Curvas de Titulação	112
5.7.2	Constantes de Protonação do Ácido Fítico	114
5.7.3	Curvas de Distribuição das Espécies	116
5.8	ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL	119
5.9	ENSAIOS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO FÍTICO	123
5.9.1	Mecanismo de Ação Antioxidante do Ácido Fítico	123

5.9.2	Ensaio do Potencial Antioxidante pelo Método de FRAP	125
5.9.3	Ensaio da Capacidade Consumidora de Radicais DPPH	126
6	CONCLUSÕES	128
7	REFERÊNCIAS	130

1 INTRODUÇÃO

O ácido fítico, conhecido como hexafosfato de inositol, é um componente de ocorrência natural em cereais, legumes e sementes oleaginosas, representando de 60 a 90% do fósforo total em sementes. O ácido fítico representa para as plantas um depósito de fósforo, cátions e energia, um competidor de ATP (trifosfato de adenosina) e um regulador dos níveis de fosfato inorgânico. A estrutura do ácido fítico sugere um elevado potencial quelante. Possui doze átomos de hidrogênio substituíveis e a depender do pH pode interagir efetivamente com íons metálicos.

A propriedade quelante do ácido fítico pode facilitar a eliminação de metais potencialmente tóxicos para o organismo, inibindo a formação de espécies reativas de oxigênio e sendo eficiente na quimioprevenção e terapia do câncer. Em virtude da formação de quelatos com ferro, o ácido fítico apresenta funções antioxidantes, suprimindo as reações oxidativas catalisadas por este metal. A oxidação lipídica é uma das reações importantes de deterioração de um alimento com influência negativa sobre a sua conservação. Antioxidantes sintéticos como BHA e BHT retardam o aparecimento de alterações oxidativas nos alimentos a baixas concentrações, porém a toxicidade destes compostos deve ser considerada. O ácido fítico, um composto de ocorrência natural, atua como um antioxidante secundário, reduzindo o efeito pró-oxidante de metais, reduzindo seu potencial redox e estabilizando-os em sua forma oxidada. Esta capacidade implica em uma pronunciada função antioxidante na preservação de alimentos.

O ácido fítico coordena-se a minerais que atuam como co-fatores, interferindo em diversos processos metabólicos essenciais. Desta forma, métodos simples, não dispendiosos e seguros para a medida do ácido fítico em alimentos se fazem necessários. Por muitos anos, os métodos quantitativos convencionais para determinação do ácido

fítico em alimentos consistiam na precipitação do ácido fítico na forma de um complexo fitato-ferro(III) insolúvel em solução ácida, o qual não era detectável em concentrações abaixo de 0,1 %. Porém, em adição ao hexafosfato de inositol, o íon férrico também precipitava penta- e tetrafosfato de inositol em solução ácida diluída. Desta forma, o conteúdo de ácido fítico presente tornava-se duvidoso. Ao longo dos anos, diversos métodos para a determinação do ácido fítico em alimentos foram desenvolvidos. Entre os mais utilizados está a cromatografia de troca iônica, desenvolvida por Harland e Oberleas (1986) e adotada como método oficial pela AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Esta técnica consiste da extração do ácido fítico em meio ácido, a partir da amostra de interesse, e purificação do mesmo através de uma resina de troca aniônica com NaCl 0,7 mol L⁻¹ como eluente. Para a determinação do fosfato a amostra passava então por uma digestão ácida e o fósforo liberado quantificado colorimetricamente. Outro método sem a necessidade de digestão foi desenvolvido por Latta e Eskin (1980). Este fundamenta-se na reação entre cloreto férrico e ácido sulfossalicílico, desenvolvido por Wade e Morgan (1955). O reagente de Wade apresenta coloração rosa característica, devido à reação entre o íon férrico e o ácido sulfossalicílico, com absorbância máxima em 500 nm. Em presença do ácido fítico, o ferro (III) coordena-se ao fosfato, resultando em um decréscimo na absorbância. O ácido fítico é inerte e muito estável devido à elevada energia potencial das ligações éster-fosfóricas, porém, condições de processamentos podem degradar o ácido fítico a mioinositóis com um número inferior de grupos fosfatos. Assim, o método utilizado pela AOAC pode superestimar o conteúdo de ácido fítico de alimentos processados, devido a estes apresentarem fosfatos inferiores que são retidos na coluna e eluídos com NaCl 0,7 mol L⁻¹, e incluídos no cálculo do ácido fítico determinado pelo método de troca aniônica. Desta forma, a busca por novas metodologias vem

estimulando pesquisas na área. Métodos como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e métodos sincronizado de fluorescência já estão sendo utilizados.

O custo do ácido fítico puro é muito elevado, desta forma, técnicas de extração e purificação podem ser melhoradas para aumentar o rendimento e o grau de pureza do ácido fítico. Além disso, fontes alternativas para obtenção deste composto podem ser descobertas. Estudos relatam à presença do ácido fítico em uma grande variedade de sementes, entre elas as sementes de abóbora, melancia e melão. Diversos trabalhos têm mostrado a importância deste composto e suas inúmeras aplicações, que vão desde a medicina até a indústria de alimentos. Esta pesquisa propôs investigar novas fontes para extração do ácido fítico, bem como melhorar a metodologia de extração e purificação para se obter um composto com grau de pureza relativamente elevado. Propõe-se ainda caracterizá-lo por meio de técnicas analíticas, confirmar sua habilidade quelante frente ao íon metálico de importância biológica Fe(III) e investigar seu potencial antioxidante para possível utilização como aditivo seguro na indústria de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Extrair o ácido fítico de sementes de abóbora, melancia, melão e mamão, purificá-lo e caracterizá-lo por meio de técnicas analíticas, e investigar seu potencial antioxidante para possível utilização como aditivo seguro na indústria de alimentos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as condições ideais para extração e purificação do ácido fítico bruto obtido de diferentes fontes alternativas.
- Extrair o ácido fítico de sementes de abóbora, melancia, melão e mamão.
- Purificar o ácido fítico obtido por cromatografia de troca iônica.
- Determinar o conteúdo de ácido fítico nas diferentes amostras analisadas.
- Determinar a percentagem de pureza do ácido fítico obtido das diferentes fontes pelos processos de extração e purificação adotados.
- Determinar o conteúdo de fósforo nas amostras de ácido fítico obtidas das diferentes fontes.
- Caracterizar o componente extraído das diferentes sementes através da cromatografia em camada delgada.
- Caracterizar o ácido fítico obtido através de técnicas espectroscópicas e potenciométricas.
- Estudar através de estudos espectroscópicos de UV-Vis a interação do ácido fítico extraído de fontes alternativas com o íon metálico Fe(III) em condições fisiológicas e

comparar com o ácido fítico padrão na forma de sal de dodecassódio e de sal de dipotássio.

- Investigar o potencial antioxidante do ácido fítico padrão e das amostras obtidas de fontes alternativas pelos métodos de FRAP e DPPH.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ÁCIDO FÍTICO

3.1.1 Estrutura e Estabilidade

O ácido fítico, Figura 01, é conhecido oficialmente como 1,2,3,4,5,6-hexaquis(dihidrogeno)fosfato-*mio*-inositol, IP6, e usualmente denominado de ácido fítico para a forma de ácido livre, fitato para a forma de sal livre e fitin para os sais de cálcio e magnésio (PLAAMI, 1997).

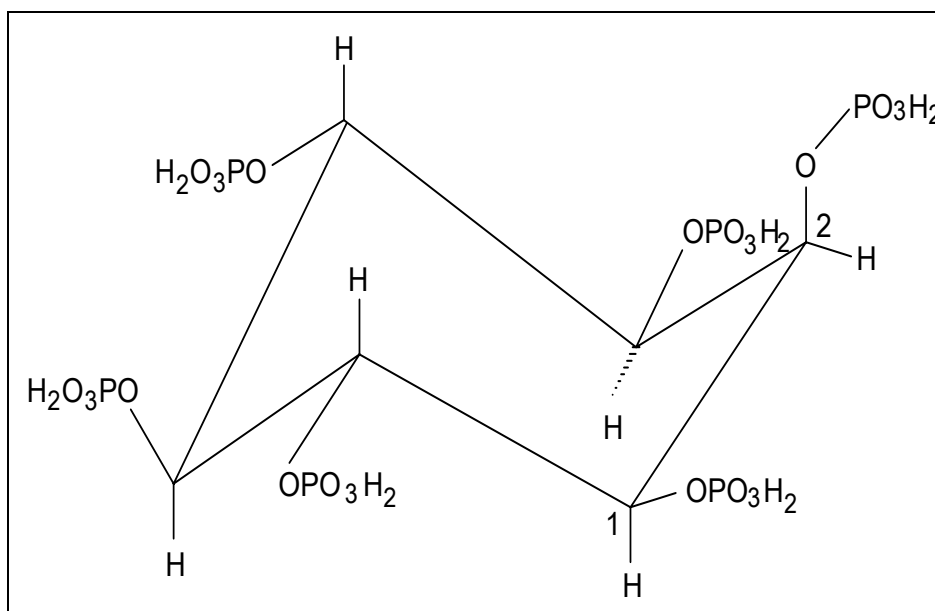


Figura 01. Estrutura do hexafosfato de mioinositol em solução

Um estudo por medidas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de fósforo, ^{31}P NMR, e de hidrogênio, ^1H NMR, revelou as mudanças conformacionais do ácido fítico em função do pH e a baixas temperaturas. Em pH maior que 11,3; o ácido fítico e espécies deprotonadas (H_{12-y} , $y = 10, 11$ e 12) encontram-se estabilizados na conformação axial (cinco C-O na posição axial e um C-O na posição equatorial). Em pH menor que 10,0; o ácido fítico e espécies deprotonadas (H_{12-y} , $y = 1-9$) se encontram preferencialmente na conformação equatorial (um C-O na posição axial e cinco C-O na posição equatorial) Figura 02. A estabilidade das conformações axial e equatorial está relacionada à minimização de repulsões eletrostáticas, ao pH, às ligações de hidrogênio entre $\text{P-O}\dots\text{H-O-P}$, às interações entre $\text{C-H}\dots\text{O-P}$ e ligações hidrogênio dos grupos fosfatos com a água (PATON; NOAILLY; MOSSOYAN, 1999). Segundo Isbrandt e Oertel (1980), utilizando técnicas de ^{13}C NMR, ^{31}P NMR e espectroscopia Raman, a estrutura do ácido fítico em solução aquosa se apresenta diretamente relacionada à variação de pH, sendo que em valores de pH abaixo de 9,0 um fosfato posiciona-se na forma axial e cinco fosfatos na forma equatorial. Em pH 9,4, iguais quantidades dos dois conformêros coexistem em solução. O espectro de ^{31}P NMR revelou que os três últimos prótons ácidos do fosfato possuem valores de pK_a aparente de 9,2-9,6, causando alterações no espectro de ^{13}C NMR que são indicativas da mudança conformacional.

A estrutura do ácido fítico sugere um elevado potencial quelante e a solubilidade dos complexos metal-fitado é dependente do pH (GRAF; EATON, 1990; CREA et al., 2008). Os complexos metal-fitado são altamente estáveis e o ácido fítico se comporta principalmente como uma base dura (CREA et al., 2008).

possui doze átomos de hidrogênio substituíveis em sua molécula, os quais foram prontamente substituídos por grupos metila.

O ácido fítico pode apresentar nove estereoisômeros do inositol: *cis*-inositol, *epi*-inositol, *allo*-inositol, *neo*-inositol, *mio*-inositol, *muco*-inositol, *chiro*-inositol e seu enantiômero e *scillo*-inositol, sendo apenas duas formas opticamente ativas. Em vegetais, a única forma identificada por métodos químicos e enzimáticos foi a *mio*-inositol (COSGROVE, 1996 apud LEAL, 2000).

A fim de verificar a estabilidade do ácido fítico, Carli (2005) realizou um estudo de análise térmica, no qual o ácido fítico apresentou-se estável até a temperatura de 1000 °C, mostrando perda de 42 % da massa inicial em três etapas principais. Na temperatura de 184 °C ocorreu uma perda de massa de 5,5 % equivalente à perda de três mols de moléculas de água de hidratação. Em 410 °C ocorre uma nova perda de massa de 13,6 %, o que sugere a decomposição da estrutura com perda de seis átomos de carbono e uma molécula de água, e à 620 °C a perda de 12,63 % sugere a decomposição com perda de cinco moléculas de água.

O ácido fítico é inerte e muito estável devido à sua elevada energia potencial das ligações éster-fosfóricas. Pode ser armazenado como um sólido durante vários anos e em soluções aquosas neutras ou 50 % alcalinas a 5 °C durante meses sem se decompor. Para liberação de 50 % do fósforo é necessária uma hidrólise ácida em HCl 5 mol L⁻¹ a 100 °C por no mínimo 6 horas, enquanto que nas mesmas condições, porém em pH 12, não ocorre a liberação do fósforo em quantidades apreciáveis (GRAF; EATON, 1990).

3.1.2 Ocorrência e Papel Fisiológico

O ácido fítico encontra-se presente em alimentos ricos em fibras dietéticas, como cereais, legumes e sementes oleaginosas (PLAAMI, 1997). Em sementes, 60 a 90 % do fósforo total ocorre como ácido fítico (GRAF; EATON, 1990; PLAAMI, 1997). Esta forma representa de 10 a 25 % do fósforo total em tuberosas. O ácido fítico está presente também em diferentes quantidades em frutas e vegetais, porém, vegetais folhosos são praticamente desprovidos de ácido fítico (PLAAMI, 1997). Os fosfatos de inositol encontrados em grãos contêm cerca de 90 % do inositol na forma hexafosfórica, correspondendo os restantes 10 % à somatória dos penta-, tetra- e trifosfatos (CÚNEO; AMAYA-FARFAN; CARRARO, 2000). Nas diversas espécies de vegetais, o ácido fítico encontra-se em regiões discretas da semente, tal como, na camada aleurônica e no embrião (GRAF; EATON, 1990; PLAAMI, 1997).

Um estudo de El-Adawy e Taha (2001) mostrou que o conteúdo de ácido fítico encontrado em sementes de páprica foi de 1,98 g/100 g em base seca. Leal (2000) observou que entre as diferentes formas de germe de milho, o germe grosso de milho apresentou o maior teor de ácido fítico, igual a 6,24 % em base seca. O ácido fítico obtido, após secagem a 50 °C, apresentou 34,97 % de pureza na forma de um sólido cristalino de cor branca e levemente amarela, solúvel em água e com elevado teor de sódio (46,96 %), o que caracteriza-o como um fitato de sódio. Em grãos de aveia integral, a concentração de ácido fítico encontrada foi de 11,4 mg g⁻¹, sendo esta afetada pela disponibilidade de fósforo no solo e demais fatores ambientais (PETERSON, 2001).

Vários processamentos de alimentos e métodos de preparação reduzem o conteúdo de ácido fítico. Hidrólise ácida e tratamento enzimático com fitase resultam em uma mistura

de fosfato inorgânico e *mio*-inositol mono-, di-, tri-, tetra-, penta- e hexafosfato (GRAF; EATON, 1990).

Cúneo; Amaya-Farfan e Carraro (2000) utilizaram a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para verificar a possível alteração do perfil de polifosfatos do farelo de arroz estabilizado e observaram que o teor de IP6 no farelo de arroz estabilizado alcançou 6,8 g/100 g, o equivalente a 84,8 % do teor total, e que o processo de estabilização do farelo não trouxe consequências significativas para o teor de ácido fítico. Após o tratamento do farelo estabilizado com fitase exógena, a quantidade de ácido fítico diminuiu para 4,3 g/100 g o que corresponde a 63,3 % do valor encontrado no farelo estabilizado. Concluíram que o uso de fitase exógena de arroz foi pouco eficaz para a remoção do ácido fítico do farelo estabilizado, sendo que depois de 24 h de hidrólise, a destruição total do ácido fítico alcançou 37 %. Este fato pode ter ocorrido devido ao farelo estabilizado não apresentar atividade de fitase endógena, inutilizada na etapa de aquecimento da estabilização. Porém, segundo Liang et al. (2009), a aplicação de fitase é um método eficiente para remover rapidamente o ácido fítico enquanto preserva relativamente mais matéria seca e minerais do que outras propostas de imersão em produtos de arroz. Para distinguir a influência da fitase endógena e adicionada, estes autores inativaram a fitase endógena dos produtos de arroz com preaquecimento. Os tratamentos posteriores com adição de fitase resultaram em degradação significativa do ácido fítico com concomitante liberação de fosfato no meio de imersão. O pH ótimo para hidrólise enzimática do ácido fítico de trigo e centeio é de 4,5 e a temperatura ótima de 55 °C (PLAAMI, 1997).

O processamento degrada o ácido fítico a mioinositóis, IP, com um número inferior de grupos fosfatos, os quais ocorrem como intermediários de reações bioquímicas de sinalização celular de plantas e de células mamárias. A razão de degradação do ácido

fítico é baixa quando ele encontra-se associado com proteínas ou cátions como Ca^{2+} em produtos naturais, sendo esta diferença atribuída à capacidade do ácido fítico de formar sais complexos. O ácido fítico é degradado durante a ebulição, sendo que a degradação é aumentada em processos nos quais a enzima fitase é ativada. Desta forma, o ácido fítico é encontrado em menores quantidades em produtos cozidos quando comparados a produtos crus (PLAAMI, 1997).

Durante a panificação, o conteúdo de ácido fítico diminui devido à ação de fitases presentes na farinha e à alta temperatura. O ácido fítico é hidrolisado durante a fermentação, o que é facilitado pela presença de altos conteúdos de água na massa. A adição de fitases nas massas pode ser utilizada para reduzir os conteúdos de ácido fítico em alimentos (PLAAMI, 1997). A fermentação, uma antiga técnica de conservação de alimentos, é reconhecida por melhorar o valor nutritivo de legumes e cereais, devido à redução dos níveis de antinutrientes, e por aumentar a digestibilidade de proteínas. Um estudo de Giami (2004) avaliou o efeito da fermentação sobre a constituição de antinutrientes, entre eles o ácido fítico, de sementes de *Telfairia occidentalis* Hook, e verificou que o conteúdo de ácido fítico diminuiu ao longo do período de sete dias de fermentação, alcançando 50 % do conteúdo inicial da semente, o que pode ter ocorrido devido à hidrólise do ácido fítico em inositol e ortofosfatos por microrganismos fermentativos, ou pela condição favorável de pH para a atividade da enzima fitase. O ácido fítico forma ligações eletrostáticas fortes com resíduos acil de aminoácidos básicos, precipitando proteínas em pH abaixo de 5,0. Em virtude de sua ligação com proteínas, o ácido fítico inibe a ação de enzimas como polifenol oxidase, α -amilase, álcool desidrogenase e tripsina (GRAF; EATON, 1990).

Um estudo de Ahn et al. (2004) mostrou que a irradiação a 10 kGy degradou mais de 90 % do ácido fítico na concentração de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que em concentrações

mais elevadas a degradação foi dificultada. Isso mostra que o grau de degradação induzido pela irradiação difere de acordo com a concentração do ácido fítico nos alimentos.

O ácido fítico pode afetar a digestibilidade do amido devido à capacidade destes dois compostos combinarem-se via ligação fosfato, combinação do ácido fítico com enzimas digestivas ou minerais como cálcio, que atua como catalisador enzimático (PLAAMI, 1997).

Fisiologicamente, o ácido fítico representa para as plantas um depósito de fósforo, cátions e energia, um competidor de ATP (trifosfato de adenosina) durante sua biossíntese e como um regulador dos níveis de fosfato inorgânico (GRAF; EATON, 1990; PLAAMI, 1997). Na germinação das sementes, ocorre uma diminuição do conteúdo de ácido fítico devido à rápida desfosforilação pela atividade aumentada de enzimas fitases (PLAAMI, 1997). À medida que o vegetal avança o desenvolvimento, o ácido fítico sofre alterações que fundamentam outro papel fisiológico importante atribuído a ele: o auxílio no crescimento do vegetal. Durante os primeiros dias de germinação, o ácido fítico é hidrolisado a fosfato inorgânico (WILLIAMS, 1970). Toda a reserva de material fosfato do ácido fítico é mobilizada e transferida ao desenvolvimento axial, aparecendo quase inteiramente como fósforo inorgânico nas raízes e brotos (HALL; HODGES, 1966). No endosperma de grãos de trigo, em torno de 26 dias de germinação, o fósforo inorgânico, inicialmente em grande quantidade, começa a diminuir e continua até atingir a maturidade. Em contraste, os compostos de fósforo ácido lábil, e mais contundentemente os de fósforo orgânico estável em ácido, representados principalmente pelo ácido fítico, os quais inicialmente estão presentes em pequenas quantidades, começam a aumentar substancialmente. Estes resultados sugerem que existe um sistema enzimático muito ativo que catalisa a conversão do fosfato inorgânico a ácido fítico, que envolve provavelmente a

formação intermediária de um composto com grupos fosforil reativos (JENNINGS; MORTON, 1963).

3.1.3 Extração, Purificação e Determinação do Ácido Fítico em Alimentos

Por muitos anos, os métodos quantitativos convencionais para determinação do ácido fítico em alimentos consistiam da precipitação deste na forma de um complexo fitato-ferro(III) insolúvel em solução ácida, o qual não era detectável em concentrações abaixo de 0,1 %. Em adição ao hexafosfato de inositol, o íon férrico também precipita penta- e tetrafosfato de inositol em solução ácida diluída. Desta forma, o conteúdo de ácido fítico presente torna-se duvidoso (PLAAMI, 1997).

O ácido fítico coordena-se a minerais que atuam como co-fatores, interferindo em diversos processos metabólicos essenciais. A necessidade de um método simples, não dispendioso e seguro para medida do ácido fítico em alimentos, fez com que Harland e Oberleas (1977), desenvolvessem um método modificado para a determinação de ácido fítico, que implica na concentração deste em uma resina de troca iônica com posterior digestão ácida e medidas colorimétricas do fosfato liberado. A extração do ácido fítico foi realizada com uma solução de HCl 1,2 % durante duas horas e este foi eluído da coluna cromatográfica com NaCl 0,7 mol L⁻¹. A concentração de ácido fítico em dez alimentos testados a base de proteínas vegetais texturizadas alcançou de 0,12 a 1,63 %, em base seca, quando os produtos foram analisados pelo método da troca iônica comparativamente com os valores obtidos pelo método tradicional através da precipitação do ácido fítico com ferro (III), 0,28 a 1,85 % em base seca.

O estágio da digestão para liberação do fosfato inorgânico requer monitoramento cuidadoso a fim de minimizar as perdas devido à digestão incompleta ou excessiva. Latta

e Eskin (1980) desenvolveram um procedimento direto para a medida do ácido fítico, sem a necessidade do passo da digestão, baseado na reação entre cloreto férrico e ácido sulfossalicílico, desenvolvido por Wade e Morgan (1955) para detectar ésteres fosfato a partir da combinação da ionoforese e cromatografia em papel. O conteúdo de ácido fítico medido usando o reagente de Wade foi comparado ao resultado do procedimento de digestão ácida, com medida colorimétrica do fosfato liberado. O reagente de Wade apresenta coloração rosa característica devido ao complexo Fe(III)-ácido sulfossalicílico, com absorvância máxima em 500 nm (LATTA; ESKIN, 1980). Dependendo do pH e das concentrações dos íons Fe(III) e ácido sulfossalicílico, complexos com uma, duas e três moléculas de ácido sulfossalicílico na esfera de coordenação do íon Fe(III) podem existir em soluções aquosas. As soluções Fe(III)-ácido sulfossalicílico são rosa devido à banda de transferência de carga. Na região UV, o complexo apresenta uma forte banda em 286 nm, e a banda de absorção com máximo em 297 nm é típica do ligante livre não coordenado (POZDNYAKOV et al., 2006). Em presença do ácido fítico, o íon férrico coordena-se ao éster fosfato, por uma reação de substituição do ácido sulfossalicílico, resultando em uma diminuição da intensidade da cor rosa e, conseqüentemente, em um decréscimo na absorvância (LATTA; ESKIN, 1980). Segundo os autores, observa-se uma linearidade da Lei de Beer-Lambert com o decréscimo na absorvância em 500 nm relacionado à concentração de ácido fítico. Avaliando-se ainda a eficiência da concentração do ácido na extração do ácido fítico de sementes, o estudo mostrou que a extração com melhor rendimento foi obtida com HCl 2,4 % por um período de uma hora, comparado ao método de Harland e Oberleas (1977). Não houve diferença significativa entre o procedimento da digestão ácida e com reagente de Wade, mostrando que este método pode ser utilizado como um procedimento eficiente e rápido para a determinação do ácido fítico (LATTA; ESKIN, 1980).

Harland e Oberleas (1986) modificaram as resinas trocadoras de ânions para analisar a concentração de ácido fítico em amostras como farinha de amendoim, aveia, arroz, proteína isolada de soja, farelo de trigo e pão de trigo integral em um estudo colaborativo. O ácido fítico foi extraído de amostras duplicadas ocultas, analisadas em triplicata, de alimentos secos utilizando HCl diluído; o extrato foi então misturado com uma solução de EDTA/NaOH e aplicado em uma coluna de troca iônica. A eluição do hexafosfato de inositol foi realizada separadamente dos fosfatos de inositol inferiores e do fosfato inorgânico com uma solução de NaCl 0,7 mol L⁻¹, e este foi digerido com uma mistura de ácido nítrico/ácido sulfúrico concentrados para liberação de fósforo, o qual foi medido colorimetricamente. A quantidade de ácido fítico nas amostras foi calculada como hexafosfato equivalente, e a concentração encontrada nos alimentos variou de 2,38 para arroz e 46,70 mg/g para farelo de trigo. O método apresentou critérios de reprodutibilidade, exatidão, rapidez e simplicidade, sendo comparável com o método da precipitação com o ferro e sensível a baixos limites de detecção. Este tem sido adotado como método oficial pela AOAC (método 986.11, 1988) para determinação de ácido fítico em alimentos (HARLAND; OBERLEAS, 1986).

Segundo Lehrfeld e Morris (1992), o método utilizado pela AOAC pode superestimar o conteúdo de ácido fítico de alimentos processados, devido a estes apresentarem fosfatos inferiores, resultantes do processamento, que são retidos na coluna e eluídos com NaCl 0,7 mol L⁻¹, e incluídos no cálculo do ácido fítico determinado pelo método de troca aniônica da AOAC. Utilizando-se do método da CLAE, Lehrfeld e Morris (1992) avaliaram o conteúdo de ácido fítico de sete amostras e compararam os resultados com o método da AOAC. O conteúdo de fosfato de inositol encontrado em grãos e legumes contém, usualmente, acima de 92 % de ácido fítico (IP6) e, a partir da CLAE, Lehrfeld e Morris (1992) encontraram 92,4 % para IP6 no farelo de trigo cru. Durante a conversão

destes grãos ou legumes em produtos alimentícios, fitases endógenas e exógenas ou condições do processamento podem causar hidrólise extensiva do IP6 em IP5, IP4, IP3, IP2 e IP1 (hexa-, penta-, tetra-, tri-, di- e mono-fosfato de inositol, respectivamente). Para amostras contendo predominantemente IP6, os métodos da AOAC e CLAE tiveram boa concordância para os valores encontrados de ácido fítico, já para amostras contendo quantidade apreciável de isômeros de IP6 hidrolisado, o método da AOAC superestimou o conteúdo de ácido fítico, mostrando que a utilização da CLAE é viável nestes casos.

Utilizando-se da CLAE com detector de índice de refração, Nappi et al. (2006) validaram as condições analíticas para determinar e quantificar o ácido fítico e seus isômeros em multimistura (trigo, fubá, casca de ovo e folha de mandioca) e avaliaram também a eficiência do método de purificação em coluna de troca aniônica forte. Embora a CLAE apresente um custo mais elevado, esta técnica permite a identificação e quantificação do ácido fítico e seus derivados desfosforilados. Os teores de ácido fítico nas amostras variaram de 1,61 a 2,25 g/100 g. Os critérios de validação para CLAE foram considerados satisfatórios quanto à seletividade e especificidade, linearidade, repetitividade e limites de detecção e quantificação. Todavia, a recuperação do ácido fítico não foi a esperada, sugerindo a interferência de minerais presentes em altas concentrações, principalmente o cálcio.

Um método sincronizado de fluorescência foi descrito por Chen et al. (2009) para determinação do conteúdo de ácido fítico em seis alimentos diferentes. O método, baseado na formação de um complexo ternário entre ácido fítico, 1,10-fenantrolina e Fe^{3+} , foi comparado com o método de espectrofotometria de UV-Vis utilizando o reagente de Wade, e o desvio para os dois métodos foi menor que 5 %, demonstrando assim a aplicabilidade do método proposto. Uma solução de 1,10-fenantrolina apresenta fluorescência com comprimento de onda característico em 362 nm. Em presença de Fe^{3+} ,

a fluorescência diminui gradualmente, porém, em presença de ácido fítico, a intensidade de fluorescência aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração de ácido fítico, com comprimento de onda máximo em 364 nm, com $R^2 > 0,9994$.

3.2 APLICAÇÕES

3.2.1 Estados Patológicos

A propriedade quelante do ácido fítico pode facilitar a eliminação de metais potencialmente tóxicos para o organismo, inibindo a formação de espécies reativas de oxigênio e sendo eficiente na quimioprevenção e terapia do câncer (GRAF; EATON, 1990; PLAAMI, 1997; MIDORIKAWA et al., 2001). Além disso, o ácido fítico reduz a razão de proliferação de células cancerígenas humanas (GRAF; EATON, 1990; PLAAMI, 1997). Um estudo em ratos mostrou que a administração de InsP_6 , antes e após a indução de câncer de cólon pelo carcinógeno azoximetano, reduziu o número de animais que desenvolveram o câncer bem como o número e tamanho dos tumores desenvolvidos. Além disso, este estudo mostrou que a ação anti-câncer de InsP_6 é melhorada pela presença de formas fosforiladas inferiores de inositol (SHAMSUDDIN; VUCENIK; COLE, 1997). Um estudo dos efeitos de antioxidantes na carcinogênese de glândulas mamárias em ratos fêmeas Sprague-Dawley mostrou que o número médio de tumores por rato e o tamanho dos tumores foram menores em grupos tratados com antioxidantes comparado com o controle. Grupos de animais recebendo ácido fítico apresentaram tumores de $10,7 \pm 8,0$ mm, enquanto no grupo controle os tumores eram de $17,8 \pm 15,3$ mm. A razão de sobrevivência de animais recebendo ácido fítico foi maior do que no grupo controle ao final de 36 semanas de experimento (HIROSE et al., 1994).

Diversos mecanismos têm sido propostos para o efeito protetor do ácido fítico na carcinogênese, entre eles; a participação do ácido fítico e suas formas fosforiladas inferiores na reserva intracelular dos fosfatos de inositol, os quais são importantes na regulação de funções celulares vitais; e a complexação de Fe^{3+} pelo ácido fítico, inibindo a formação de radicais hidroxila. Por manter o ferro no estado Fe^{3+} o ácido fítico impede a reação redox em cadeia do ferro necessária em muitas reações de oxidação e a subsequente peroxidação lipídica e dano oxidativo ao DNA. Assim, IP6 pode reduzir a carcinogênese mediada por espécies ativas de oxigênio e injúria celular devido à sua ação antioxidativa (GRAF; EATON, 1990; PLAAMI, 1997). Estas observações sugerem que o ácido fítico, que não apresenta potencial carcinogênico, pode ser utilizado como um preservativo seguro em alimentos, substituindo os atualmente empregados que representam potencial risco à saúde (GRAF; EMPSON; EATON, 1987; MIDORIKAWA et al., 2001).

O ácido fítico influencia os níveis circulatórios de colesterol, exercendo um importante papel no controle de hipercolesterolemia e arterosclerose. Altas concentrações de ácido fítico na dieta podem ser utilizadas para tratar hipercalciúria e doenças relacionadas à falta de oxigenação local do tecido como isquemia, anemia hemolítica, insuficiência pulmonar e eritrocitose. Devido à inibição da α -amilase, a ingestão de ácido fítico pode ser interessante em casos de hiperlipidemia e diabetes. A ingestão reduzida de ácido fítico pode também estar entre as causas para a incidência de cálculo renal (GRAF; EATON, 1990; PLAAMI, 1997).

3.2.2 Melhoramento de Materiais

O ácido fítico possui propriedades anticorrosivas. Em virtude da capacidade de quelar ferro, revestimentos de metais e ligas metálicas com ácido fítico conferem a estes inibição à corrosão, resistência a ranhuras no material, boa capacidade de solda e adesão melhorada de acabamentos orgânicos. Aditivos de tinta contendo ácido fítico melhoram a flexibilidade, adesão e resistência à corrosão de filmes. Gesso contendo ácido fítico previne a corrosão de molduras nas quais o gesso é armazenado (GRAF; EATON, 1990).

3.3 POTENCIAL ANTIOXIDANTE

3.3.1 Oxidação Lipídica e Antioxidantes

A oxidação lipídica é uma das reações importantes de deterioração de um alimento com influência negativa sobre a sua conservação. O mecanismo da oxidação inicia-se com uma causa externa como calor, luz ou presença de uma substância reativa. A molécula lipídica é ativada formando uma partícula de alta energia, o radical livre, que pode reagir com o oxigênio. Os radicais peróxidos formados podem transformar outra molécula do lipídeo em radical livre. A reação é seguida pela formação de hidroperóxidos, que são degradados e formam substâncias voláteis que alteram o sabor e a cor dos alimentos (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998). Entre as substância voláteis majoritárias, 50 % são constituídas de aldeídos, 14 % de hidrocarbonetos e 14 % de álcoois (OETTERER; REGITANO-d'-ARCE; SPOTO, 2006). A deterioração da qualidade organoléptica causada pela oxidação é freqüentemente acompanhada de perda de valor nutritivo e

possivelmente da formação de compostos potencialmente tóxicos (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998).

Óleos e gorduras possuem apenas alguns pontos reativos na molécula, com isso, participam de reações menos variadas durante o processamento e armazenamento do que os componentes hidrossolúveis. Os grupamentos éster, formados entre a carboxila do ácido graxo e a hidroxila do glicerol, pertencem à classe de relativa reatividade, hidrolisando-se a ácidos graxos livres na maioria das vezes. Outros sítios reativos da molécula lipídica são as duplas ligações presentes nas cadeias carbônicas, às quais são sensíveis às reações de oxidação. Depois da deterioração microbiana, a oxidação é a segunda causa mais importante da deterioração de alimentos.

A oxidação lipídica nos alimentos pode ocorrer por auto-oxidação, fotoxidação, termoxidação e oxidação enzimática, sendo favorecida por vários fatores, entre eles, a presença de oxigênio, ácidos graxos insaturados, temperatura, exposição à luz, e presença de metais de dupla valência.

A auto-oxidação ocorre quando o oxigênio atmosférico ou dissolvido na amostra encontra os segmentos mais reativos da molécula do triglicerídeo, ou seja, uma dupla ligação e o respectivo carbono α -metilênico. A auto-oxidação é uma reação de radicais livre em cadeia, que ocorre independentemente da concentração lipídica da formulação. A fotoxidação se diferencia da auto-oxidação pela presença de moléculas de oxigênio singlete, sendo muito mais veloz que a auto-oxidação. O oxigênio em seu estado basal, triplete, não reage diretamente com moléculas que apresentam elétrons pareados, como ácidos graxos, devido à barreira de spins. A passagem do oxigênio do estado triplete para singlete é favorecida pelo ganho de energia de 92 kJ mol^{-1} , o que inicia a reação de oxidação em cadeia na presença de sensibilizadores, como clorofilas ou feofitinas nos óleos, mioglobina nas carnes, e compostos contendo grupos porfirina e riboflavina. O α -

tocoferol e o β -caroteno são agentes supressores, ou seja, reagem mais rapidamente com o oxigênio singlete que a molécula lipídica. O α -tocoferol é altamente ativo, seja por impedir a passagem do oxigênio ao estado singlete, seja por reagir com ele para formar produtos estáveis, ou neutralizando-o de volta ao oxigênio triplete. Já os carotenóides agem inibitoriamente por um mecanismo de transferência de elétrons. A termoxidação é um mecanismo complexo de oxidação de lipídeos, pois em altas temperaturas reações oxidativas e termolíticas podem ocorrer simultaneamente. A oxidação enzimática mais extensivamente estudada é aquela catalisada pela ação da lipoxigenase, proteína ligada a um metal que tem um átomo de ferro em seu centro. Ela é ativada por seu produto e durante a oxidação o Fe^{2+} passa a Fe^{3+} (OETTERER; REGITANO-d'-ARCE; SPOTO, 2006).

3.3.2 Antioxidantes e Metabolismo

A produção de radicais livres ocorre continuamente em todas as células como parte do metabolismo normal. Todavia o excesso na produção de radicais livres originados de fontes endógenas ou exógenas pode estar relacionado com diversas doenças. Um radical livre pode ser definido como qualquer espécie molecular capaz de existir independentemente e que contém um elétron desemparelhado em um orbital atômico. Tais radicais podem, ora doar um elétron, ora abstrair um elétron de outras moléculas, comportando-se dessa forma como oxidantes ou redutores. Neste contexto, os metais de transição, entre eles o ferro e o cobre, que apresentam valência variável, desempenham um importante papel na geração dos radicais livres, participando de reações envolvendo a transferência de um único elétron. Devido a esta alta reatividade, os radicais apresentam tempo de meia vida muito curtos. Os radicais livres mais comuns em estados de doença

são aqueles derivados do oxigênio, particularmente o radical superóxido e hidroxil, este último sendo formado principalmente pela decomposição do radical superóxido e peróxido de hidrogênio, catalisada por metais de transição. A formação de radicais no organismo ocorre por diversos mecanismos, envolvendo fatores endógenos, como vazamento mitocondrial, função respiratória, reações enzimáticas e reações de autooxidação; e ambientais, como cigarros, poluentes atmosféricos, luz ultravioleta, radiação ionizante e xenobióticos. Além do sistema de defesa natural do organismo contra os radicais livres, que consiste, entre outros, das enzimas superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase, os antioxidantes da dieta encontrados naturalmente nos alimentos representam importantes componentes de defesa para o organismo. Um antioxidante pode ser definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas àquelas do substrato oxidável, diminui significativamente ou inibe a oxidação do substrato (YOUNG; WOODSIDE, 2001).

Antioxidantes de quebra de cadeia são moléculas pequenas que podem receber um elétron ou doar um elétron para um radical, formando um bioproduto estável, prevenindo a propagação da reação em cadeia. Entre estes antioxidantes, encontram-se as vitaminas A e E, os carotenóides, flavonóides e ubiquinol-10, de fase lipídica, e vitamina C, ácido úrico, albumina e proteínas ligadas a grupos tióis, de fase aquosa (PETERSON, 2001; YOUNG; WOODSIDE, 2001). Proteínas ligantes de metal de transição, como ferritina, transferrina, lactoferrina e ceruloplasmina, também agem como componente do sistema de defesa antioxidante por seqüestrar ferro e cobre, impedindo que estes estejam disponíveis para induzir a formação de radicais livres. A propriedade quelante do ácido fítico pode representar uma função antioxidante por inibir a formação de espécies reativas de oxigênio induzidas por metais de transição. Os antioxidantes previnem o dano do tecido induzido por radicais livres por prevenir a formação destes, consumi-los ou promover a

sua decomposição. O estresse oxidativo está relacionado com diversos estados patológicos, como arterosclerose, condições inflamatórias, certos tipos de câncer e o processo de envelhecimento (YOUNG; WOODSIDE, 2001).

3.3.3 Antioxidantes e Preservação de Alimentos

O uso de antioxidantes impede ou retarda a reação de oxidação pela remoção ou inativação dos radicais livres de ácidos graxos ou de peróxidos, e por impedir a formação dos produtos responsáveis pela rancidez (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998). Em presença de antioxidantes, a espécie oxidante reage com o antioxidante no lugar do substrato, ou seja, o antioxidante reduz o oxidante. Desta forma, antioxidantes doadores de elétrons podem ser descritos como redutores, e a inativação de oxidantes por redutores pode ser descrita como reações redox nas quais uma espécie reativa é reduzida enquanto outra é oxidada (BENZIE; STRAIN, 1999). Segundo a ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, (BRASIL, 1961), antioxidante é a substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa no alimento.

Os antioxidantes permitidos e mais comumente utilizados no Brasil são os ácidos ascórbico, cítrico e fosfórico, sulfitos, butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), galatos, t-butil hidroquinonas (TBHQ) e tocoferóis. O BHA é uma substância sólida, cristalina, de cor branca e com odor aromático. O BHA comercial é constituído dos isômeros 3- e 2-butil-hidroxianisol. É instável à luz e estável em valor de pH acima de 7,0. Sua atividade aumenta até concentrações de 0,02 % mantendo-se constante mesmo em concentrações mais elevadas. Amplamente usado em cereais matinais, granola, produtos desidratados e outros com baixo teor de gordura, já que o mesmo resiste a altas temperaturas de cozimento e fritura. Segundo a ANVISA o BHA pode ser utilizado no

limite máximo de 0,01 % nos seguintes alimentos: farinhas, leite de côco e similares, óleos e gorduras, margarinas e produtos de cacau. O BHT é um sólido branco, cristalino e de odor fenólico. Nas concentrações permitidas pela legislação não acarreta sabor estranho, sendo que em concentrações acima de 0,02 % o odor fenólico é detectável. É um produto de baixo custo e que apresenta efeito sinérgico quando associado ao BHA (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998) e deve ser utilizado segundo as mesmas regulamentações deste (BRASIL, 1961). Os antioxidantes sintéticos BHT e BHA podem representar risco à saúde, uma vez que são tóxicos aos rins e fígado e interferem na reprodução (CARVALHO, 2005), desta forma, a busca por antioxidantes mais naturais tem estimulado pesquisas na área.

As propriedades antioxidantes do ácido fítico fazem deste constituinte um eficiente conservante natural de alimentos. O AF foi reconhecido em 1997 como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela FDA (*Food and Drug Administration*) (HIX; KLOPFENSTEIN; WALKER, 1997 apud FILGUEIRAS, 2009) e foi revisado como antioxidante no *Codex Alimentarius* com INS (*System for Food Additives*) número 391 (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2003 apud FILGUEIRAS, 2009). O AF tem sido usado como um aditivo em produtos de panificação (HIX; KLOPFENSTEIN; WALKER, 1997 apud FILGUEIRAS, 2009), em alimentos como óleos de soja, carne, frutos do mar enlatados, caviar, frutas e vegetais frescos e agentes corantes em diversos países. A adição de 50 mmol L⁻¹ de ácido fítico em cubos de batata crus retardou a descoloração, perda da firmeza e preveniu o desenvolvimento de odores de putrefação. Resultados similares foram obtidos com maçãs, abacates e bananas. Reações oxidativas catalisadas pelo ferro freqüentemente envolvem ativação do oxigênio e subsequente reação com o ferro, gerando espécies mais reativas, como o radical hidroxila, que apresenta efeito danoso. Um estudo mostrou que a geração de radicais hidroxil é completamente bloqueada pela adição

de quantidades micromolares de ácido fítico, em virtude da formação de um fitato monoférrico que exclui água. Da mesma maneira, a peroxidação do ácido araquidônico também foi prevenida pela adição de ácido fítico (GRAF; EMPSON; EATON, 1987). Adição de ácido fítico nas concentrações de 10 a 50 nmol L⁻¹ reduziu progressivamente a formação de radicais hidroxil gerados por xantina oxidase, sendo que a IC₅₀ para o ácido fítico é de 17 nmol L⁻¹ e que concentrações superiores a 50 nmol L⁻¹ não apresentaram efeito inibitório adicional (RAO et al., 1991). O ácido fítico tem funções antioxidantes em virtude da formação de um quelato único com ferro, em razões fitato:ferro de 1:4 a 20:1, inibindo a geração de radicais hidroxila e atuando como um potente antioxidante na preservação de sementes, o que pode explicar a resistência de ácidos graxos insaturados de sementes de soja ao estresse oxidativo. Este efeito é devido à ocupação dos seis sítios de coordenação do ferro, resultando em quelatos ferro-fitato solúveis e suprimindo as reações oxidativas catalisadas por este metal (GRAF; EMPSON; EATON, 1987; GRAF; EATON, 1990). Quirrenbach et al. (2009) constatou em seu estudo que o ácido fítico interage fortemente com os íons metálicos Fe(II) e Fe(III) tanto em solução quanto no estado sólido, o que pode prevenir processos oxidativos catalisados pelo ferro, visto que o ácido fítico atua como um antioxidante natural.

Leal (2000) utilizou o ácido fítico obtido do germe grosso de milho (GGM) como antioxidante em coxa com sobrecoxa de frango. Determinou o teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) formadas durante a oxidação a 6 ± 1 °C por quatro dias com iluminação fluorescente e observou que a amostra com adição de 4,0 mmol L⁻¹ de ácido fítico obtido do GGM e pH 4,0 produziu 267,88 µg de TBARS/kg, o que representa 38,40 % de inibição da oxidação lipídica comparado com a amostra controle, sem adição de antioxidante, que produziu 434,87 µg de TBARS/kg. Além disso, o resultado obtido com o ácido fítico do GGM não diferiu significativamente da amostra padrão de ácido

fítico (fitato de dodecassódio) que produziu 260,92 µg de TBARS/kg, o que representa 40 % de inibição. Filgueiras et al. (2009) avaliaram o potencial antioxidante do ácido fóico de germe de milho por meio dos ensaios de deoxirribose e batofenantrolina, que avaliam a atividade de seqüestro de radicais livres e a quelação de metais, respectivamente. A atividade de sequestro do radical hidroxil foi dependente da concentração de ácido fóico e a atividade quelante para o Fe^{+2} aumentou com elevação da concentração do ácido fóico e com o tempo de contato com o Fe^{+2} .

Lee e Hendricks (1995) avaliaram o efeito inibitório do ácido fóico em carnes homogeneizadas com diversos tampões. Em todos os casos, a utilização de 2,0 mmol L⁻¹ de ácido fóico inibiu a formação de TBARS. A peroxidação lipídica também foi reduzida de forma dose-dependente, alcançando 86,9 % pela adição de ácido fóico 20 mmol L⁻¹, o que pode ter ocorrido devido ao ácido fóico manter o ferro no estado férrico e formar com este um quelato, que inibe a iniciação e propagação da peroxidação lipídica. A ação antioxidante do ácido fóico foi comparada com àquelas dos antioxidantes ácido ascórbico, BHT e EDTA, todos na concentração de 2 mmol L⁻¹. O ácido fóico inibiu a formação de TBARS em 73,7 %, enquanto que ácido ascórbico, BHT e EDTA inibiram em 50,2, 59,2 e 66,3 %, respectivamente. Este estudo mostrou ainda que a ação antioxidante do ácido fóico é dependente do pH, aumentando com o aumento do pH, alcançando 75,9 % a pH 7,0 e 79,4 % de inibição da peroxidação lipídica a pH 8,0.

Além do germe de milho, a aveia (*Avena sativa* L.) é uma fonte de muitos compostos que exibem atividade antioxidante. Dentre estes compostos encontram-se a vitamina E, os compostos fenólicos e o ácido fóico, concentrados nas camadas internas do cerne (PETERSON, 2001).

3.3.4 Métodos para Determinação da Capacidade Antioxidante

Os métodos mais largamente utilizados para a medida da capacidade antioxidante total são colorimétricos, fluorescentes e quimioluminescentes. Na maioria dos casos, é conveniente utilizar métodos diferentes para avaliar a atividade antioxidante de uma substância para que a confiabilidade dos dados esteja assegurada.

O método de FRAP (*ferric reducing ability of plasma*) é um dos métodos colorimétricos bastante utilizado para medida da atividade antioxidante. Neste método, o complexo sem cor Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazeno) é reduzido a um complexo azul Fe^{2+} -TPTZ pela ação de antioxidantes, agentes redutores doadores de elétrons, com aumento na absorbância em 593 nm. O desenvolvimento de coloração comprova que um redutor, um antioxidante, está presente e que a reação de oxi-redução está ocorrendo. No ensaio de FRAP um excesso de Fe^{3+} é usado, e a formação de cor está relacionada à capacidade redutora da amostra testada. Os valores de FRAP são obtidos pela comparação da mudança de absorbância da amostra com soluções contendo íons ferrosos em concentração conhecida (BENZIE; STRAIN, 1996; BENZIE; STRAIN, 1999). O método de FRAP foi adotado por diversos autores para avaliar a capacidade antioxidante de diferentes amostras (TSAI et al., 2002; TSAI; HUANG, 2004; AHN et al., 2004; EREL, 2004, deGRAFT-JOHNSON et al., 2007).

Os ensaios de radical DPPH são baseados na transferência de elétrons de uma molécula doadora ao referido radical. O radical livre estável α,α -difênil- β -picrilhidrazil ou 2,2-difênil-1-picrilhidrazil é geralmente utilizado em laboratórios nos quais experimentos de ressonância de spin de elétron são realizados, devido ao paramagnetismo conferido pelos elétrons desemparelhados. Este radical pode aceitar um elétron ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável, diamagnética, e é dificilmente oxidado.

Devido ao seu elétron desemparelhado, o DPPH mostra uma forte banda de absorção em 517 nm em etanol e suas soluções apresentam coloração violeta intenso. Com o emparelhamento dos elétrons, a absorção desaparece e a descoloração resultante é estequiométrica com o respectivo número de elétrons recebidos. A absorção do DPPH é relativamente estável com respeito às mudanças de pH, exceto para soluções altamente alcalinas. Na faixa de pH de 5,0-6,5 a absorção em 517 nm é independente do pH (BLOIS, 1958). Com relação à temperatura, o ensaio também apresenta facilidade e segurança, pois ocorre à temperatura ambiente, evitando desta forma a degradação térmica das substâncias (PETERSON, 2001). A capacidade de sequestrar radicais DPPH livres é uma metodologia simples, rápida e sensível (ROESLER et al., 2007). Embora não tenha potencial redox suficientemente alto para oxidar glucose, purinas, pirimidinas ou compostos aromáticos com apenas um grupo hidroxila, o radical DPPH oxida compostos como cisteína, glutatona, ácido ascórbico, tocoferol, compostos polihidroxiaromáticos e aminas aromáticas (BLOIS, 1958).

Adicionando hidrazina (DPPHH), a forma reduzida do radical DPPH, ao fim da reação entre BHT e DPPH, Bondet, Brand-Williams e Berset (1997) verificaram que a reação do BHT é completa, pois não houve aumento na porcentagem de DPPH remanescente no estado estacionário. O estudo mostrou que o BHT é um antioxidante eficiente, pois uma molécula é capaz de reduzir aproximadamente 3 (2,8) moléculas de DPPH, apesar de a reação ser muito lenta e alcançar o estado estacionário após 5 horas. Ainda, o baixo valor de energia de ativação (35 kJ mol^{-1}) da reação entre BHT e DPPH mostra que a reação antiradicalar é termodinamicamente favorecida.

As metodologias descritas na literatura para determinar o nível antioxidante no plasma não realizam tais determinações em condições fisiológicas. Este também é o caso para o ensaio de FRAP, o qual é realizado em pH baixo ($\text{pH} = 3,6$), diferente do valor encontrado

em fluidos biológicos. Todavia este método apresenta a vantagem de determinar a atividade antioxidante no plasma integral, não depende de métodos enzimáticos ou não enzimáticos para gerar radicais livres iniciadores de cadeia, e não há necessidade de isolar frações do plasma para análise. Metodologicamente, o método de FRAP apresenta vantagens sobre outras metodologias comumente utilizadas e os resultados obtidos são comparáveis (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000).

Os polifenóis apresentam atividade antioxidante porque além de quelar íons metálicos, agem como doadores de elétrons (BENZIE; SZETO, 1999). De maneira geral, existe uma correlação positiva entre o conteúdo fenólico e a atividade antioxidante, porém, esta correlação muitas vezes é contraditória. Enquanto alguns autores (XI; SHOUQIN, 2007; BENZIE; SZETO, 1999; ZARDO et al., 2009; ROESLER et al., 2007; BERTONCELJ et al., 2007; BERETTA et al., 2005) observaram uma alta correlação, Nsimba, Kikuzaki e Konishi (2008) encontraram a menor atividade sequestrante de radicais DPPH (59,2 %) para um tipo de *C. quinoa* que apresentou o maior conteúdo fenólico (148,0 mg g⁻¹ TAE). Todavia, o ensaio de FRAP mostrou a maior atividade antioxidante (8,2 mmol L⁻¹) para a mesma amostra. Segundo Roesler et al. (2007), a correlação entre o conteúdo fenólico e a capacidade antioxidante pode depender do método escolhido e também das características hidrofóbicas ou hidrofílicas do sistema teste e dos antioxidantes testados. Segundo Nsimba, Kikuzaki e Konishi (2008), os baixos valores de correlação entre o total fenólico e a atividade antioxidante sugerem que os principais compostos antioxidantes dos sistemas de *Chenopodium quinoa* e *Amaranthus* spp. estudados podem ser não-fenólicos, como ácido ascórbico e ácido fítico (compostos solúveis em água), tocoferóis, esteróis e carotenóides (compostos lipofílicos) e saponinas (solúvel em butanol). Desta forma, é importante que os resultados de ensaios antioxidantes determinados a partir de diferentes métodos sejam interpretados com cautela (NSIMBA; KIKUZAKI; KONISHI, 2008).

Ahn et al. (2003) investigaram o efeito da irradiação gama sobre a atividade antioxidante do ácido fítico. O estudo mostrou que a habilidade do ácido fítico de consumir o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil foi significativamente aumentada pela irradiação e positivamente correlacionada com a dose da mesma, enquanto que uma solução de ácido fítico não irradiada não apresentou atividade consumidora de radicais, independente da concentração empregada de ácido fítico. A capacidade consumidora máxima foi observada em amostras irradiadas a 20 kGy na concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em modelos lipídicos, todas as concentrações testadas de ácido fítico apresentaram atividade antioxidante após armazenamento por duas semanas a 37 °C, porém, as concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram as mais eficientes.

Um estudo comparativo foi realizado por Ahn et al. (2004) para avaliar a atividade antioxidante do ácido fítico irradiado e de antioxidantes comumente utilizados na indústria de alimentos, como ácido ascórbico, tocoferol e BHA. O ácido fítico 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ irradiado a 20 kGy mostrou capacidade consumidora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) maior do que do ácido ascórbico, enquanto que o ácido fítico não irradiado não apresentou atividade consumidora de radicais DPPH a qualquer concentração. Antioxidantes artificiais como BHA e BHT apresentam atividade antioxidante efetiva em baixas concentrações, porém a toxicidade destes compostos deve ser considerada. O poder antioxidante do ácido fítico, avaliado pelo ensaio de FRAP, também foi aumentado pela irradiação, porém foi inferior aos valores de FRAP para ácido ascórbico, tocoferol e BHA. Aplicando-se os diferentes antioxidantes em modelos lipídicos de óleos de soja emulsificados, o ácido fítico irradiado a 20 kGy e na concentração de 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ mostrou a melhor capacidade antioxidante durante o armazenamento por 3 semanas.

3.4 PROPRIEDADES ÁCIDO-BÁSICAS

3.4.1 Ionização do Ácido Fítico

O equilíbrio ácido-base afeta fenômenos como solubilidade e interações com íons e ligantes. Os processos de protonação/deprotonação do ácido fitico ocorrem sobre uma larga faixa de pH e os diferentes meios iônicos afetam o comportamento geral ácido-base. Todavia, a natureza aniônica do eletrólito suporte não influencia acentuadamente nos valores das constantes de protonação do ácido fitico. Em meio de metal alcalino, um efeito peculiar ocorre entre as estabilidades das três primeiras espécies protonadas. Segundo Crea et al. (2008), quando a força iônica do meio reacional consistir em LiCl, uma tendência normal é observada ($\log K_1 > \log K_2 > \log K_3$). Já em NaCl ($\log K_2 > \log K_1 > \log K_3$), e em KCl e CsCl ($\log K_1 > \log K_3 > \log K_2$) alterações são observadas.

Bebot-Brigaud et al. (1999), realizaram estudos de ^{31}P NMR, potenciométricos e espectrofotométricos e determinaram oito constantes de acidez para o ácido fitico a 20 °C e em 0,17 mol L⁻¹ de Et₄NClO₄. Os primeiros seis valores de pK_a foram relativamente baixos e correspondem à dissociação do primeiro próton de cada grupo fosfato. A dissociação dos prótons remanescentes ocorre em pH mais elevado, sendo mais difícil especialmente para os quatro últimos prótons. Em torno de pH 2,0; cerca de quatro prótons são ionizados, sendo que neste valor de pH, diversos equilíbrios ocorrem, porém, representam apenas uma singela influência nos valores de pH. A curva de titulação apresenta dois platôs, em pH 4,5 e 8,5-9,0, o que corresponde a uma estabilidade relativa de H₆L e H₄L, respectivamente. Ao final da titulação, três prótons permanecem ligados ao ácido fitico, correspondendo aos elevados valores das três últimas constantes de acidez.

As constantes de protonação do ácido fítico em iodeto de tetraetilamônio, um meio considerado inerte, e em NaCl, o sal inorgânico mais importante em fluidos naturais foram determinadas por De Stefano, Milea e Sammartano (2003). A protonação do ácido fítico mostrou depender fortemente do meio e força iônica. As constantes de protonação obtidas em NaCl foram consideravelmente menores do que as correspondentes em iodeto de tetraetilamônio, provavelmente devido às fortes interações entre o ácido fítico e os cátions sódio.

Considerando apenas os sete primeiros passos de protonação, devido aos cinco prótons remanescentes do ácido fítico serem considerados como fortemente acídicos ($\log K_i^H \leq 1,8 \leq i \leq 12$), De Stefano, Milea e Sammartano (2004) determinaram os valores de entalpia e entropia de protonação do ácido fítico em meio aquoso, a diferentes forças iônicas de cloreto de sódio, e à temperatura de 25 °C. Este estudo revelou que as entalpias de protonação aumentam com o aumento da protonação e que as TΔS do sistema são maiores do que as correspondentes ΔH, o que é típico para ligantes fosfato. Para a 7ª protonação, os valores de ΔH e TΔS obtidos foram 4,2 e 19 KJ mol⁻¹, respectivamente.

Utilizando-se da técnica potenciométrica, Carli (2005) determinou oito constantes de protonação para o ácido fítico padrão na forma de sal de dipotássio, à temperatura de 36 °C, força iônica a 0,100 mol L⁻¹ de KCl e atmosfera inerte de argônio. As deprotonações ocorreram na região de pH 2 a 4 e de 6 a 11. A primeira protonação apresentou valor de Log k 10,81. Este valor elevado refere-se ao oitavo hidrogênio ionizável e deve-se à alta densidade de carga negativa sobre a estrutura do ácido fítico. Em pH 11,9, o ácido fítico encontrou-se totalmente deprotonado, com máximo de formação de 97,5 %.

3.4.2 Formação de Compostos de Coordenação

Alguns complexos metal-fitato são conhecidos por serem altamente insolúveis em uma larga faixa de pH. No intestino delgado, diversos componentes presentes nos alimentos formam complexos solúveis ou insolúveis com minerais e elementos traço. Componentes como ácido cítrico, ácido ascórbico, lactose e alguns aminoácidos apresentam um efeito benéfico na bioeficiência de elementos traço, enquanto ácido fítico e compostos fenólicos podem representar um efeito negativo na absorção de minerais (PLAAMI, 1997).

O ácido fítico forma complexos solúveis com Ca^{2+} a baixos valores de pH (CREA et al. 2008). Ingestão elevada de fibras na dieta (40–50 g/dia) diminuem a absorção de magnésio devido à ação quelante do ácido fítico associado com a fibra. Todavia, o consumo de produtos ricos em ácido fítico e celulose aumentam a ingestão de magnésio, o que compensa a diminuição na absorção. Porém, os efeitos dos componentes da dieta, como o ácido fítico, sobre a absorção do magnésio são importantes apenas quando a ingestão de magnésio é baixa (WHO a, 2004). O hexafosfato de inositol é um dos fatores determinantes na absorção e utilização do zinco da dieta. A razão molar entre fitato e zinco em refeições é um indicador útil do efeito do ácido fítico na diminuição da absorção do zinco. À razões molares acima da faixa de 6–10, a absorção do zinco começa a diminuir, à razões acima de 15, a absorção é tipicamente menor do que 15 %. Todavia, o efeito do fitato é modificado pela fonte e quantidade de proteínas consumidas na dieta. Proteínas animais melhoram a absorção de zinco a partir de uma dieta contendo fitato (WHO b, 2004). O ácido fítico também inibe fortemente a absorção do ferro de forma dose dependente, e até mesmo pequenas quantidades apresentam um efeito pronunciado. Porém, a ingestão de ácido ascórbico na dieta pode contrapor esta inibição (WHO c, 2004).

Apesar de a mucosa intestinal apresentar alguma atividade de fitase, a maioria do ácido fítico ingerido passa pelo trato gastrointestinal intacto (GRAF; EATON, 1990; PLAAMI, 1997).

Champagne e Hinojosa (1987) estudaram as interações do ácido fítico com os íons Cu(II) e Zn(II) em função da concentração de íon metálico e pH. As estabilidades relativas dos fitatos de cobre e zinco foram semelhantes e elevadas a valores de pH baixos. A ligação de íons Cu(II) à molécula de ácido fítico parece ocorrer a baixos valores de pH (2,4-3,4). O Zn(II) forma complexos com ácido fítico que são mais estáveis do que aqueles com o íon Cu(II). Todavia, a molécula de ácido fítico acomodou o íon Cu(II) mais prontamente do que o íon Zn(II), sendo que em iguais quantidades de íons Cu(II) e Zn(II), 2 íons Zn(II) e 2, 3, 4 ou 4,5 íons Cu(II) foram encontrados por molécula do ácido fítico.

Utilizando-se de técnica potenciométrica Persson et al. (1998) estudaram a interação entre os íons metálicos Cu^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} e frações isoladas de fosfatos de inositol com 6, 5, 4 e 3 grupos fosfatos (IP6-IP3). O estudo foi realizado na faixa de pH 3-7, que corresponde à parte superior do duodeno, onde ocorre a absorção mineral. As frações de fosfato de inositol estudadas apresentaram uma pronunciada capacidade quelante entre pH 5,0 e 7,0. A força de interação dos complexos formados apresentou a ordem $\text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$ para todos os fosfatos de inositol, sendo que a capacidade quelante de íons metálicos está relacionada com o número de grupos fosfato na molécula. A formação dos complexos de IP4 e IP3 iniciou a valores elevados de pH, indicando a formação de complexos fracos, sendo também mais solúveis que os complexos de IP6 e IP5. O íon Zn^{2+} se liga preferencialmente ao ácido fítico 5ax/1eq, presente em menor quantidade no equilíbrio, enquanto que Cu^{2+} se liga preferencialmente ao ácido fítico 5eq/1ax, o que pode explicar a leve precipitação observada para o complexo zinco-fitato. Para IP6 e IP5 a formação de complexos iniciou em torno de pH 3,5 e para fosfatos de inositol inferiores

em torno de 4,0; e, para IP6, a diferença de estabilidade entre complexos de Cu e Zn foi pequena.

A fim de estudar as propriedades de complexação do ácido fítico frente aos íons metálicos Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} e Cd^{2+} , Bebot-Brigaud et al. (1999), realizaram estudos de ^{31}P NMR, potenciométricos e espectrofotométricos. Titulações potenciométricas de soluções com concentração de metal variando de $4,0 \times 10^{-4}$ a $2,8 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e razões ligante para metal variando de 1 a 6,7 foram realizadas para determinar as constantes de formação dos complexos. As curvas obtidas para o ligante com e sem íon metálico se separam em torno de pH 4,0, após a neutralização de um próton por sítio fosfato. O platô próximo a pH 8,5-9 é também observado na presença de Zn^{2+} . Os autores ainda observaram, a partir das curvas de distribuição das espécies, que os íons metálicos permaneceram livres em solução até pH 8,0.

A técnica de titulação potenciométrica foi utilizada para determinar as constantes de complexação em condições próximas às fisiológicas dos complexos ácido fítico e Mn(II) , ácido fítico e Co(II) (CARLI; 2005) e ácido fítico e Ni(II) (DE CARLI et al.; 2006). Foram obtidas nove constantes de estabilidade para o complexo ácido fítico e Mn(II) , oito para o complexo ácido fítico e Co(II) (CARLI; 2005) e sete para o complexo ácido fítico e Ni(II) (DE CARLI et al.; 2006). As reações de protonação e formação ocorrem na faixa de pH de 2,0 a 11,0, sendo que em pH 12 o ligante encontra-se totalmente deprotonado. Os complexos também foram submetidos à análise térmica, onde evidenciaram-se a estabilidade dos mesmos. As perdas de massa ocorreram em três etapas principais e em temperaturas similares ao ácido fítico padrão na forma de sal de dipotássio (CARLI; 2005).

Torres et al. (2008) descreveram as interações do ácido fítico com os íons metálicos Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} e Ba^{2+} em um meio inerte de NMe_4Cl $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ a 37°C .

A interação dependeu fortemente da carga do cátion, mas apenas fracamente do raio iônico dentro de cada série. Enquanto os íons monovalentes interagem muito fracamente sempre a pH alto, os cátions divalentes são ligados pelo ácido fítico em uma extensão considerável a pH neutro e quase completamente a pH alto. A valores de pH fisiológico, todos os íons de metais alcalino terrosos apresentaram interação considerável com o ácido fítico seguindo a ordem $Mg \sim Ba > Sr > Ca$.

Utilizando-se de titulação potenciométrica, Quirrenbach et al. (2009) determinaram as constantes de formação dos complexos de ácido fítico com os íons metálicos Fe(II) e Fe(III) em condições próximas às fisiológicas. Dez hidrogênios ionizáveis foram detectados na região de pH de 2,0 a 11,0. Sete constantes de formação do complexo ácido fítico-Fe(II) foram determinadas, correspondente a formação de sete espécies diferentes na região de pH 2,0 a 12,0. A constante de formação para a espécie $[MHL]^{9-}$ apresentou $\log K=16,06$, atingindo um máximo de formação de 98,7 % em pH 11,9, indicando uma elevada interação entre o ligante monoprotonado e o metal. Para o sistema ácido fítico-Fe(III), obtiveram-se sete constantes de formação, correspondente a formação de sete espécies na região de pH de 2,5 a 12,0, sendo que a constante de formação para a espécie $[ML]^{9-}$ apresentou $\log K=18,87$, atingindo um máximo de formação de 48 % em pH 9,8.

Estudos mostram que à medida que o ligante torna-se mais protonado, as constantes de estabilidade decrescem, sugerindo que quanto mais deprotonado estiver o ácido fítico, mais fortemente interage com o íon metálico (CARLI, 2005; DE CARLI et al., 2006; QUIRRENBACH, 2007, QUIRRENBACH et al., 2009).

A fim de caracterizar e acompanhar a formação dos complexos entre o ácido fítico e os íons metálicos Fe(II) e Fe(III) em solução aquosa, Quirrenbach et al. (2009) realizaram estudos espectroscópicos de absorção na região do ultravioleta-visível. Estes estudos revelaram que o ácido fítico não absorve na faixa de comprimento de onda de 200 a 800

nm. À medida que se eleva o pH, o ligante torna-se mais deprotonado, aumentando os sítios de coordenação livres do ligante, favorecendo a complexação com o íon metálico. A formação de duas bandas de absorção nas regiões de comprimento de onda de 216 e 279 nm e 218 e 274 nm foram observadas para os sistemas ácido fítico-Fe(II) e ácido fítico-Fe(III), respectivamente, sendo elas características de transferência de elétrons do ligante para o metal. As energias de ligação de 428 KJ mol^{-1} e 436 KJ mol^{-1} , correspondentes às bandas em 279 e 274 nm, respectivamente, indicam que a interação entre o ligante e os íons metálicos é forte, o que equivale a uma ligação coordenativa. Os complexos de ácido fítico-Fe(II) e ácido fítico-Fe(III) obtidos no estado sólido foram caracterizados por infravermelho. O espectro de infravermelho do ácido fítico dipotássico na ausência de íons metálicos mostrou absorção em $1647,1 \text{ cm}^{-1}$, característica do grupo $\text{O}=\text{P}(\text{OH})$. O grupamento $\text{P}=\text{O}$ absorveu em $1222,8 \text{ cm}^{-1}$ e as ligações sigma $\text{P}-\text{OH}$ mostraram absorção em $1070,4 \text{ cm}^{-1}$ (estiramento simétrico) e 966 cm^{-1} (estiramento assimétrico). Estes dados estão de acordo com Torres et al. (2008). Os espectros de infravermelho dos complexos apresentaram deslocamentos das absorções características do ácido fítico, o que indicam a interação deste ligante com os íons metálicos estudados (QUIRRENBACH et al., 2009). Deslocamentos também foram observados para os complexos de Mn(II), Co(II) (CARLI; 2005) e Ni(II) (DE CARLI et al., 2006).

3.5 AVALIAÇÃO TECNOLÓGICA DA MATÉRIA-PRIMA

Estudos relatam à presença do ácido fítico em uma grande variedade de sementes. Algumas destas sementes não são bem conhecidas, sendo grosseiramente subutilizadas relativamente ao seu potencial. As sementes de abóbora (*Cucurbita spp*), melancia (*Citrullus spp*) e melão (*Cucumis melo L.*) são potencialmente nutritivas e podem ser

utilizadas alternativamente no enriquecimento de farinhas, auxiliando no combate à desnutrição em países em desenvolvimento. (EL-ADAWY; TAHA, 2001; ENUJIUGHA; AYODELE-ONI, 2003).

O mamão (*Carica papaya* L.), espécie da família *Caricaceae*, é um fruto que possui numerosas sementes negras envolvidas numa mucilagem transparente, as quais contém cerca de 25 % de gordura, tornando-as interessantes do ponto de vista nutricional. As sementes são consideradas vermífugas e o número delas influencia o desenvolvimento da polpa. A abóbora (*Cucurbita pepo* L.), a melancia (*Citrullus lanatus*), e o melão (*Cucumis melo* L.) são espécies da família *Cucurbitaceae*. As sementes de abóbora possuem propriedades anti-helmínticas. O fruto da melancia apresenta numerosas sementes, achatadas, sub-elípticas, avermelhadas ou negras, que possuem elevados teores de gordura, o que a torna um fruto de grande interesse nutritivo. O óleo das sementes contém elevados teores de tocoferóis, o que o torna muito estável. As sementes podem ser consideradas como vermífugos. As sementes do melão estão envolvidas num tecido placentário central gelatinoso, amarelo (FERRÃO, 1999).

A produção mundial de mamão, melancia e melão no ano de 2005 foram 6.753; 95.292 e 28.321 milhões de toneladas, respectivamente. No Brasil, a produção foi de 1.650; 622 e 180 milhões de toneladas, respectivamente. No Brasil, os principais Estados produtores de mamão são a Bahia e o Espírito Santo, de melancia os Estados do Rio Grande do Sul e São Paulo e de melão os Estados do Rio Grande do Norte e Ceará (MANICA; MARTINS; VENTURA, 2006).

As sementes de abóbora (*Cucurbita pepo*) e melancia (*Citrullus vulgaris*) são excelentes fontes de proteína (36,5 % e 35,7 %, respectivamente) e óleos (51,01 % e 50,10 %, respectivamente), dos quais grande quantidade é representada pelos ácidos graxos insaturados (76,5 % e 78,4 %, respectivamente), consistindo principalmente de ácidos

linoleico (C18:2) e oléico (C18:1), o que pode ser interessante para algumas formulações alimentares. A presença de altas quantidades de ácido linoleico sugere que estes óleos são altamente nutritivos, devido à sua habilidade em reduzir o colesterol. A composição em aminoácidos de sementes de abóbora e melancia é similar e bastante variada, apresentando um total de aminoácidos essenciais e não essenciais igual a 33,4-34,6 e 66,6-65,6 g/16 g de nitrogênio, respectivamente, sendo que para ambas as sementes o primeiro aminoácido limitante é a lisina. As sementes de abóbora e melancia apresentam uma rica composição mineral, sendo boa fonte de fósforo (1090 e 1279 mg/100 g), potássio (982 e 1176 mg/100 g), magnésio (483 e 542 mg/100 g), cálcio (130 e 150 mg/100 g), manganês (8,9 e 9,9 mg/100 g) e ferro (10,9 e 12,1 mg/100 g), respectivamente. As farinhas de sementes de abóbora e melancia apresentam digestibilidade protéica *in vitro* de 90 % e 87,91 %, respectivamente. Além disso, apresentam elevada quantidade de ácido fítico (2,37 e 2,63 g/100 g em base seca) (EL-ADAWY; TAHA, 2001).

As sementes de melão também apresentam altos conteúdos de óleos (439,3 g kg⁻¹ DM-*dry matter*) e proteínas (314,1 g kg⁻¹ DM), e possuem um valor energético de 5368,6 kcal kg⁻¹ DM. As sementes apresentam uma rica e variada composição mineral, contando com altos níveis de K (3,90 g kg⁻¹ DM), Mg (3,43 g kg⁻¹ DM), P (2,80 g kg⁻¹ DM) e Ca (1,17 g kg⁻¹ DM). Apresentam ainda um conteúdo de ácido fítico de 1,77 g kg⁻¹ DM (ENUJIUGHA; AYODELE-ONI, 2003).

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.6.1 Cromatografia

A cromatografia reúne um conjunto importante de métodos que permite separar componentes estreitamente relacionados em misturas complexas, o que em algumas ocasiões é impossível por outros métodos. Em geral, em todas as separações cromatográficas a amostra se desloca com uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Esta fase móvel passa através de uma fase estacionária, com a qual é imiscível e que se fixa em uma coluna ou superfície sólida. Os componentes da amostra se distribuem de modo distinto entre a fase móvel e a fase estacionária. Aqueles componentes que são fortemente retidos pela fase estacionária se movem lentamente com o fluxo da fase móvel; ao contrário, os componentes que se unem fracamente à fase estacionária se movem rapidamente. Como consequência da distinta mobilidade, os componentes da amostra se separam em bandas que podem ser analisadas quali e/ou quantitativamente (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

3.6.1.1 Cromatografia de Troca Iônica

A cromatografia de troca iônica tem sido aplicada a vários sistemas orgânicos e bioquímicos, incluindo drogas e seus metabólitos, soros, conservantes de alimentos, misturas de vitaminas, açúcares e preparações farmacêuticas (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Na cromatografia por troca iônica, um dos tipos de cromatografia em coluna ou por adsorção, a fase estacionária é altamente carregada, sendo que os solutos com cargas de sinais contrários a esta são seletivamente adsorvidos da fase móvel. Os solutos adsorvidos podem ser subsequentelemente eluídos, por deslocamentos com outros íons, com o mesmo tipo de carga, porém com maior força de interação com a fase estacionária. Os trocadores aniônicos trocam ânions e apresentam grupos iônicos positivos ligados à matriz; inversamente, os trocadores catiônicos trocam cátions e apresentam grupos iônicos negativos ligados à matriz. Os diferentes graus de afinidade eletrostática entre o trocador e os íons da fase móvel regem este tipo de cromatografia. A separação de materiais está baseada na adsorção reversível e diferencial dos íons da fase móvel pelo grupo trocador da matriz. A diferença de afinidade entre os íons da fase móvel e a matriz é devido à diferença de carga, sendo possível controlá-la utilizando fatores como o pH e a força iônica (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

3.6.1.2 Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. É uma técnica utilizada para análises quali/quantitativas de fácil compreensão e execução. As separações ocorrem em um breve espaço de tempo, apresenta versatilidade, grande reprodutibilidade e baixo custo. Baseada no fenômeno da adsorção pode ser considerada uma técnica analítica ou preparativa, e os adsorventes mais utilizados são sílica, alumina, terra diatomácea, celulose e poliamida, dependendo das características da amostra que se deseja resolver por cromatografia (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997).

3.6.2 Espectroscopia no Ultravioleta-Visível

A estrutura eletrônica da molécula determina a absorção molecular na região do ultravioleta visível do espectro. Essa absorção de energia é quantizada e conduz à passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia em um estado excitado (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994). A absorção de radiação ultravioleta ou visível geralmente resulta da excitação de elétrons de ligação, consequentemente, os comprimentos de onda dos picos de absorção podem ser correlacionados com os tipos de ligações das espécies em estudo. Muitos complexos exibem absorção por transferência de carga. Para que um complexo apresente um espectro de transferência de carga, é necessário que um de seus componentes tenha características de doador de elétrons e o outro tenha propriedades de receptor de elétrons. Neste caso, a absorção de radiação envolve a transferência de um elétron do doador a um orbital associado ao receptor. Como consequência, o estado excitado é o produto de uma espécie de processo interno de oxidação/redução (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002). O espectro do UV-Vis obtido é um gráfico de comprimento de onda *versus* a intensidade da absorção (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRIL, 1994).

3.6.3 Espectroscopia no Infravermelho

A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro situada entre as regiões do visível e das microondas. A radiação no infravermelho em frequência menor do que aproximadamente 100 cm^{-1} quando absorvida por uma molécula orgânica, converte-se em energia de rotação molecular. O processo de absorção é quantizado e em consequência o espectro de absorção das moléculas consiste em uma série de linhas. A radiação

infravermelha na faixa de 10000 a 100 cm^{-1} , quando absorvida converte-se em energia de vibração molecular. O processo é também quantizado e o espectro vibracional aparece como uma série de bandas, pois a cada mudança de nível de energia vibracional corresponde uma série de mudanças de níveis de energia rotacional. A frequência ou o comprimento de onda de uma absorção depende das massas relativas dos átomos, das constantes de força das ligações e da geometria dos átomos (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

A radiação infravermelha não é energética o suficiente para causar transições eletrônicas. A absorção deste tipo de radiação é restrita a espécies moleculares que tem diferenças de energia pequenas entre vários estados vibracionais e rotacionais. Para absorver radiação infravermelha, uma molécula precisa sofrer uma variação no momento de dipolo como consequência do movimento vibracional ou rotacional. Apenas nessas circunstâncias o campo elétrico alternado da radiação pode interagir com a molécula e causar variações na amplitude de um de seus movimentos. Se a frequência da radiação coincidir com a frequência vibracional natural da molécula, ocorre uma transferência de energia efetiva e resulta em uma variação da amplitude da vibração molecular, ocorrendo conseqüentemente, a absorção da radiação. Do mesmo modo, a rotação de moléculas assimétricas em torno de seus centros de massa resulta em uma variação periódica do dipolo que pode interagir com a radiação. As vibrações podem ser divididas em duas categorias: estiramentos e deformações angulares. Uma vibração de estiramento envolve uma variação contínua na distância interatômica ao longo do eixo da ligação entre dois átomos, e podem ser de dois tipos: simétrico e assimétrico. As vibrações de deformações angulares são caracterizadas pela variação do ângulo entre duas ligações e são de quatro tipos: tesoura, balanço, sacudida e torção. Todos estes tipos de vibrações são possíveis em uma molécula contendo mais de dois átomos (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

3.6.4 Potenciometria

A potenciometria é uma técnica baseada na diferença de potencial elétrico (E) de uma reação em eletrodo, a qual é gerada em solução aquosa contendo um ligante ou um sistema ligante-íon metálico. O potencial (E) pode ser medido pela combinação de dois eletrodos (um de referência e outro de medida). Sabendo o potencial do eletrodo de referência (E_r), pode-se deduzir o valor do potencial (E) (MARTELL; MOTEKAITIS, 1992).

O sistema de eletrodos de referência mais utilizado é o eletrodo de prata/cloreto de prata (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002), enquanto o de medida é o de vidro, que é formado por um bulbo de vidro, contendo solução de HCl com concentração conhecida e um fio de prata coberto com cloreto de prata, completando o circuito elétrico. É sensível aos íons H^+ em solução, e a atividade do íon H^+ pode ser calculada através da equação de Nernst. Em soluções diluídas, a atividade iônica medida é equivalente à concentração iônica (MARTELL; MOTEKAITIS, 1992).

Como o potencial de eletrodo H^+ na célula H_2/H^+ , $Cl^-/AgCl/Ag^+$ é diretamente proporcional ao coeficiente de atividade do contra íon cloreto e à atividade do íon H^+ , se a força iônica for mantida constante no sistema, o coeficiente de atividade será constante e o potencial de eletrodo H^+ vai variar linearmente com a concentração dos íons, bem como com a sua atividade. Quando o eletrodo H^+ é substituído por um eletrodo de vidro, em presença do eletrodo de referência, essa relação também se mantém, desde que o eletrólito suporte permaneça como condutor iônico dominante no sistema medido (MARTELL; MOTEKAITIS, 1992).

A partir da titulação potenciométrica de ligantes, determina-se as constantes de protonação através de cálculos com um sistema computacional BEST7, e para o sistema

ligante-íon metálico, determina-se as constantes de equilíbrio. Estes dados servem para avaliar cada espécie formada à medida que o ligante vai deprotonando na reação com adição de base, e a tendência de complexação do ligante por um íon metálico em solução, respectivamente. A entrada de dados para o programa BEST7 consiste no fornecimento de mmols de cada componente, molaridade da base, o volume total da solução, o perfil de pH obtido da titulação potenciométrica e as possíveis espécies formadas em solução. O programa utiliza equações de balanço de massa para determinar as constantes de protonação e estabilidade, as quais podem ser definidas como o quociente envolvendo as concentrações das espécies de produtos pelas concentrações das espécies reagentes no equilíbrio, segundo as Equações 01 e 02.



$$K_{eq} = \frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \quad (02)$$

onde K_{eq} corresponde à constante de equilíbrio, os [] indicam a concentração molar das espécies em solução e a, b, c e d os coeficientes estequiométricos.

Os dados são ajustados em um ou vários parâmetros, com um algoritmo programado para minimizar o desvio padrão e com isso coincidir ao máximo os valores de pH calculados com os valores de pH observados, aumentando assim a sensibilidade dos cálculos computacionais. As constantes de protonação e de formação dos complexos definem as curvas de distribuição das espécies através do programa SPEPLOT, onde os percentuais máximos de cada espécie presente em solução são desenhados em relação à variação do pH, possibilitando avaliar o percentual de cada espécie presente em solução.

Os gráficos das curvas de titulação para os sistemas exibem valores de **pH** *versus* **a** (a = número de mmols da base dividido pelo número de mmols do ligante), e indicam a região de pH onde pode-se encontrar hidrogênios substituíveis bem como o número de prótons ionizáveis (MARTELL; MOTEKAITIS, 1992).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matéria-Prima

As sementes de abóbora, melancia, melão e mamão, adquiridas no mercado local no ano de 2008, foram removidas da polpa e utilizadas como matéria-prima.

4.1.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados para execução deste trabalho foram de grau analítico. A água utilizada foi destilada e deionizada (Millipore). Ácido clorídrico 36-38 % (Reagen). Todas as soluções ácidas e básicas foram padronizadas por titulação ácido-base.

Ácido fítico na forma de fitato de dodecassódio de milho ($C_6H_6O_{24}P_6Na_{12}$), 90 % de pureza, Sigma®, e na forma de sal de dipotássio ($K_2C_6H_{16}P_6O_{24}$), Sigma®, com grau de pureza maior que 97 % foram utilizados como padrões.

A solução metálica de Fe(III) foi preparada mediante a diluição do cloreto de ferro(III) hexahidratado, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Aldrich). A padronização foi realizada por titulação complexométrica conforme descrito por Schwarzenbach (1969).

Utilizou-se cloreto de sódio, NaCl (Merck) e KCl (Merck) como eletrólito suporte para manter a força iônica constante a $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ nos sistemas reacionais.

As soluções de hidróxido de sódio, NaOH, e hidróxido de potássio, KOH, foram preparadas a partir da diluição de uma ampola Dilut-it (Merck) com água deionizada ultra

pura e padronizada por titulação com biftalato ácido de potássio (Reagen), padrão primário, e como indicador a fenolftaleína.

O reagente de Wade foi preparado pela mistura de cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) $1,10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, 0,03 %, (Aldrich) e ácido sulfossalicílico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, 0,3 % (Sigma-Aldrich), em água deionizada ultra-pura. Esta solução foi diluída na proporção de 1:1 (v/v) com água deionizada ultra pura para a realização das análises.

O reagente de FRAP foi preparado pela mistura de 25,0 mL de uma solução tampão de acetato de sódio pH 3,6; 2,5 mL de solução de TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazeno), Sigma-Aldrich, 10 mmol L^{-1} em HCl 40 mmol L^{-1} ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) e 2,5 mL de solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Aldrich) 20 mmol L^{-1} .

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparação da Amostra

As sementes foram removidas da polpa manualmente, secas a temperatura ambiente e trituradas em liquidificador comum devidamente limpo e seco. O material obtido foi peneirado, a fim de se obter um pó fino, e em seguida, armazenado em frascos limpos e secos, mantidos vedados sob refrigeração e ao abrigo da luz, até o momento de sua utilização.

4.2.2 Extração do Ácido Fítico

A extração do ácido fitico foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Latta e Eskin (1980). Cerca de 5 g de amostra das diferentes sementes foram tratados com 100 mL de HCl 2,4 % ($0,65 \text{ mol L}^{-1}$) durante uma hora de agitação a temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas durante 15 min a 2500 rpm e o sobrenadante foi armazenado sob refrigeração por não mais que uma semana (HARLAND; OBERLEAS, 1977).

4.2.3 Purificação do Ácido Fítico

O extrato obtido em HCl $0,65 \text{ mol L}^{-1}$ foi diluído na proporção de 1:1 e 1:2 (v/v) utilizando-se água deionizada ultra pura. Para a purificação do ácido fitico foi utilizada a técnica analítica de cromatografia em coluna de troca iônica. Utilizou-se uma coluna de vidro de 1,0 cm de diâmetro por 20,0 cm de comprimento, equipada com torneira dosadora e tampão de algodão, fixada verticalmente e preenchida com cerca de 8,5 g de resina de troca-aniônica DOWEX MWA-1, Cl^- , 35-75 mesh (Sigma-Aldrich). Para uma coluna nestas condições, o volume máximo de amostra diluída a ser aplicado foi de 170 mL, variando conforme a amostra a ser analisada (LATTA; ESKIN, 1980). A coluna foi primeiramente lavada com 29 mL de HCl $0,70 \text{ mol L}^{-1}$, volume este calculado para uma coluna nas condições citadas acima (LATTA; ESKIN, 1980), para assegurar a saturação de cloreto na resina. Em seguida utilizou-se água deionizada ultra-pura até que o eluato se encontrasse livre de cloreto, testando-se com uma solução $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de AgNO_3 (Merck). A amostra diluída foi aplicada sobre a resina saturada e eluída primeiramente com 29 mL de água deionizada ultra-pura, a fim de remover as impurezas solúveis e os

fosfatos inorgânicos, e em seguida com 29 mL de HCl 0,10 mol L⁻¹, para remover o fosfato inorgânico remanescente e os fosfatos de inositol inferiores. O ácido fítico foi finalmente eluído da coluna com uma solução de HCl 0,70 mol L⁻¹ e coletado em frações de 4 mL em tubos de ensaio. Para assegurar que o ácido fítico foi eluído apenas na fração de HCl 0,70 mol L⁻¹, todos os eluatos foram testados com o Reagente de Wade quanto à presença de ácido fítico. O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se soluções de cloreto de sódio nas mesmas concentrações das soluções de ácido clorídrico. Para reutilizar a coluna, ela foi regenerada com o eluente inicial. Neste caso, os íons do eluente apresentavam uma menor afinidade pelo grupo trocador da matriz, mas a condição de equilíbrio foi alcançada fazendo-se percolar pela coluna um volume do eluente igual a 5-10 vezes a sua capacidade de troca. Deste modo, foi possível trocar os íons, eliminando aqueles retidos dos eluentes anteriormente utilizados. Sendo assim, o grau de afinidade foi superado pela maior concentração de íons (COLLINS; BRAGA; BONATO, 1997). Após uma semana, ou a cada três amostras eluídas, a resina foi descartada e a coluna preparada com resina nova.

4.2.4 Detecção e Determinação do Conteúdo de Ácido Fítico

Em 2,0-3,0 mL do Reagente de Wade adicionaram-se de 100 a 500 µL do eluato obtido em cada tubo de ensaio, de cada fração eluente, diretamente em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm, para detectar a presença de ácido fítico. A leitura foi realizada espectrofotometricamente em 500 nm e as soluções daqueles tubos contendo ácido fítico foram agrupadas. Para cada eluente, o respectivo solvente foi utilizado como branco. O volume do eluato final contendo ácido fítico foi reduzido em rotaevaporador à pressão reduzida e temperatura de 45 °C para aquelas amostras eluídas com NaCl, e em

banho-maria sob pressão normal e temperatura de aproximadamente 55 °C para as amostras eluídas com HCl, a fim de se obter soluções concentradas de ácido fítico.

Uma série de soluções de ácido fítico padrão na forma de sal de dipotássio foram preparadas para obtenção de uma curva analítica. De uma solução de ácido fítico $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ retiraram-se alíquotas de 0 a 120 µL, adicionaram-se 4,0 mL do reagente de Wade e diluiu-se para 5,0 mL com água deionizada ultra-pura em balões volumétricos. A leitura foi realizada espectrofotometricamente em 500 nm. A curva analítica variou de 0,0 a $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, contando com 10 pontos experimentais. A partir da curva analítica, o conteúdo de ácido fítico, de diferentes fontes obtido a partir dos procedimentos descritos de extração e purificação, foi determinado. Cerca de 60-1000 µL dos eluatos finais foram transferidos para balões volumétricos, adicionaram-se 4,0 mL do reagente de Wade e diluiu-se para 5,0 mL, quando necessário, com água deionizada ultra-pura. Após a redução do volume, 10-500 µL das soluções concentradas de ácido fítico foram transferidos para balões volumétricos, adicionaram-se 4,0 mL do reagente de Wade e diluiu-se para 5,0 mL com água deionizada ultra-pura. As leituras foram realizadas e o conteúdo de ácido fítico expresso em mol L⁻¹.

4.2.5 Determinação da Percentagem de Pureza da Solução Concentrada de Ácido Fítico

A fim de se determinar a percentagem de pureza da solução concentrada de ácido fítico obtida após a redução do volume, verificou-se a densidade destas soluções com o auxílio de um picnômetro de 25,0 mL, previamente calibrado, para as amostras AB 4 e AB 5. Para as demais amostras, utilizou-se um picnômetro de 10,0 mL devidamente calibrado. Para tal determinação, registraram-se as massas do picnômetro vazio e contendo a solução a ser analisada. Tendo-se a massa da solução de ácido fítico, calculou-

se a partir da relação $d = m V^{-1}$, a densidade desta solução. Sabendo-se que uma solução padrão de ácido fítico 40 % apresenta uma densidade de $1,282 \text{ g mL}^{-1}$ a 25°C , calculou-se, a partir da relação entre a densidade da solução padrão de ácido fítico 40 %, $d_{AF40\%}$, e a densidade da solução obtida, d_{AF} , multiplicada por 40, a percentagem de pureza da solução concentrada de ácido fítico obtida pelos procedimentos propostos, através da Equação 03.

$$\% \text{ de pureza do AF em solução} = \frac{d_{AF} \times 40}{d_{AF40\%}} \quad (03)$$

4.2.6 Determinação do Conteúdo de Ácido Fítico nas Sementes

O conteúdo de ácido fítico nas sementes foi calculado a partir do número de moles (n) de ácido fítico na solução concentrada obtida para cada semente. Sabendo-se que a massa molecular do ácido fítico padrão é $660,04 \text{ g mol}^{-1}$, calculou-se a massa de ácido fítico presente na solução concentrada. Por fim, a relação entre a massa inicial de semente utilizada para a extração, m_{Si} , e a massa de ácido fítico presente na solução concentrada, m_{AF} , multiplicada por 100, Equação 04, forneceu a massa de ácido fítico em g/100 g de semente, em base seca.

$$\text{conteúdo de AF na semente} = \frac{m_{AF} \times 100}{m_{Si}} \quad (04)$$

4.2.7 Cristalização do Ácido Fítico

As amostras concentradas de abóbora, melancia, melão e mamão (AB 6, MEL 1, MLAO 1 e MAO 1) foram cristalizadas na forma de sal de sódio para análises posteriores de infravermelho e cromatografia em camada delgada. Para a cristalização, utilizaram-se de 1,0 a 2,0 mL dos extratos concentrados obtidos para cada amostra, completando-se o volume para 10,0 mL com água deionizada ultra pura. Ajustou-se o pH das amostras para 2,800 com uma solução 1,00 mol L⁻¹ de NaOH isenta de CO₂. Ajustado o pH, as amostras foram levadas à redução de volume em banho-maria a 55 °C a fim de acelerar a cristalização. Depois de cristalizadas, as amostras foram armazenadas em dessecador para análises posteriores. O mesmo procedimento foi realizado para o ácido fítico padrão na forma de sal de dodecassódio, a fim de se obter o padrão no mesmo grau de protonação das amostras concentradas, utilizando-se 0,3 mmol do ácido fítico padrão.

4.2.8 Determinação de Fósforo Total nas Amostras de Ácido Fítico

O método colorimétrico da AOAC 995.11 (HORWITZ, 2000) foi adotado para determinar os níveis de fósforo total nas amostras concentradas de ácido fítico obtidas das sementes pelos procedimentos propostos de extração e purificação, bem como do ácido fítico padrão na forma de sal de dodecassódio. Para isso, utilizaram-se cerca de 0,5000 g das amostras e 0,1600 g do padrão. As amostras foram secas a 110 °C por 2 horas e calcinadas a 525 °C durante a noite para remover a matéria orgânica. O resíduo fosfato solúvel em ácido forma um complexo azul com molibdato de sódio (Carlo Erba) [(MoO₂.4MoO₃)₂.H₃PO₄] na presença de ácido ascórbico como agente redutor. A intensidade da cor azul é medida espectrofotometricamente em 823 nm. Para a construção

da curva analítica, utilizaram-se de 0,0 a 1,8 mL de uma solução padrão de KH_2PO_4 0,01 mg P/mL em balões volumétricos de 10,0 mL, resultando em uma curva com 8 pontos experimentais na faixa de concentração de 0,0 a $1,8 \times 10^{-3}$ mg P/mL. Para as leituras de absorbância das amostras, os volumes de amostras utilizados foram adequados de maneira a estarem contidos na faixa linear da curva analítica.

4.2.9 Cromatografia em Camada Delgada

Realizou-se a cromatografia em camada delgada a fim de verificar se o componente presente nas amostras obtidas pelos procedimentos de extração e purificação propostos tratava-se do hexafosfato de inositol. Para tal determinação, utilizaram-se cromatofolhas de alumínio, 20 x 20 cm, silicagel 60 F₂₅₄ 1.05554 (MERCK). Para a revelação das placas utilizou-se vapor de iodo. Para estabelecer o melhor eluente para a cromatografia, utilizaram-se pequenas placas de 10 x 2 cm. Soluções de ácido fítico padrão na forma de sal de dipotássio e na forma de sal de dodecassódio, ambas na concentração de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, foram aplicadas com um capilar a 1 cm da extremidade da placa, e cerca de 1 cm afastadas entre si. Diferentes proporções de metanol e acetona foram testadas, sendo que a melhor condição encontrada foi 1:3 (v/v) acetona:metanol. As amostras e padrões foram então eluídas nesta condição. Eluiu-se em uma mesma placa os padrões dipotássico e dodecassódico, e em outra placa o padrão dodecassódico com o padrão dodecassódico cristalizado em pH 2,800. Determinaram-se os valores de R_f e estabeleceu-se como padrão para eluição juntamente com as amostras obtidas das sementes o ácido fítico na forma de sal de dodecassódio cristalizado em pH 2,800. Para isso, prepararam-se soluções do padrão e das amostras cristalizadas em pH 2,800 na concentração de $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. As amostras foram aplicadas a 1 cm de distância da extremidade da placa de 10 x 13 cm com

um tubo capilar e cerca de 1,5 cm distantes entre si. O padrão foi aplicado nos dois lados da placa com um capilar a fim de estabelecerem-se as comparações. A placa foi então colocada em uma cuba cromatográfica devidamente saturada com o eluente. Finalizado o caminho de ascensão do eluente, retirou-se a placa da cuba, deixou-se secar em temperatura ambiente e revelou-se com vapor de iodo. Por fim, determinaram-se os valores de R_f para cada amostra.

4.2.10 Estudos Espectroscópicos de Absorção na Região do Infravermelho

Os estudos espectroscópicos de absorção na região do infravermelho foram realizados com a finalidade de caracterizar as amostras de ácido fítico purificadas. Utilizou-se o equipamento Espectrofotômetro Shimadzu, modelo 8400, operando no modo FTIR. Para registrar a linha de base do equipamento, utilizaram-se 100 mg de brometo de potássio (KBr) (Merck) de grau espectroscópico, previamente dessecado, pulverizado e prensado. As amostras de 3 mg de ácido fítico purificado, previamente cristalizadas e dessecadas, foram prensadas com 100 mg de KBr e em seguida foram realizadas as leituras e comparadas com a amostra padrão de fitato de dodecassódio. Para o ácido fítico padrão (sal de dodecassódio) e ácido fítico padrão cristalizado em pH 2,800, foram utilizados 1 mg das amostras e 100 mg de KBr.

4.2.11 Estudos Potenciométricos

As titulações potenciométricas foram conduzidas num pHmetro de pesquisa, Micronal, modelo B-474, com precisão de três casas decimais, equipado com um eletrodo de vidro e

outro de referência do tipo Ag/AgCl, previamente calibrados com soluções tampão pH 7,0 e 4,0, e com uma solução padrão de ácido clorídrico/cloreto de potássio, pH próximo de 2,0 (pH = 2,009), para leitura direta de $-\log[H^+]$. As titulações foram realizadas em uma cela de vidro de parede dupla com capacidade de 100 mL, termostatizada a $25 \pm 0,1$ °C e mantida sob agitação constante, com força iônica constante de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl como eletrólito suporte e em atmosfera inerte sob fluxo contínuo de argônio purificado. A solução titulante NaOH $0,0990 \text{ mol L}^{-1}$, isenta de CO_2 , foi adicionada em alíquotas de 0,05 mL com o auxílio de uma bureta digital Denver, modelo 280. Para a titulação do ácido fítico obtido de sementes de abóbora e mamão foram utilizados $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl como força iônica e KOH $0,0981 \text{ mol L}^{-1}$, isenta de CO_2 como solução titulante.

As titulações foram realizadas utilizando-se 0,1 mmol de ácido fítico padrão na forma de sal de dodecassódio e 0,1 mmol de ácido fítico das soluções concentradas obtidas a partir das sementes de abóbora, melancia, melão e mamão. Solubilizados o ácido fítico e o eletrólito suporte, vedou-se o sistema, aguardou-se a completa estabilização e iniciaram-se as titulações em torno de pH 2,500. Para a titulação do ácido fítico padrão na forma de sal de dodecassódio, adicionaram-se 8 íons H^+ na solução pela adição de 855 μL de HCl $0,93 \text{ mol L}^{-1}$.

Os gráficos das curvas de titulação para os sistemas exibem valores de **pH** em função de **a** (**a** = número de mmols da base dividido pelo número de mmols do ligante).

Os dados potenciométricos foram tratados com o programa BEST7, segundo Martell e Motekaitis (1992), e as constantes de protonação do ácido fítico foram definidas pelas Equações 05 e 06. A Equação 05 descreve a equação de equilíbrio em termos de protonação. As curvas de distribuição das espécies foram obtidas pelo programa SPEPLOT.



$$K_{eq} = \frac{[H_nL^n]}{[H_{(n-1)}L^{(n-1)}] \cdot [H^+]} \quad (06)$$

onde K_{eq} corresponde à constante de equilíbrio, $[H_nL^n]$ indica a espécie protonada, $[H_{(n-1)}L^{(n-1)}]$ deprotonada e $[H^+]$ o próton adicionado.

4.2.12 Estudos Espectroscópicos de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível

Estudos espectroscópicos de absorção na região do ultravioleta-visível foram realizados para detectar o ácido fítico nas diferentes frações eluídas da coluna cromatográfica e para determinar o conteúdo de ácido fítico no eluato final e na solução concentrada após a redução do volume. Foi utilizada ainda para a determinação de fósforo nas diferentes amostras, conforme procedimentos descritos anteriormente.

Estudos de UV-Vis também foram realizados para caracterizar o ácido fítico obtido das diferentes sementes quanto ao seu potencial quelante frente ao íon metálico Fe(III) e compará-lo com o ácido fítico padrão nas formas de sal de dipotássio e de dodecassódio (QUIRRENBACH et al., 2009). As reações foram conduzidas em uma cela de vidro de parede dupla com capacidade de 100 mL, termostatizada a $36 \pm 0,1$ °C e mantida sob agitação, com força iônica constante de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl como eletrólito suporte. Para o sistema ácido fítico-Fe(III), utilizaram-se $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fítico padrão (sal de dodecassódio) e de ácido fítico das amostras concentradas obtido das diferentes sementes, e $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de Fe(III). O pH inicial foi ajustado para aproximadamente 2,500 e antes da adição do íon metálico ao sistema, a absorbância do ligante foi registrada.

Adicionou-se então o íon metálico e ajustou-se o pH do sistema metal-ligante com NaOH 1,00 mol L⁻¹ ou HCl 1,00 mol L⁻¹, primeiramente para pH 2,500, e posteriormente de acordo com a concentração máxima de cada espécie detectada a partir das curvas de distribuição das espécies obtidas por Quirrenbach et al. (2009). Após cada variação de pH, colocou-se uma alíquota de 3 mL da solução numa cubeta de quartzo com caminho óptico de 1 cm e leu-se a absorbância em um espectrofotômetro MultiSpec-1501 da Shimadzu. Em seguida esta alíquota retornou à cela de reação.

A espectroscopia no UV-Vis foi utilizada ainda para os ensaios do poder antioxidante do ácido fítico pelos métodos descritos a seguir.

4.2.13 Ensaio do Potencial Antioxidante pelo Método de FRAP

O ensaio de FRAP foi realizado de acordo com o procedimento descrito por Benzie e Strain (1996) e Benzie e Strain (1999), com algumas modificações, usando um espectrofotômetro MultiSpec-1501 da Shimadzu. A leitura de cerca de 3 mL do reagente de FRAP recém preparado, reagente branco, foi realizada em 593 nm (M1). Em seguida, o reagente branco foi transferido para um tubo de ensaio, adicionaram-se 100 µL da amostra teste ou padrão, misturou-se em um vortex IKA, MS1, transferiu-se novamente para a cubeta de quartzo e realizaram-se as leituras de absorbância em 593 nm. As leituras foram registradas após 15 segundos da mistura da amostra com o reagente e a cada 15 segundos, durante o período de 6 minutos de monitoramento a temperatura ambiente, em uma janela espectral de 450 a 800 nm. A mudança na absorbância (A) entre a leitura final selecionada e a leitura inicial para cada amostra foi descontada automaticamente pelo equipamento, o que forneceu diretamente a $\Delta A_{593\text{nm}}$ para cada amostra.

4.2.14 Ensaio da Capacidade Consumidora de Radicais DPPH

O efeito consumidor de radicais livres foi estimado de acordo com o método de Blois (1958), Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e Beretta et al. (2005). Em balões de 5,0 mL adicionaram-se 1,0 mL do radical DPPH (Sigma) $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em etanol; 0,5 mL de tampão acetato pH 5,5 e alíquotas específicas dos antioxidantes testados. Completaram-se os volumes para 5,0 mL com etanol e agitaram-se as misturas. O etanol foi utilizado para registrar a linha de base do equipamento. A diminuição na absorbância foi determinada espectrofotometricamente em 517 nm a temperatura ambiente, a cada 30 segundos durante o período total de exposição, que variou de uma amostra para outra, até que os valores de absorbância se tornassem constantes, para cada concentração dos antioxidantes testados. A porcentagem de radicais DPPH consumidos foi estimada da diferença entre as absorbâncias com e sem amostras e expressas como % de DPPH consumido, segundo a Equação 07.

$$\% \text{ DPPH consumido} = \frac{A_{\text{DPPH}} - A_{\text{extr}}}{A_{\text{DPPH}}} \times 100 \quad (07)$$

onde A_{DPPH} indica a absorbância do radical DPPH e A_{extr} a absorbância do radical DPPH em presença da amostra teste.

Os ensaios acima citados foram realizados para as amostras padrão de ácido fítico na forma de sal de dipotássio e de dodecassódio, bem como para as amostras de ácido fítico extraído das fontes alternativas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO ÁCIDO FÍTICO

Diversos estudos mostraram que o ácido fítico é inerte e estável devido à sua elevada energia potencial nas ligações éster-fosfóricas (GRAF; EATON, 1990; DE CARLI et al., 2006). Um estudo de análise térmica mostrou que o ácido fítico é bastante estável até a temperatura de 184 °C (DE CARLI et al., 2006). Para liberação de 50 % do fósforo é necessária uma hidrólise ácida em HCl 5 mol L⁻¹ a 100 °C por no mínimo 6 horas, enquanto que nas mesmas condições, porém em pH 12,0, não ocorre a liberação do fósforo em quantidades apreciáveis (GRAF; EATON, 1990).

Contudo, apesar de sua elevada estabilidade, vários processamentos de alimentos e métodos de preparação reduzem o conteúdo de ácido fítico. A hidrólise ácida e o tratamento enzimático com fitase resultam em uma mistura de fosfato inorgânico e *mio*-inositol mono-, di-, tri-, tetra-, penta- e hexafosfato (GRAF; EATON, 1990). Consequentemente, para a extração do ácido fítico e posterior quantificação, devem-se utilizar condições brandas de temperatura e da concentração das soluções utilizadas, pois condições muito drásticas para a extração, podem levar à degradação ou hidrólise parcial do ácido fítico, resultando na liberação de fosfatos na solução extratora. Desta forma, fosfatos de inositol inferiores poderiam ser encontrados juntamente com o ácido fítico na solução, dificultando, assim, a sua determinação e quantificação.

Em um estudo de Harland e Oberleas (1977), a extração do ácido fítico foi realizada com 100 mL de HCl 1,2 % durante duas horas, para 5 g de material seco. Latta e Eskin (1980), avaliando a eficiência da concentração do ácido na extração do ácido fítico de sementes, mostraram que a extração com melhor rendimento ocorreu quando empregaram

100 mL de HCl 2,4 % ($0,65 \text{ mol L}^{-1}$) por um período de uma hora, para 5 g de amostra, comparado ao método de Harland e Oberleas (1977). Leal (2000) empregou condições mais drásticas para a extração do ácido fítico a partir do germe grosso de milho. O procedimento consistia na extração com HCl $1,8 \text{ mol L}^{-1}$ na proporção de 5:1 (v/m) das amostras finamente trituradas, centrifugação, ajuste do pH do sobrenadante para 10 com adição de NaOH, nova centrifugação, ressuspensão do precipitado bruto de AF com HCl PA, H_2SO_4 2,3 % e terra diatomácea. A suspensão foi aquecida a 50°C , centrifugada e um novo ajuste do pH do sobrenadante para 10 foi realizado. Nova centrifugação, e o precipitado de AF foi seco em estufa a 50°C , e ressuspensão com HCl até atingir pH 4,0. A solução foi novamente seca em estufa a 50°C , resultando em um sólido de coloração branca amarelada de AF.

As diferentes condições de extração foram testadas e, entre elas, o método de Latta e Eskin (1980) foi adotado para a extração do ácido fítico das diferentes sementes, por empregar condições brandas e eficientes. A extração do ácido fítico com ácido clorídrico torna-o protonado e solúvel na solução. Após a centrifugação da amostra, consequentemente, o ácido fítico encontra-se presente no sobrenadante parcialmente purificado e o resíduo sólido foi então descartado.

Realizada a extração do ácido fítico das sementes, seguiu-se para a etapa de purificação. Harland e Oberleas (1977) desenvolveram um método modificado para determinação de ácido fítico, que consistia na concentração deste em uma resina de troca iônica com posterior digestão ácida e medidas colorimétricas do fosfato. Utilizaram a resina de troca aniônica AG1-X8, Cl^- , 200 a 400 mesh. Os eluentes utilizados foram água, $\text{NaCl } 0,05 \text{ mol L}^{-1}$, sendo que a eluição do ácido fítico da coluna cromatográfica foi realizada com $\text{NaCl } 0,7 \text{ mol L}^{-1}$. De acordo com estes autores, para 0,5 g de resina, o extrato deve ser diluído na proporção de 1:25 (v/v), a fim de que a concentração total de

ânion não ultrapasse $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Latta e Eskin (1980) sugerem que para amostras contendo mais de 1 % de ácido fítico, uma diluição do extrato de 1:25 é o suficiente. Porém, para amostras contendo menos de 1 % de ácido fítico, o mais indicado é uma diluição 5:25 do extrato bruto. Estes autores também utilizaram a resina AG1-X8, e NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em vez de NaCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ para a segunda eluição da coluna cromatográfica, e o conteúdo de ácido fítico foi medido espectrofotometricamente com o reagente de Wade. Harland e Oberleas (1986) modificaram as resinas trocadoras de ânions para analisar a concentração de ácido fítico. A resina utilizada foi AG1-X4, Cl^- , 100 a 200 mesh. O ácido fítico foi extraído de amostras duplicadas de alimentos secos utilizando 40 mL de HCl 2,4 % para 2 g de amostra, durante 3 horas; o extrato foi então diluído na proporção de 1:25, misturado com solução de EDTA/NaOH e colocado em uma coluna de troca iônica. Utilizaram água e uma solução de NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, e a eluição do ácido fítico foi realizada separadamente dos fosfatos de inositol inferiores e do fosfato inorgânico com uma solução de NaCl $0,7 \text{ mol L}^{-1}$. Este foi o método oficial adotado pela AOAC para determinação de ácido fítico em alimentos (HARLAND; OBERLEAS, 1986).

Um teste de purificação em coluna de troca iônica foi realizado utilizando a resina aniônica fortemente básica Amberlite IRA-420, na forma de Cl^- , de 16 a 50 mesh, de uma amostra extraída segundo as condições propostas por Leal (2000). O teste mostrou que o ácido fítico foi eluído já nas frações de água e NaCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. Este fato pode ter ocorrido devido à formação de fosfatos de inositol inferiores que, da mesma maneira que o ácido fítico, foram detectados pela reação com solução de FeCl_3 nas três frações eluentes utilizadas. Empregando-se a mesma resina, um novo teste foi realizado com uma amostra submetida ao método de extração de Latta e Eskin (1980), o qual também não apresentou resultados satisfatórios.

Apesar desta resina representar um menor custo para o processo, não foi possível a sua utilização, pois no primeiro caso liberou o ácido fítico já nas primeiras frações eluentes utilizadas, o que pode ter ocorrido devido à hidrólise do ácido fítico e, no segundo caso, o ácido fítico ficou muito fortemente aderido à resina, exigindo um volume muito grande de eluente para sua remoção, e consequentemente originando um volume excessivo de eluato. Além disso, é necessário grande quantidade da resina para preencher a coluna. Desta forma, a resina de troca aniônica fraca DOWEX MWA-1 livre de base, na forma de Cl^- , de 35 a 75 mesh foi adotada para a purificação do ácido fítico.

Para a purificação do ácido fítico, o procedimento adotado neste trabalho também foi o de Latta e Eskin (1980), com modificação do fator de diluição do extrato bruto da amostra. Visto que a quantidade de resina utilizada neste trabalho foi 8,5 g, superior à utilizada por estes autores, 0,5 g, a concentração máxima de ânion fitato a ser passada na coluna é de $0,85 \text{ mol L}^{-1}$. A partir de um estudo prévio com extrato de sementes de abóbora, denominada de amostra AB 1, com o fator de diluição 5:25, a concentração de ácido fítico obtida foi de $4,83 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, o que é inferior ao máximo permitido para a resina. Desta forma, a diluição da amostra não se faz necessária, ela foi realizada na proporção de 1:1 ou 1:2 para as demais amostras apenas para facilitar a passagem pela coluna cromatográfica, evitando assim um volume excessivo de eluato final e uma diluição do ácido fítico presente.

5.2 DETECÇÃO E DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDO FÍTICO

5.2.1 Detecção do Ácido Fítico nos Eluentes Utilizados

De acordo com Latta e Eskin (1980), o ácido fitico pode ser detectado no eluato final espectrofotometricamente com o reagente de Wade. Este deve ser adicionado à fração eluente de NaCl 0,70 mol L⁻¹ dentro de 30 minutos. Uma vez adicionado o reagente, a mistura permanece estável até o momento da leitura. Para assegurar a eluição do ácido fitico apenas na fração eluída com NaCl 0,70 mol L⁻¹, os três eluentes utilizados para a eluição da coluna cromatográfica, água, NaCl 0,10 mol L⁻¹ e NaCl 0,70 mol L⁻¹, foram testados quanto à presença de ácido fitico. As Figuras 03, 04 e 05 representam o comportamento do reagente de Wade diante de cada eluente.

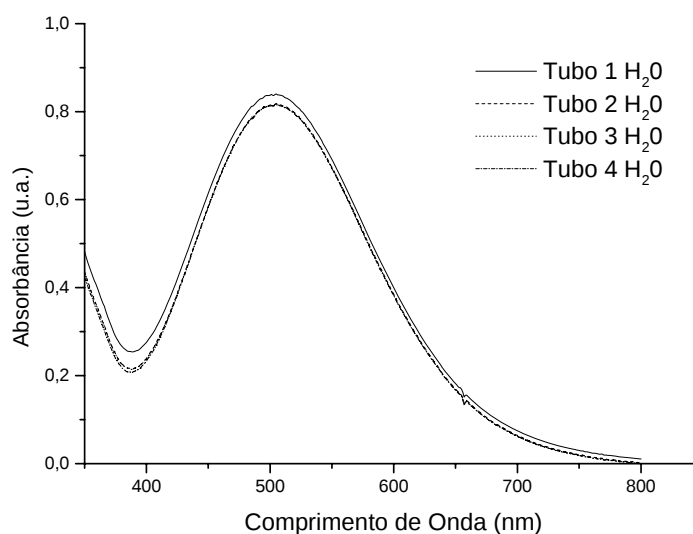


Figura 03: Comportamento do Reagente de Wade diante do extrato de abóbora eluído com água deionizada ultra pura.

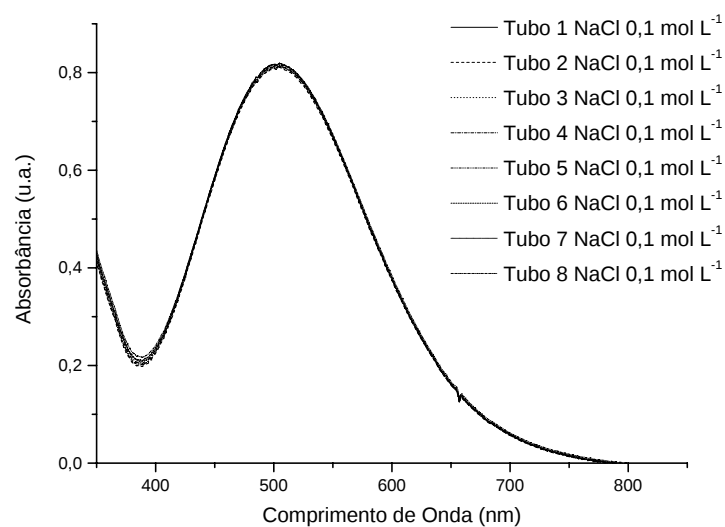


Figura 04: Comportamento do Reagente de Wade diante do extrato de abóbora eluído com solução de NaCl 0,10 mol L⁻¹.

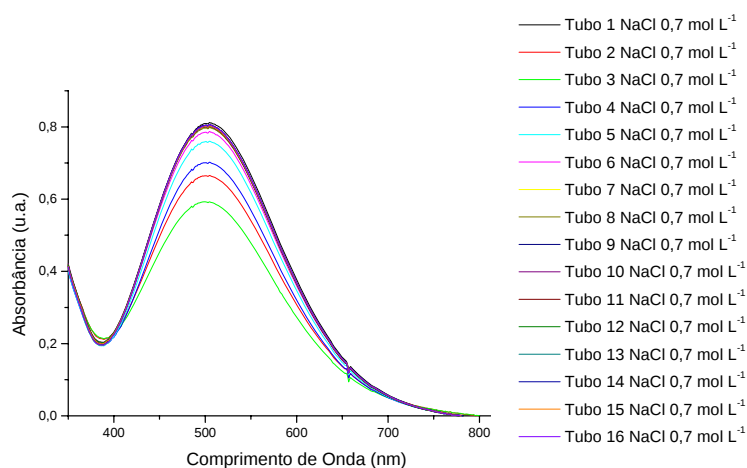


Figura 05: Comportamento do Reagente de Wade diante do extrato de abóbora eluído com solução de NaCl 0,70 mol L⁻¹.

Ao testar a presença de ácido fítico nas frações eluentes, o mesmo foi detectado apenas na fração eluída com NaCl 0,70 mol L⁻¹, o que pôde ser comprovado pela diminuição da absorvância do reagente de Wade em presença do ácido fítico. O reagente de Wade apresenta coloração rosa devido à reação entre o íon férrico e o ácido sulfossalicílico. Em presença do ácido fítico, o ferro coordena-se a este por uma reação de

substituição do ácido sulfossalicílico, resultando em um decréscimo na absorbância, e indicando que o ácido fítico encontra-se presente na solução (LATTA; ESKIN, 1980).

Os eluentes água e NaCl 0,10 mol L⁻¹ não apresentam força iônica suficiente para remover o ácido fítico, altamente carregado, da coluna cromatográfica. Nestas frações, ocorre a liberação de substâncias solúveis em água e fosfatos inorgânicos da coluna. Já a solução de NaCl 0,70 mol L⁻¹ foi eficiente para a remoção do ácido fítico da coluna cromatográfica. Desta forma, pode-se sugerir que o ácido fítico obtido encontra-se parcialmente purificado e sob a forma de fitato de sódio, visto que a eluição foi realizada com uma solução de cloreto de sódio.

Porém, como o intuito deste trabalho é de purificar e não apenas quantificar o ácido fítico, a eluição da coluna cromatográfica com solução de cloreto de sódio pode representar um problema. O eluato final além de conter o ácido fítico, contém grande quantidade de cloreto de sódio, que é dificilmente separado do ácido fítico por métodos convencionais, devido aos dois serem altamente solúveis em água (THE MERCK INDEX, 1996).

Uma das maneiras de separar o NaCl do ácido fítico seria precipitando o sal em meio ácido, no qual o NaCl é pouco solúvel. Após a passagem pela coluna cromatográfica do extrato de sementes de abóbora (amostra AB 1) diluído na proporção de 5:25, o volume do eluato obtido foi reduzido em rotaevaporador. Baixou-se então o pH da amostra concentrada de 6,765 para 1,55, a fim de protonar o ácido fítico e impedi-lo de precipitar junto com o NaCl. Porém, não foi observada a precipitação do sal em meio ácido, e desta forma partiu-se para a precipitação em meio alcoólico, no qual o sal também é pouco solúvel. Com este procedimento também não obteve-se êxito na separação da mistura, pois, ao testar com o reagente de Wade, parte do ácido fítico precipitou juntamente com o sal e parte ficou em solução. O mesmo ocorreu com o cloreto, pois ao testar o precipitado

e a solução resultante com uma solução de AgNO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ observou-se que o mesmo estava presente nas duas frações. Outra possibilidade foi testada, baixando-se mais o pH da solução, para 0,550. Porém, a quantidade de álcool necessária para realizar a precipitação do NaCl (cerca de 60 mL para 10 mL de amostra), torna o procedimento caro e inviável. A solução final obtida, de pH 2,0-3,0, foi levada à redução de volume em rotaevaporador sob pressão reduzida. Apesar de não ser detectado ácido fítico no álcool destilado, este apresentou pH baixo (2,0-3,0), o que inviabiliza o seu reaproveitamento em outros procedimentos. Além disso, embora o ácido fítico não fosse mais detectado no sólido obtido pela precipitação do sal, íons cloreto continuaram sendo detectados tanto no sólido como no sobrenadante, mostrando que o processo de separação não foi eficiente.

Ao diluir outro extrato de sementes de abóbora (amostra AB 2) na proporção de 1:1, não ocorreu precipitação de NaCl com adição de álcool. Com este fator de diluição não se tem excesso de solução salina, e, como neste caso a adição de álcool foi realizada antes da redução do volume da amostra, o NaCl encontrava-se muito diluído na solução, dificultando a sua precipitação pela necessidade de um volume excessivo de álcool. Apesar da não precipitação do sal, o problema da contaminação com cloreto de sódio na solução de ácido fítico que se pretende purificar continuou.

A fim de evitar a contaminação da solução de ácido fítico, optou-se pela eluição da coluna cromatográfica com uma solução de HCl nas mesmas concentrações do NaCl, visto que a troca de íons ocorre entre os ânions fitato e cloreto e que o ácido é mais facilmente removido da solução pela redução do volume, pois é mais volátil, não sendo necessário o uso de outros reagentes que possam onerar o processo. Além disso, o ácido fítico assim obtido encontra-se na forma protonada. Desta forma, realizou-se a cromatografia de troca aniônica utilizando-se como eluentes água, solução de HCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e solução de HCl $0,70 \text{ mol L}^{-1}$. Novamente, os três eluentes utilizados para

purificação da amostra AB 6, no procedimento proposto para a eluição da coluna cromatográfica, foram testados quanto à presença de ácido fítico. O comportamento de Reagente de Wade diante do eluente água foi similar ao observado na Figura 03. As Figuras 06 e 07 representam o comportamento do reagente de Wade diante das soluções de HCl 0,10 mol L⁻¹ e HCl 0,70 mol L⁻¹.

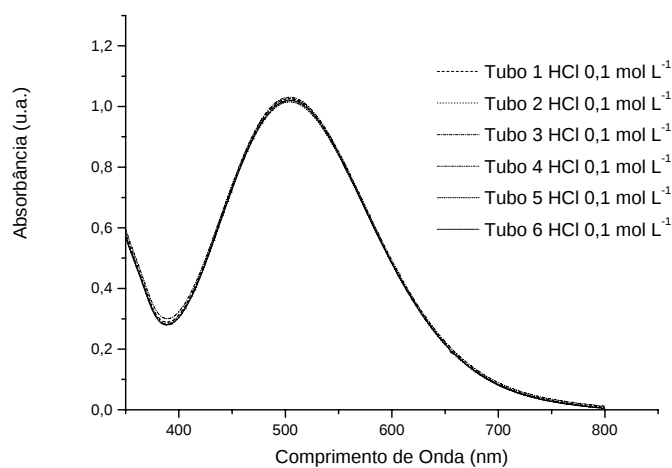


Figura 06: Comportamento do Reagente de Wade diante do extrato de abóbora eluído com solução de HCl 0,10 mol L⁻¹.

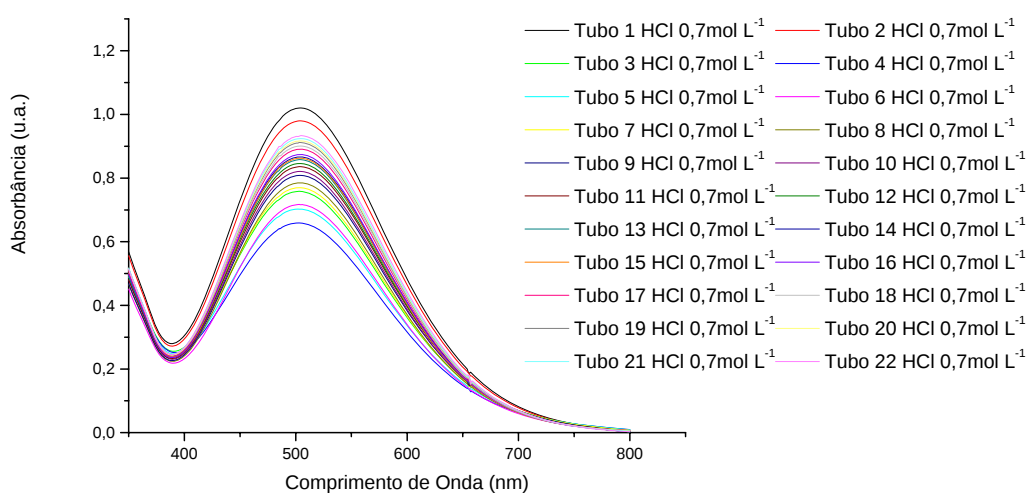


Figura 07: Comportamento do Reagente de Wade diante do extrato de abóbora eluído com solução de HCl 0,70 mol L⁻¹.

Pode-se concluir que os eluentes água e HCl 0,10 mol L⁻¹ também não apresentam força iônica suficiente para remover o ácido fítico da coluna, sendo que este foi detectado apenas na fração eluída com HCl 0,70 mol L⁻¹. Pode-se sugerir que o ácido fítico obtido encontra-se altamente purificado e sob a forma protonada, em solução ácida.

Chen et al. (2009) também utilizaram uma solução de HCl para remoção do ácido fítico da coluna de troca aniônica, porém na concentração de 2 mol L⁻¹. Um teste com diferentes concentrações das soluções eluentes foi realizado neste trabalho a fim de detectar a melhor concentração de HCl para remoção do ácido fítico da coluna cromatográfica. Uma solução de HCl 0,40 mol L⁻¹ não foi capaz de remover o ácido fítico da coluna, já soluções de HCl 0,70 e 1,00 mol L⁻¹ removeram o ácido fítico. Como não houve diferença significativa entre as concentrações de 0,70 e 1,00 mol L⁻¹, a concentração de HCl adotada para eluição da coluna e remoção do ácido fítico foi de 0,70 mol L⁻¹, por se tratar de uma condição mais branda de trabalho.

A Tabela 01 mostra as condições experimentais utilizadas para cada amostra. Diversas condições de extração e purificação foram testadas com amostras de abóbora, Tabela 01, até a obtenção das condições ótimas para os procedimentos. As amostras seguintes foram então tratadas nas melhores condições alcançadas.

Tabela 01. Condições experimentais adotadas para as diferentes amostras.

Amostras	Massa (g)	V* HCl 2,4 % (mL)	V** sobrenadante (mL)	Volume eluato (mL)	V sol. conc. (mL)
AB 1***	2,2777	46,0	30,0	600,0	68,0
AB 2****	10,0570	200,0	180,0	140,0	50,0
AB 3	10,0620	200,0	180,0	450,0	50,0
AB 4	5,0059	100,0	85,0	600,0	20,0
AB 5	10,0544	200,0	177,0	650,0	25,0
AB 6	5,0043	100,0	90,0	280,0	20,0
AB 7	20,0050	400,0	357,0	740,0	35,0
MEL 1	10,0477	200,0	182,0	450,0	20,0
MEL 2	23,0160	460,3	405,0	890,0	35,0
MLAO 1	5,0191	100,0	90,0	250,0	20,0
MLAO 2	9,5723	192,0	173,0	290,0	15,0
MAO 1	5,0455	100,0	78,0	120,0	20,0
MAO 2	10,6930	200,0	147,0	200,0	15,0

AB refere-se às amostras de abóbora, MEL melancia, MLAO melão e MAO mamão.

As amostras AB 1, AB 2 e AB 3 foram eluídas com solução de NaCl e o volume reduzido em rotaevaporador à pressão reduzida, as demais foram eluídas com solução de HCl e o volume reduzido em banho-maria.

A amostra AB 1 foi diluída na proporção 5:25 em água, as amostras AB 3 e AB 4 1:2 e as demais na proporção de 1:1.

* A extração do ácido fítico foi realizada com HCl 2,4 % (0,65 mol L⁻¹) com 1 hora de agitação para todas as amostras, exceto para amostra AB 1, com 2 horas de agitação.

**O sobrenadante foi obtido após centrifugação durante 15 minutos a 2500 rpm.

*** Na amostra AB 1 foi adicionado etanol para precipitar o NaCl após a redução do volume, com nova redução do volume após a adição do álcool.

**** Na amostra AB 2 foi adicionado etanol para precipitar o NaCl antes da redução do volume.

5.2.2 Curva Analítica Reagente de Wade – Ácido Fítico Padrão, Sal de Dipotássio

A Figura 08 representa o efeito do aumento da concentração do ácido fítico sobre a absorbância do reagente de Wade. Verifica-se que ocorre uma redução da absorbância proporcional ao aumento da concentração de ácido fítico.

O Reagente de Wade apresenta coloração rosa característica devido à banda de transferência de carga do ligante para o íon metálico no complexo Fe(III)-ácido sulfossalicílico, com absorbância máxima em 500 nm (LATTA; ESKIN, 1980). Na região UV, o complexo apresenta uma banda com absorbância elevada em 286 nm, e a banda de

absorção com máximo em 297 nm, típica do ligante livre não coordenado (POZDNYAKOV et al., 2006). Em presença do ácido fítico, o Fe(III) coordena-se ao éster fosfato, por uma reação de substituição do ácido sulfossalicílico, resultando em uma diminuição da intensidade da cor rosa e, conseqüentemente, um decréscimo na absorbância em 500 nm.

A partir dos dados de absorbância para as diferentes concentrações do padrão de ácido fítico, na forma de sal de dipotássio, a curva analítica com o reagente de Wade foi construída (Figura 09). Segundo Latta e Eskin (1980), observa-se uma linearidade da Lei de Beer-Lambert com o decréscimo na absorbância em 500 nm relacionado à concentração do ácido fítico, o que pôde ser verificado experimentalmente na curva analítica obtida.

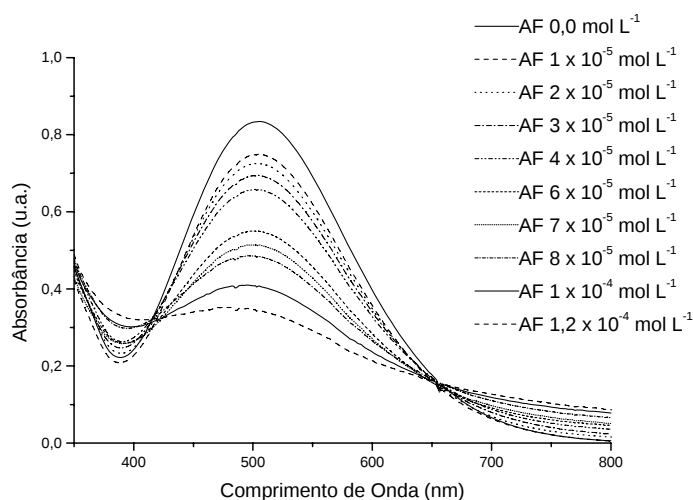


Figura 08: Efeito do aumento da concentração de ácido fítico na absorbância do Reagente de Wade.

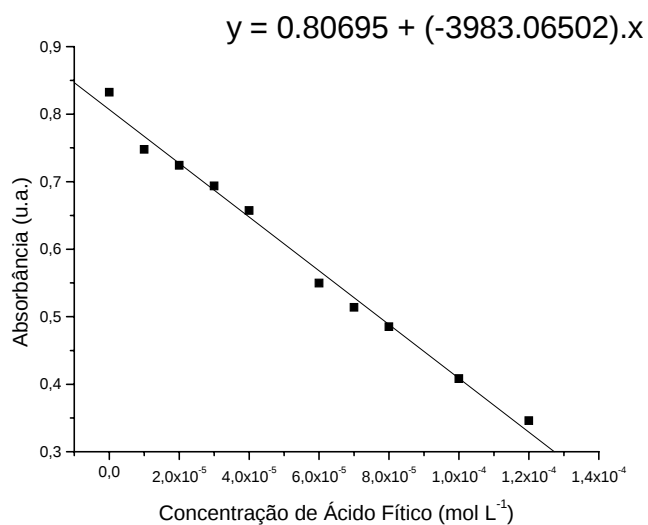


Figura 09: Curva analítica Reagente de Wade - ácido fítico padrão, na faixa de concentração de 0,0 a 1,2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹.

A curva analítica variou de 0,0 a 1,2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ de ácido fítico, contando com 10 pontos experimentais, e o coeficiente de correlação da reta, r , obtido foi igual a -0,99557, o que explica 99,12 % da variância dos dados.

5.2.3 Determinação do Conteúdo de Ácido Fítico a partir da Curva Analítica

A curva analítica obtida experimentalmente é apresentada na Equação 08.

$$y = 0,80695 + (-3983,06502) \cdot x \quad (08)$$

onde y = absorbância da amostra e x = concentração (mol L⁻¹) de ácido fítico em solução.

Tendo-se os valores de absorvância registrados espectrofotometricamente para cada amostra, é possível, a partir da curva analítica, calcular o conteúdo de ácido fítico, em mol L^{-1} , nas diferentes etapas do processo de obtenção do ácido fítico purificado. A Tabela 02 apresenta os valores de absorvância e os volumes das amostras utilizadas para calcular o conteúdo de ácido fítico. A partir destas informações, o conteúdo de ácido fítico nas soluções concentradas foi calculado (Tabela 02). Multiplicando-se o conteúdo de ácido fítico das soluções concentradas pelo volume de solução concentrada para cada amostra (Tabela 01), obteve-se o número de moles, e este multiplicado pela massa molar do ácido fítico ($660,04 \text{ g mol}^{-1}$) fornece a massa de ácido fítico em solução. Com a massa de ácido fítico, pôde-se, a partir da Equação 04, pág. 72, calcular o conteúdo de ácido fítico nas diferentes sementes (Tabela 02).

A Tabela 02 apresenta o conteúdo de ácido fítico em solução e nas diferentes sementes analisadas, tratadas nas condições de extração e purificação adotadas.

Tabela 02. Valores de absorvância e volumes das amostras utilizados para determinar o conteúdo de ácido fítico nas amostras concentradas com o Reagente de Wade, e conteúdo de ácido fítico nas diferentes sementes.

Amostra	Volume solução concentrada (mL)	Absorvância solução concentrada (y)	Conteúdo AF sol. concentrada (mol L^{-1})	Conteúdo AF semente (g/100 g, base seca)
AB 4	0,050	0,432918	0,0145 ($\pm 0,005484$)	2,6325 ($\pm 0,199395$)
AB 5	0,010	0,676476		
AB 6	0,025	0,588946		
AB 7	0,015	0,550921		
MEL 1	0,025	0,537499	0,0181 ($\pm 0,006399$)	2,0250 ($\pm 0,346482$)
MEL 2	0,015	0,537133		
MLAO 1	0,025	0,583286	0,0160 ($\pm 0,006812$)	2,5550 ($\pm 0,558614$)
MLAO 2	0,015	0,557636		
MAO 1	0,025	0,715032	0,0076 ($\pm 0,004153$)	1,0900 ($\pm 0,169706$)
MAO 2	0,025	0,598066		

Os valores entre parênteses representam a estimativa do desvio padrão para as amostras tratadas com HCl na coluna cromatográfica, sendo quatro replicatas para o ácido fítico de abóbora e duplicatas para as demais amostras (Tabela 02).

A partir da Tabela 02 pode-se observar que as sementes de abóbora apresentaram o maior conteúdo de ácido fítico ($2,6325 (\pm 0,199395)$ g/ 100 g), seguidas pelas sementes de melão ($2,5550 (\pm 0,558614)$ g/ 100 g) e melancia ($2,0250 (\pm 0,346482)$ g/ 100 g).

Segundo El-Adawy e Taha (2001), as farinhas de sementes de abóbora e melancia apresentam elevada quantidade de ácido fítico, cerca de 2,37 e 2,63 g/100 g em base seca, respectivamente. Estes dados estão de acordo com os valores determinados neste trabalho de $2,6325 (\pm 0,199395)$ para abóbora e $2,0250 (\pm 0,346482)$ para melancia. Um trabalho de Enujiugha e Ayodele-Oni (2003), mostrou que as sementes de melão apresentam um conteúdo de ácido fítico de $1,77 \text{ g kg}^{-1}$ DM, o que corresponde a $0,177 \text{ g/100 g}$. Neste trabalho, o conteúdo de ácido fítico encontrado para as sementes de melão foi maior ($2,5550 (\pm 0,558614)$), mostrando que as condições adotadas foram eficientes, pois em se tratando de sementes de uma mesma família, o conteúdo de ácido fítico está próximo àquele encontrado para as sementes de melancia e abóbora.

Por fim, conclui-se que as sementes de abóbora, melancia e melão (Figura 10 a, b e c, respectivamente), frutas da família *Cucurbitaceae*, são fontes ricas em ácido fítico, e que as sementes de mamão (Figura 10, d) podem representar uma nova fonte de obtenção deste composto.

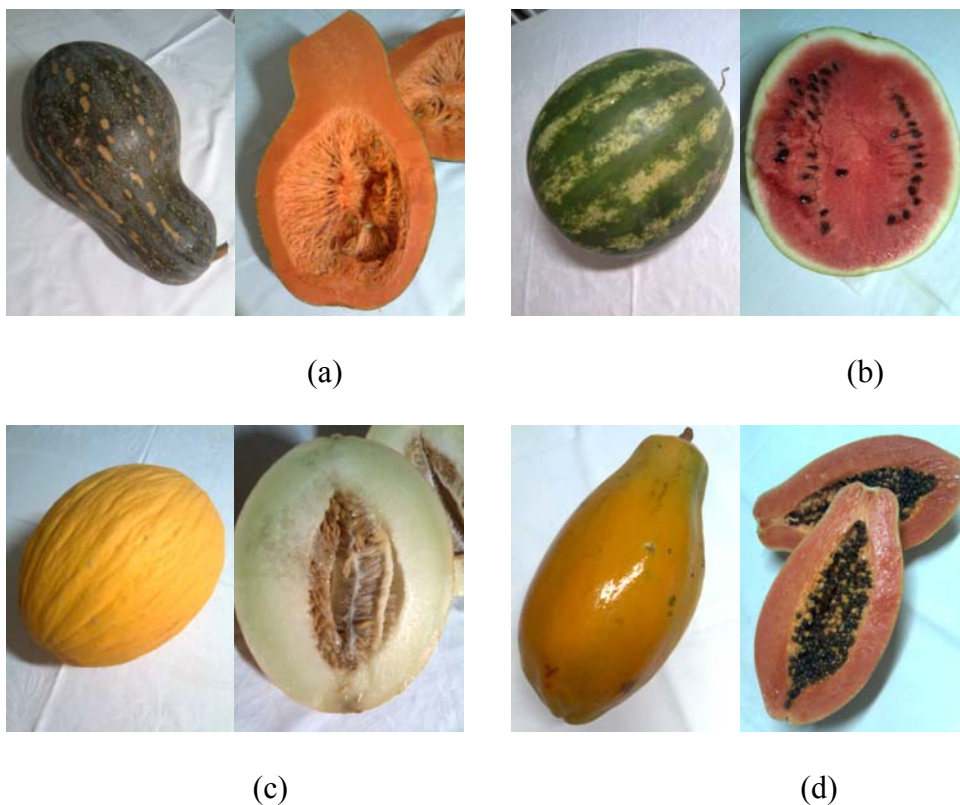


Figura 10: Espécies de abóbora (a), melancia (b), melão (c) e mamão (d) utilizadas para extração do ácido fítico.

5.2.4 Comparação entre os Eluentes NaCl e HCl

Para avaliar a eficiência dos eluentes utilizados e da substituição da solução salina por solução ácida para eluição da coluna cromatográfica, comparou-se o conteúdo de ácido fítico obtido para as amostras de abóbora, AB 3, eluída com solução de NaCl, com aquele da amostra AB 4, eluída com solução de HCl.

As Figuras 11 e 12 representam o comportamento dos elutos finais das amostras AB 3, em NaCl, e AB 4, eluída com HCl, respectivamente. Em cada caso, a curva do branco contendo o reagente de Wade e o respectivo volume do eluente utilizado para a leitura é mostrada para comparação com aquela da amostra contendo ácido fítico.

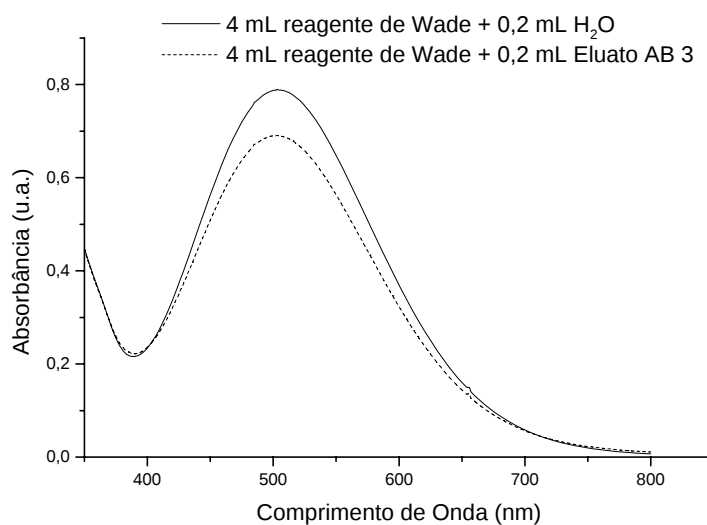


Figura 11: Eluato final em NaCl 0,70 mol L⁻¹ de abóbora.

A partir dos espectros de Uv-Vis observa-se que as amostras tanto em NaCl quanto em HCl se comportam de maneira semelhante diante do reagente de Wade. A presença do ácido fítico nos dois casos pode ser claramente observada através do monitoramento da redução da absorbância em 500 nm.

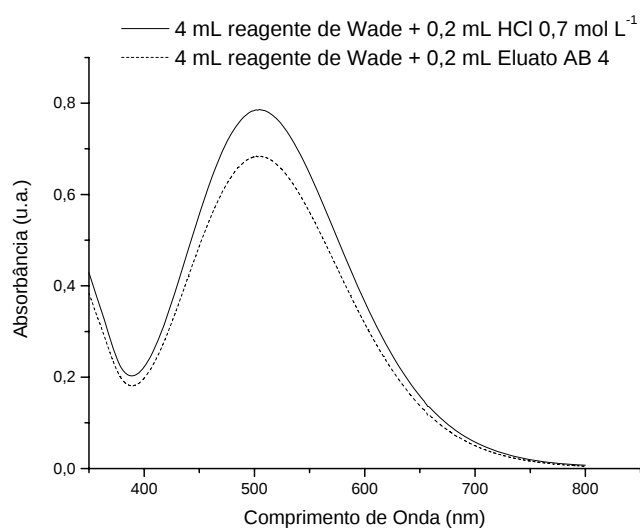


Figura 12: Eluato final em HCl 0,70 mol L⁻¹ de abóbora.

A partir dos valores de absorbância obtidos dos eluatos finais para as amostras AB 3 e AB 4, o conteúdo de ácido fítico presente no eluato final foi calculado pela curva analítica, Equação 08, pág. 92. O conteúdo de ácido fítico determinado para as amostras AB 3 ($7,3216 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e AB 4 ($7,7914 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) foi semelhante. Estes resultados sugerem que não houve diferença significativa entre os procedimentos de eluição com solução de NaCl e HCl, indicando que a substituição do NaCl é possível e garante bons resultados. Além disso, eluindo-se a coluna cromatográfica com HCl, a separação do sal não é mais necessária, pois o ácido fítico obtido encontra-se na forma protonada em solução ácida.

5.3 DETERMINAÇÃO DA PERCENTAGEM DE PUREZA DA SOLUÇÃO CONCENTRADA DE ÁCIDO FÍTICO

A Tabela 03 mostra a percentagem de pureza das soluções concentradas de ácido fítico obtidas a partir da redução do volume dos eluatos em HCl, bem como a densidade das respectivas soluções.

Tendo-se a massa das soluções de ácido fítico das diferentes amostras, calcularam-se, a partir da relação $d = m V^{-1}$, as densidades destas soluções. Sabendo-se que uma solução padrão de ácido fítico 40 % apresenta uma densidade de $1,282 \text{ g mL}^{-1}$ a 25°C , calcularam-se, a partir da relação entre a densidade da solução padrão de ácido fítico 40 % e a densidade da solução obtida, multiplicada por 40 (Equação 03, pág. 72), as percentagens de pureza das soluções concentradas de ácido fítico.

Tabela 03. Determinação da densidade e da percentagem de pureza das soluções concentradas de ácido fítico obtidas de diferentes sementes.

Amostra	Densidade solução concentrada (g mL ⁻¹)	% pureza solução concentrada (%)
Abóbora	1,115 (± 0,003478)	34,80 (± 0,105830)
Melancia	1,115 (± 0,006010)	34,78 (± 0,190919)
Melão	1,110 (± 0,000424)	34,63 (± 0,014142)
Mamão	1,094 (± 0,023900)	34,14 (± 0,742462)

Os valores entre parênteses representam a estimativa do desvio padrão para as amostras tratadas com HCl na coluna cromatográfica, sendo quatro replicatas para o ácido fítico de abóbora e duplicatas para as demais amostras (Tabela 02).

Verifica-se que os procedimentos propostos de extração do ácido fítico e purificação em coluna cromatográfica com solução de HCl foram eficientes, resultando em soluções com grau de pureza comparável ao disponível comercialmente. De todas as amostras, a solução de ácido fítico obtida de sementes de abóbora apresentou maior pureza, seguida de sementes de melancia, melão e finalmente mamão. Todas as soluções apresentaram coloração amarelada e foram armazenadas em frascos de polietileno sob refrigeração para os estudos posteriores, permanecendo estáveis por todo o período de armazenamento. Além disso, a densidade das soluções mostraram-se semelhantes à densidade de uma solução padrão de ácido fítico 40 % (1,282 g mL⁻¹).

Visto que o custo de soluções padrão de ácido fítico é bastante elevado, os procedimentos propostos podem representar uma via alternativa para obtenção deste importante composto para a indústria de alimentos. Os procedimentos são rápidos e reprodutíveis, e podem ser facilmente aplicados pelas indústrias, pois além de utilizar resíduos como matéria-prima, requerem materiais e reagentes simples e de custo relativamente baixo.

O produto final pode ser obtido como solução de ácido fítico ou ácido fítico no estado sólido, dependendo do interesse para suas aplicações posteriores, com elevado grau de

pureza e alto rendimento. Além disso, este trabalho também revelou novas fontes de obtenção do ácido fítico. Alguns estudos mostraram a presença do ácido fítico em sementes de abóbora, melancia (EL-ADAWY; TAHA, 2001) e melão (ENUJIUGHA; AYODELE-ONI, 2003), porém, as sementes de mamão tem sido pouco investigadas.

Estas sementes, caracterizadas como resíduos agroindustriais, são altamente nutritivas e normalmente desprezadas no processamento das frutas estudadas. Seu aproveitamento tecnológico pode representar um aliado no combate à desnutrição em países em desenvolvimento, além de fornecer um aditivo alimentar seguro, como o ácido fítico.

5.4 DETERMINAÇÃO DE FÓSFORO NAS AMOSTRAS DE ÁCIDO FÍTICO

5.4.1 Método AOAC 995.11

Para a determinação de fósforo proveniente do ácido fítico nas diferentes amostras, utilizou-se o método para determinação de fósforo total em alimentos (AOAC 995.11). O método colorimétrico é sensível na faixa de 0,05 a 1,00 g de P/100 g.

Neste método, as amostras de ácido fítico em solução foram secas às cinzas juntamente com óxido de zinco em mufla, a fim de remover toda a matéria orgânica. Com o aquecimento, grupos H_2PO_4^- são liberados da molécula do ácido fítico, os quais são solúveis em ácido (LEE, 1999). Com adição de KOH, ocorre a precipitação de $\text{Zn}(\text{OH})_2$, indicando que o zinco encontra-se livre em solução, na forma de cloreto de zinco, e não combinado com os íons fosfato. Novamente, a adição de ácido solubiliza o $\text{Zn}(\text{OH})_2$, e o resíduo de fosfato solúvel em ácido forma um complexo azul com molibdato de sódio, em presença de ácido ascórbico como agente redutor. O complexo $[(\text{MoO}_2.4\text{MoO}_3)_2.\text{H}_3\text{PO}_4]$

pode ser monitorado espectrofotometricamente em 823 nm. As leituras de absorbância foram realizadas dentro de uma hora após a reação colorimétrica (Figura 13).



Figura 13: Complexo $[(\text{MoO}_2 \cdot 4\text{MoO}_3)_2 \cdot \text{H}_3\text{PO}_4]$ formado para determinação de fósforo.

5.4.1.1 Curva Analítica

A Figura 14 representa o efeito do aumento da concentração de fósforo na absorbância da solução de molibdato de sódio contendo ácido ascórbico. Verifica-se que ocorre um aumento da absorbância proporcional ao aumento da concentração de KH_2PO_4 adicionado. A banda de absorção é bem definida e apresenta absorbância máxima em 823 nm.

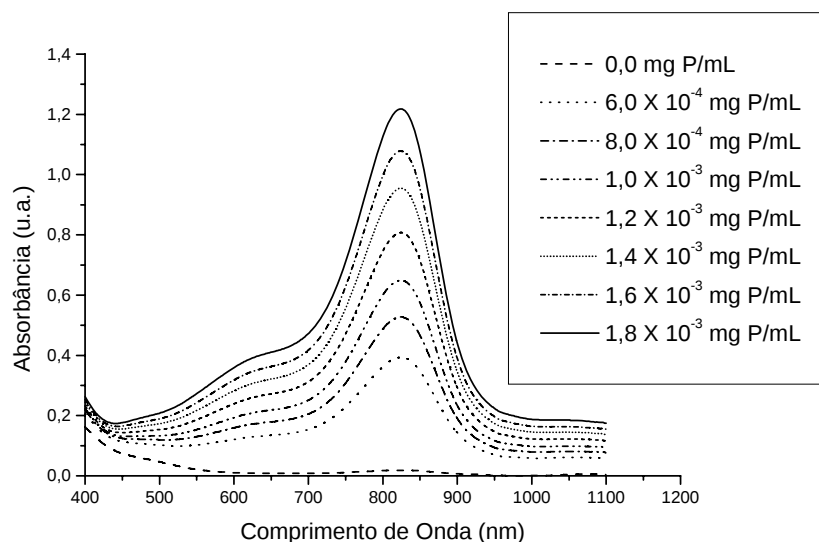


Figura 14. Curva analítica de fósforo, faixa linear de 0,0 a $1,8 \times 10^{-3}$ mg P/ mL.

A partir dos dados de absorbância para as diferentes concentrações de KH_2PO_4 nas soluções padrão, a curva analítica de fósforo com solução de molibdato-ácido ascórbico foi construída (Figura 15). Observa-se uma linearidade da Lei de Beer-Lambert com o aumento na absorbância em 823 nm relacionado à concentração de fósforo.

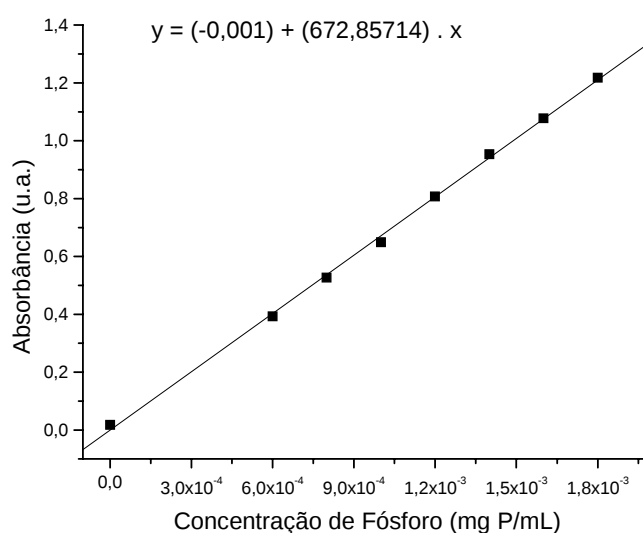


Figura 15. Curva analítica de fósforo, coeficiente de correlação, r , de 0,99939.

A curva analítica variou de 0,0 a $1,8 \times 10^{-4}$ mg P/mL, contando com 8 pontos experimentais, e o coeficiente de correlação da reta obtido, r , foi igual a 0,99939, o que explica 99,88 % da variância dos dados.

5.4.1.2 Determinação de Fósforo nas Amostras de Ácido Fítico

A curva analítica obtida experimentalmente é apresentada na Equação 09.

$$y = (-0,001) + (672,85714) \cdot x \quad (09)$$

onde y = absorvância da amostra e x = concentração de fósforo na solução.

A Figura 16 apresenta os espectros obtidos para as diferentes amostras.

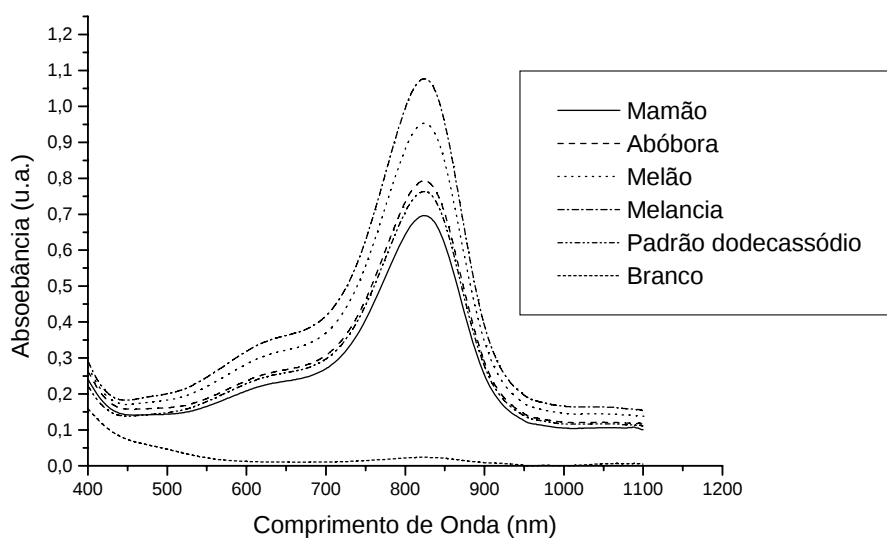


Figura 16. Determinação de fósforo nas amostras de ácido fólico de mamão, abóbora, melão e melancia e ácido fólico padrão dodecassódio.

Conhecendo-se os valores de absorbância registrados espectrofotometricamente para cada amostra é possível, a partir da curva analítica, calcular o conteúdo de fósforo, em mg P/mL, nas diferentes amostras. A Tabela 04 apresenta o conteúdo de fósforo calculado para cada amostra a partir da curva analítica, bem como o conteúdo de P como P (g/100g) e P como P_2O_5 (g/100g), segundo as recomendações do método.

Com o aquecimento das amostras de ácido fítico e remoção da matéria orgânica, os grupos dihidrogenofosfatos ($H_2PO_4^-$) são liberados da molécula do ácido fítico, os quais, em meio ácido, formam o ácido ortofosfórico (H_3PO_4). O ácido ortofosfórico perde água gradativamente quando aquecido em temperatura moderada, em torno de $220^\circ C$, formando ácido pirofosfórico ($H_4P_2O_7$) e liberando água no processo, a qual posteriormente é degradada. Com aquecimento em sistema aberto com temperaturas acima de $240^\circ C$, em torno de $320^\circ C$, o ácido pirofosfórico sofre desidratação, formando unidades de ácido metafosfórico ($(HPO_3)_n$), que começam a ciclizar, formando os trimetafosfatos ($(P_3O_9)^{3-}$) e liberando novamente água no processo. Os trimetafosfatos são obtidos pelo aquecimento dos grupos dihidrogenofosfatos a $640^\circ C$, e, em seguida, mantendo-se o material fundido a $500^\circ C$ por um determinado tempo, para permitir a condensação e liberação de água (LEE, 1999). O resíduo de fosfato obtido é solúvel em ácido, e forma um complexo azul, $[(MoO_2.4MoO_3)_2.H_3PO_4]$, com molibdato de sódio em presença de ácido ascórbico como agente redutor, o qual pode ser monitorado espectrofotometricamente e quantificado.

Tabela 04. Conteúdo de fósforo nas amostras de ácido fítico obtidas das diferentes sementes.

Amostra	Conteúdo de P a partir da curva analítica (mg P mL ⁻¹)	Conteúdo de P como P (g/100g)	Conteúdo de P como P ₂ O ₅ (g/100g)
Abóbora	1,18 x 10 ⁻³	0,0231	0,0529
Melancia	1,60 x 10 ⁻³	0,0313	0,0717
Melão	1,42 x 10 ⁻³	0,0276	0,0632
Mamão	1,04 x 10 ⁻³	0,0207	0,0474
Padrão	1,14 x 10 ⁻³	2,3661	5,4184

Pode-se observar que o conteúdo de fósforo calculado como P (g/100g) e como P₂O₅ (g/100g) foi maior para o ácido fítico padrão do que para as amostras, o que era esperado, pois o padrão utilizado na forma sólida apresenta elevado grau de pureza (90 %), enquanto as amostras em solução apresentam pureza de aproximadamente 34 % (Tabela 03).

5.5 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Para uma análise qualitativa das amostras de ácido fítico obtidas a partir dos procedimentos de extração e purificação propostos, realizou-se a cromatografia em camada delgada.

Sabe-se que diferentes processamentos, métodos de preparação e condições de extração podem reduzir o conteúdo de ácido fítico, resultando em uma mistura de fosfato inorgânico e *mio*-inositol mono-, di-, tri-, tetra-, penta- e hexafosfato. Desta forma, para assegurar que o ácido fítico não tenha sido hidrolisado a fosfatos de inositóis inferiores durante o processamento, comparou-se o comportamento cromatográfico de uma amostra de ácido fítico padrão, cristalizada em pH 2,800, com aquele do ácido fítico obtido das diferentes sementes e também cristalizado em pH 2,800; a fim de revelar o hexafosfato como principal componente obtido nas amostras cristalizadas.

A cromatografia em camada delgada também foi utilizada por Angyal e Russel (1969) para separar os penta-fosfatos dos demais polifosfatos de inositol. Para isso, os ácidos fosfóricos de inositol foram metilados com diazometano resultando em derivados solúveis em solventes orgânicos, e o seu comportamento cromatográfico foi examinado. Os metil-ésteres resultantes dos ácidos fosfóricos de inositol foram prontamente solúveis em clorofórmio. Utilizando sílica gel como adsorvente, após duas eluições das placas cromatográficas com metanol anidro, o hexa-fosfato de mio-inositol teve o valor inferior de R_f , enquanto os dois componentes penta-fosfatos de uma hidrólise ácida parcial de ácido fítico foram resolvidos com elevados valores de R_f .

O fator de retenção (R_f) para a cromatografia planar pode ser calculado a partir da Equação 10.

$$R_f = \frac{d_r}{d_m} \quad (10)$$

onde d_r é a distância percorrida pelos componentes até o centro da mancha e d_m é a distância percorrida pela fase móvel.

A partir destas informações, que podem ser retiradas do cromatograma obtido após a revelação da placa, o valor de R_f para cada amostra pode ser calculado a partir da Equação 10.

A Figura 17 representa o cromatograma obtido após o deslocamento cromatográfico e a revelação dos componentes das amostras e do padrão. Nota-se que os deslocamentos das amostras foram similares ao padrão, o que assegura a presença do hexa-fosfato de mio-inositol, o ácido fítico, em todas as amostras. De acordo com Angyal e Russel (1969), se componentes penta-fosfatos estivessem presentes nas amostras, estes se deslocariam mais

rapidamente que o componente hexafosfato, resultando em manchas distintas no cromatograma e consequentemente com valores de R_f mais elevados.



Figura 17. Cromatograma obtido após a cromatografia em camada delgada. Da esquerda para a direita: padrão, melancia, mamão, melão, abóbora e padrão.

Empregando-se as mesmas condições para a eluição de todas as amostras, componentes similares devem apresentar valores de R_f similares. Logo, pela comparação dos valores de R_f das amostras com o padrão de ácido fítico utilizado (ácido fítico dodecassódico cristalizado em pH 2,800), pode-se verificar se o hexafosfato é o principal componente encontrado nas diferentes amostras. A Tabela 05 apresenta os valores de R_f obtidos para as diferentes amostras e para o padrão, calculados a partir da cromatoplaça obtida (Figura 17).

Tabela 05. Valores de R_f obtidos para as amostras de AF em cromatografia de camada delgada.

AMOSTRA	d_m (cm)	d_r (cm)	R_f
Padrão	11,5	7,5	0,65
AF abóbora	11,5	7,4	0,64
AF melancia	11,5	7,1	0,62
AF melão	11,5	7,3	0,63
AF mamão	11,5	7,1	0,62

A partir dos valores de R_f , pôde-se confirmar que os procedimentos de extração e purificação não liberaram fosfato da molécula de ácido fítico, e que o hexafosfato de inositol foi o principal componente obtido neste trabalho a partir de sementes de abóbora, melancia, melão e mamão.

5.6 ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho é uma técnica analítica qualitativa, que permite a identificação de grupos funcionais característicos nas moléculas.

Os estudos de absorção no infravermelho foram realizados para caracterizar o ácido fítico obtido das diferentes sementes. Para isso, os espectros das amostras foram comparados com aqueles de amostras de ácido fítico padrão dipotássico e dodecassódico.

A Figura 18 representa o espectro de infravermelho de uma amostra de ácido fítico padrão dipotássico à temperatura ambiente, obtido por Quirrenbach (2007). O espectro mostrou frequências do grupamento $O=PO_3H_2$, com absorção em $1647,1\text{ cm}^{-1}$, correspondendo ao grupo $O=P-O$. O grupamento $P=O$ absorveu em $1222,8\text{ cm}^{-1}$ e as ligações $P-O$ mostraram absorção em $966,3\text{ cm}^{-1}$. A ligação $C-O$ do grupamento $O=PO_3H_2$ apresentou absorção em $1070,4\text{ cm}^{-1}$.

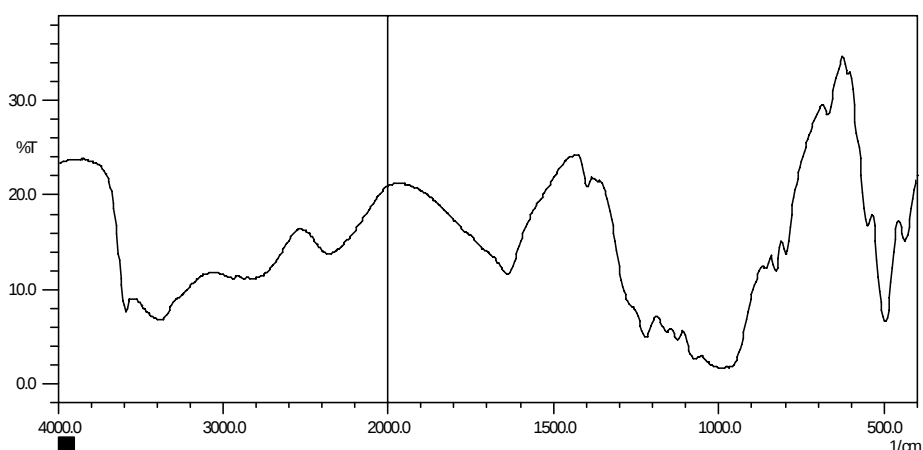


Figura 18. Espectro de infravermelho de uma amostra do ácido fólico à temperatura ambiente (fonte: QUIRRENBACH, 2007).

A Figura 19 representa o espectro de infravermelho para o ácido fólico padrão dodecassódico à temperatura ambiente. Observa-se que alguns dos picos característicos presentes na Figura 19, encontram-se levemente deslocados (Tabela 06). A região de frequência de $1647,1\text{ cm}^{-1}$ do grupamento $\text{O}=\text{P}-\text{O}$ deslocou-se para $1672,2\text{ cm}^{-1}$ no espectro do ácido fólico dodecassódico com relação ao ácido fólico dipotássico. O grupo $\text{P}=\text{O}$ não foi observado no espectro e a ligação $\text{P}-\text{O}$ foi deslocada de $966,3\text{ cm}^{-1}$ para $975,9\text{ cm}^{-1}$. A ligação $\text{C}-\text{O}$ também foi deslocada de $1070,4\text{ cm}^{-1}$ para $1124,4\text{ cm}^{-1}$. Os deslocamentos para frequências maiores devem-se à presença de íons sódio e à maior substituição de hidrogênios na molécula do ácido fólico dodecassódico em relação ao ácido fólico dipotássico.

As semelhanças entre os espectros das Figuras 18 e 19 indicam que o ácido fólico apresenta picos característicos de grupamentos definidos, independente da forma em que se encontram, pois os grupos funcionais que interagem com a radiação infravermelha, absorvendo-a e originando o respectivo espectro, são os mesmos para todas as formas de apresentação do ácido fólico.

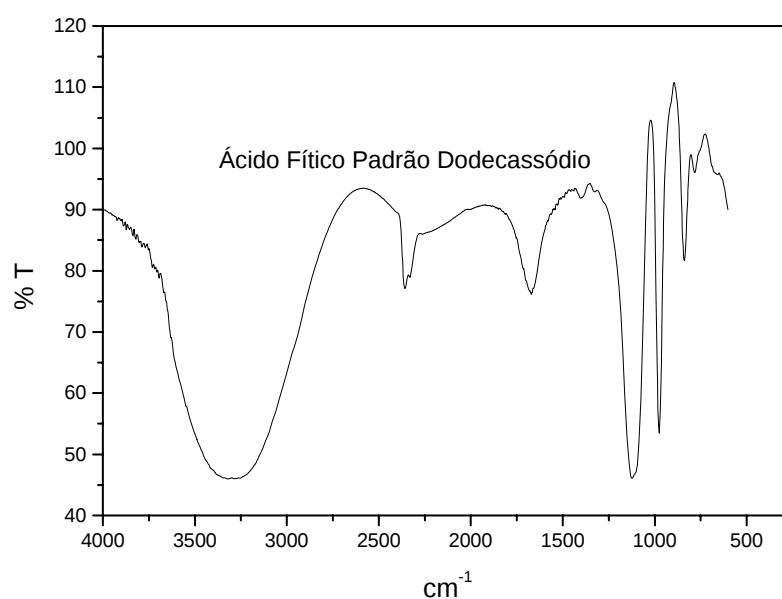


Figura 19. Espectro de infravermelho do ácido fítico dodecassódico à temperatura ambiente.

O ácido fítico obtido após a cristalização das soluções concentradas das diferentes sementes, bem como o ácido fítico padrão cristalizado em pH 2,80, foram submetidos à espectrometria de absorção no infravermelho, e os espectros resultantes podem ser observados na Figura 20.

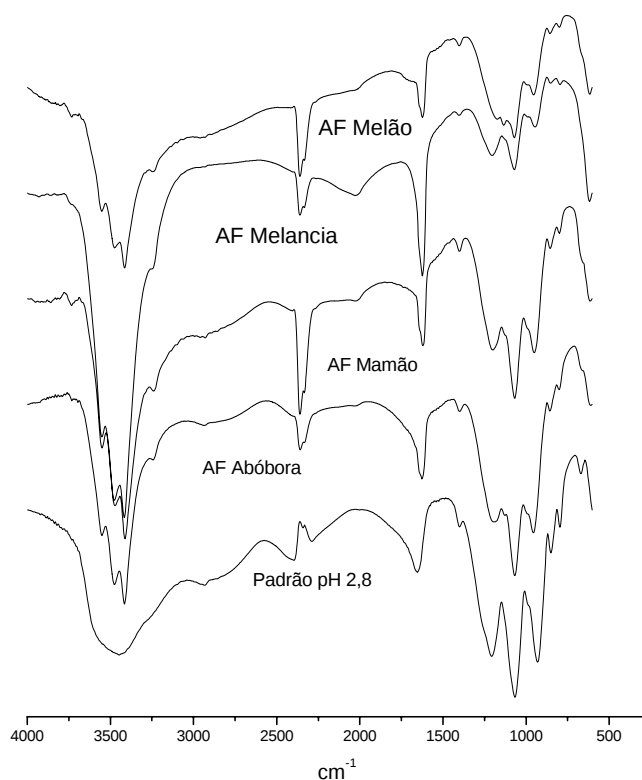


Figura 20. Espectro de infravermelho das amostras AB 6, MEL 1, MLAO 1, MAO 1 e do ácido fítico padrão cristalizado em pH 2,800.

Nota-se que os picos característicos do ácido fítico (Figuras 19 e 20) encontram-se presentes e com deslocamentos evidentes com relação às amostras padrão. A região de frequência de $1647,1\text{ cm}^{-1}$ do grupamento O=P-O deslocou-se para $1654,8\text{ cm}^{-1}$ no espectro do ácido fítico padrão dodecassódico cristalizado em pH 2,800; com relação ao ácido fítico dipotássico. O grupo P=O deslocou-se de $1222,8\text{ cm}^{-1}$ para $1207,4\text{ cm}^{-1}$ e a ligação P-O foi deslocada de $966,3$ para $929,6\text{ cm}^{-1}$. O deslocamento da ligação C-O foi discreto, de $1070,4\text{ cm}^{-1}$ para $1066,6\text{ cm}^{-1}$, como pode ser observado na Figura 20.

Os espectros das amostras de ácido fítico obtidas de sementes de abóbora, melancia, melão e mamão apresentaram muitas semelhanças com aqueles do ácido fítico padrão (Figuras 19 e 20) e, particularmente, com o espectro do ácido fítico padrão dodecassódico cristalizado em pH 2,800. Este pH foi utilizado para a cristalização de todas as amostras.

Os espectros das amostras apresentaram picos característicos de grupos funcionais presentes no ácido fítico, com deslocamentos evidentes que podem ser observados na Tabela 06.

Tabela 06. Frequências do grupamento $\text{O}=\text{PO}_3\text{H}_2$ obtidas em espectros de infravermelho do ácido fítico dipotássico, dodecassódico e das amostras de ácido fítico obtidas das diferentes sementes.

Amostras	O=P-O estiramento assimétrico (cm^{-1})	P=O estiramento (cm^{-1})	P-O estiramento (cm^{-1})	C-O estiramento (cm^{-1})
Ácido fítico dipotássico (QUIRRENBACH, 2007)	1647,1	1222,8	966,3	1070,4
Ácido fítico dodecassódico	1672,2	-	975,9	1124,4
Ácido fítico dodecassódico pH 2,8	1654,8	1207,4	929,6	1066,6
Ácido fítico Abóbora	1627,8	1188,1	956,6	1068,5
Ácido fítico Melancia	1625,9	1203,5	954,7	1070,4
Ácido fítico Melão	1624,0	1136,0	954,7	1070,4
Ácido fítico Mamão	1622,0	1199,6	950,8	1068,5

Os picos largos próximos de 3400 cm^{-1} em todos os espectros analisados são indicativos da presença de OH em pontes de hidrogênio, da ligação P-OH, ou umidade na amostra. Os estiramentos O-H da ligação P-OH podem ser observados por picos discretos na região de frequência de 2700 a 2900 cm^{-1} . Os pequenos ombros observados na região próxima de 3000 cm^{-1} são característicos de estiramentos C-H do esqueleto alquil, enquanto as deformações C-H podem ser observadas pela presença de picos de pequena intensidade próximos a 1400 cm^{-1} . O estiramento simétrico da ligação O=P-O aparece na região de frequência de 1300 a 1420 cm^{-1} , que pode ter sido sobreposto pela deformação C-H do esqueleto alquil próximo a 1400 cm^{-1} . Os picos desdobrados em dois próximos de 2300 cm^{-1} observados nos espectros das Figuras 19 e 20 são característicos do CO_2 .

A presença de picos característicos nos espectros com pequenos deslocamentos nas frequências assegura a presença do ácido fítico purificado.

5.7 ESTUDOS POTENCIOMÉTRICOS

5.7.1 Curvas de Titulação

Os estudos potenciométricos foram realizados a fim de caracterizar as amostras de ácido fítico obtidas das diferentes sementes e comparar suas propriedades ácido-básicas com aquelas do ácido fítico padrão. Os dados obtidos das titulações potenciométricas para o ácido fítico padrão dodecassódico e para o ácido fítico obtido das sementes de melão estão representados nas curvas da Figura 21.

A curva de titulação potenciométrica do ácido fítico dodecassódico (linha preta da Figura 21) revelou três regiões tamponadas, evidenciando a presença de hidrogênios ionizáveis. As deprotonações ocorreram na região de pH 2,5 a 4,0, pH 6,0 a 7,5 e pH 9,0 a 11,0. Na região de pH 2,5 a 4,0 foram consumidos dois mmol de NaOH por mmol de ácido fítico, indicando a neutralização de dois prótons. Na região de pH 4,0 até próximo de 6,0, observa-se uma inflexão, indicando que não ocorre deprotonação nesta faixa de pH. Na faixa de pH 6,0 a 7,5 foram consumidos mais dois mmol de NaOH por mmol de ligante, o que indica a presença de dois hidrogênios ionizáveis. De pH 7,5 a 9,0, uma nova inflexão é observada na curva, indicando a ausência de hidrogênios ionizáveis nesta região. De pH 9,0 a 11,0, quatro mmol de NaOH foram consumidos por mmol de ligante, evidenciando a presença de mais quatro hidrogênios, totalizando oito hidrogênios ionizáveis detectados para o ácido fítico dodecassódico, na faixa de pH 2,5 a 11,0. Os dados são coerentes com a estrutura da molécula, que apresenta doze hidrogênios

substituíveis, dos quais apenas oito podem ser detectados na faixa de pH estudada, já que os quatro primeiros prótons encontram-se ionizados em torno de pH 2,0; mesmo antes da adição de base (BEBOT-BRIGAUD et al., 1999). Estes autores também determinaram oito constantes de acidez para o ácido fítico a 20 °C e 0,17 mol L⁻¹ de Et₄NClO₄.

A linha cinza da Figura 21 representa a curva de titulação potenciométrica do ácido fítico obtido de sementes de melão.

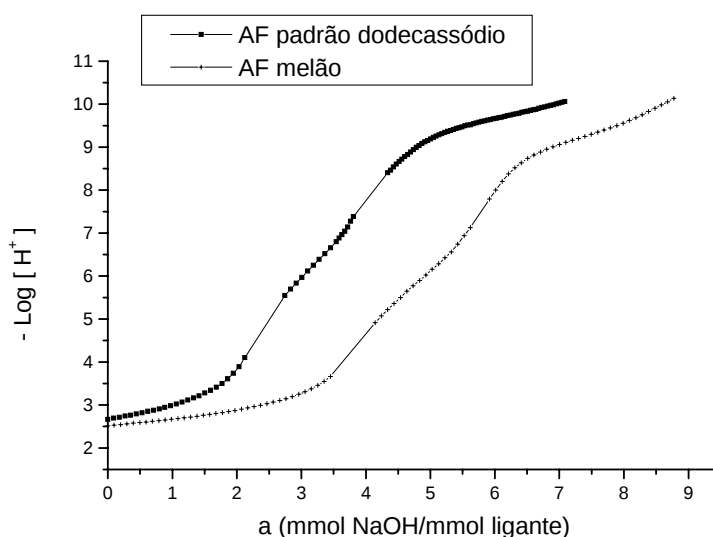


Figura 21. Curva de titulação ácido fítico padrão dodecassódico e obtido a partir de sementes de melão.

Pode-se observar que a curva da amostra é semelhante à curva do padrão, com deslocamento para valores inferiores de pH, o que é coerente com a maior acidez em que o meio da amostra se encontra, indicando que o ácido fítico encontra-se presente na amostra, pois segue a curva de titulação potenciométrica característica do ácido fítico.

A curva também apresentou três regiões tamponadas, semelhante à curva do ácido fítico padrão, evidenciando a presença de hidrogênios ionizáveis. As deprotonações ocorreram na região de pH 2,5 a 4,0, pH 6,0 a 7,5 e pH 9,0 a 10,0. Na região de pH 2,5 a

4,0 foram consumidos quatro mmol de NaOH por mmol de ácido fítico, indicando a neutralização de quatro prótons, o que está de acordo com De Carli et al. (2006), que determinou as constantes de protonação para o ácido fítico dipotássico a 36 °C e força iônica de 0,10 mol L⁻¹ de KCl, utilizando KOH como solução titulante. Na faixa de pH 6,0 a 7,5 foram consumidos mais dois mmol de NaOH por mmol de ligante, o que indica a presença de dois hidrogênios ionizáveis. De pH 9,0 a 10,0, dois mmol de NaOH foram consumidos por mmol de ligante, evidenciando a presença de mais dois hidrogênios, totalizando oito hidrogênios ionizáveis detectados para o ácido fítico obtido do melão na faixa de pH 2,5 a 10,0. As inflexões podem ser observadas na região de pH 4,0 até próximo de 6,0, e de pH 7,5 a 9,0, indicando a ausência de hidrogênios ionizáveis nestas regiões.

As curvas de titulação potenciométrica para o ácido fítico obtido de sementes de abóbora, melancia e mamão também foram semelhantes à curva do ácido fítico padrão (Figura 21), com deslocamentos evidentes para valores inferiores de pH. As três regiões tamponadas que evidenciam a presença de hidrogênios ionizáveis também foram observadas nas curvas de titulação para estas sementes, e um total de oito hidrogênios ionizáveis detectados para o ácido fítico obtido de sementes de abóbora, melancia e mamão na faixa de pH 2,5 a 11,0.

5.7.2 Constantes de Protonação do Ácido Fítico

Os dados obtidos a partir das titulações potenciométricas foram tratados com o programa computacional BEST 7, que utiliza equações de balanço de massa, através da Equação 06, pág. 77, para calcular as constantes de protonação dos ligantes. Para o ácido

fítico, oito constantes de protonação foram determinadas, as quais encontram-se listadas na Tabela 07.

Tabela 07. Logaritmos das constantes de protonação do ácido fítico dodecassódico e ácido fítico obtido das diferentes sementes, a $25 \pm 0,1$ °C, $\mu = 0,10$ mol L⁻¹ (NaCl), atmosfera de argônio.

Quociente de Equilíbrio	Log K AF dipotássico*	Log K AF dodecassódico	Log K AF Melancia	Log K AF Melão	Log K AF Abóbora**
[LH]/[L]	10,81	10,02	11,22	11,34	11,19
[LH ₂]/[LH ₁]	9,90	9,73	10,10	9,97	10,67
[LH ₃]/[LH ₂]	9,76	9,88	8,94	9,06	9,24
[LH ₄]/[LH ₃]	9,33	8,36	9,34	9,14	9,48
[LH ₅]/[LH ₄]	7,48	6,38	7,34	6,77	7,25
[LH ₆]/[LH ₅]	6,00	4,12	5,60	5,50	5,51
[LH ₇]/[LH ₆]	3,78	2,30	3,28	3,10	2,72
[LH ₈]/[LH ₇]	2,06	3,07	2,18	2,13	2,39

O desvio padrão para o ácido fítico dodecassódico foi $\delta = 0,005965$, para ácido fítico de melancia foi $\delta = 0,008857$, ácido fítico de melão foi $\delta = 0,007391$ e ácido fítico de abóbora $\delta = 0,004026$; δ -fit é o desvio padrão computado a partir dos valores de p[H] calculados, relativos àqueles observados experimentalmente.

*(Fonte: DE CARLI et al., 2006. Estudo realizado a $36 \pm 0,1$ °C, $\mu = 0,10$ mol L⁻¹ (KCl), atmosfera de argônio, com desvio padrão de $\delta = 0,007157$).

**Força iônica 0,10 mol L⁻¹ KCl.

Para o ácido fítico dodecassódico, a primeira protonação apresentou valor de Log de K igual a 10,02, que está de acordo com o valor de 10,81 encontrado por De Carli et al. (2006). Os valores de Log de K seguintes são referentes às sucessivas protonações sobre a estrutura, os quais decrescem com o aumento do número de H⁺ sobre a molécula. Os valores de Log de K para as espécies di-, tri-, tetra-, penta- e hexaprotonadas foram de 9,73; 9,88; 8,36; 6,38 e 4,12, respectivamente. Porém, os valores de Log de K determinados para as espécies hepta e octaprotonadas apresentaram uma ordem inversa à observada por De Carli et al. (2006). Segundo Crea et al. (2008), os diferentes meios iônicos podem afetar o comportamento geral ácido-base. Desta forma, a comparação dos resultados torna-se delicada e requer atenção, pois diferentes meios iônicos podem resultar

em diferentes constantes de protonação dos ligantes, dificultando a comparação com os dados disponíveis na literatura.

Segundo Bebot-Brigaud et al. (1999), os primeiros seis valores de pK_a são relativamente baixos e correspondem à dissociação do primeiro próton de cada grupo fosfato. A dissociação dos prótons remanescentes pela base torna-se mais difícil, especialmente para os quatro últimos prótons. Em torno de pH 2,0; cerca de quatro prótons são ionizados antes mesmo da adição de base. Neste valor baixo de pH, diversos equilíbrios ocorrem, porém, representam apenas uma singela influência nos valores de pH.

Deste modo, dos doze hidrogênios substituíveis existentes na molécula do ácido fítico, oito foram detectados por titulação potenciométrica, já que os quatro primeiros prótons encontram-se ionizados em torno de pH 2,0; mesmo antes da adição de base. Acima de pH 11,0 pode ocorrer a dissociação da molécula de água, logo, valores de pK_a determinados por potenciometria em solução aquosa acima deste valor não são confiáveis.

Para o ácido fítico obtido de sementes de abóbora, melancia, melão e mamão (dados não mostrados), os valores das constantes de protonação determinados foram semelhantes entre si e aos padrões, o que confirma a presença do ácido fítico. Os valores de Log de K para a primeira protonação de todas as amostras foram mais elevados que os valores obtidos para os padrões, e os demais foram similares (Tabela 07).

5.7.3 Curvas de Distribuição das Espécies

Partindo-se dos valores calculados das constantes de protonação do ácido fítico e das equações de equilíbrio, as curvas de distribuição das espécies foram desenhadas, com o auxílio do programa computacional SPEPLOT.

De acordo com o estudo realizado por De Carli et al. (2006), o ácido fítico dipotássico encontrou-se totalmente deprotonado em pH 11,9, atingindo um máximo de formação de 97,5 %. A espécie LH atingiu um máximo de formação de 41,9 % em pH 10,2 e as espécies di-, tri-, tetra-, penta-, hexa- e heptaprotonadas encontraram-se formadas entre os valores de pH 9,8 e 2,5.

A Figura 22 mostra a curva de distribuição das espécies obtida para o ácido fítico dodecassódico, com perfil semelhante àquela obtida por De Carli et al. (2006) para o ácido fítico dipotássico. A espécie totalmente deprotonada, L, encontrou-se em pH 11,9, com um máximo de formação de 98,7 %. À medida que o pH diminui, a concentração da espécie L decresce e aumenta a concentração da espécie LH, que atinge a formação máxima de 34,5 % em pH 10,1. A espécie LH₂ atingiu o máximo de formação de 25 % em pH 9,7. As espécies LH₃, LH₄ e LH₅ encontraram-se formadas em pH 9,0; 7,4 e 5,2, com formações máximas de 72,0 %, 82,9 % e 87,0 %, respectivamente. As espécies LH₆, LH₇ e LH₈ encontraram-se formadas abaixo de pH 3,5.

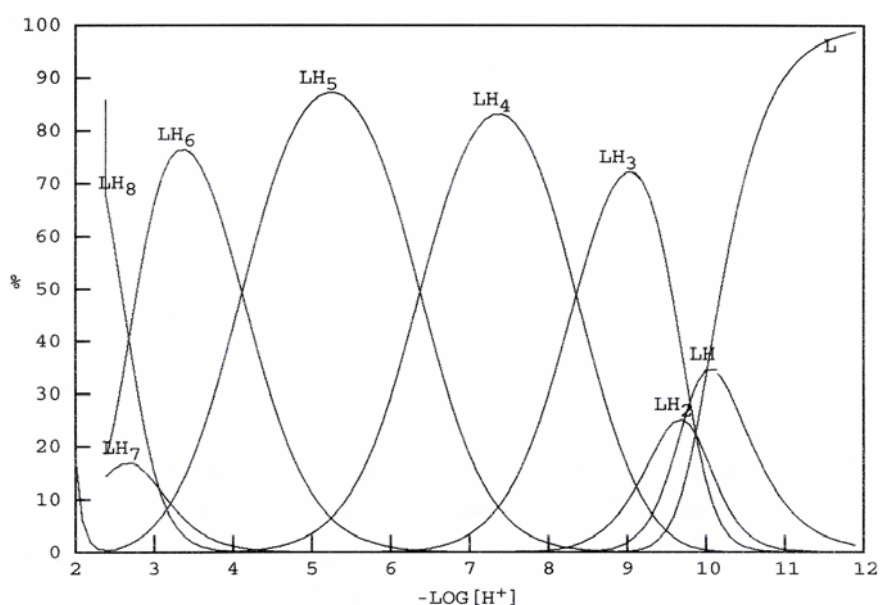


Figura 22. Curvas de distribuição das espécies em função do p[H] para o sistema contendo 0,1 mmol de ácido fítico dodecassódico, $\mu = 0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$, a $25 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e atmosfera de argônio.

A curva de distribuição das espécies para o ácido fítico obtido de sementes de melão está representada na Figura 23. Nota-se que a curva é semelhante àquela do ácido fítico padrão dodecassódico (Figura 22) com relação ao número de espécies e o pH em que estas encontram-se formadas.

A espécie totalmente deprotonada, L, encontrou-se 82,0 % formada em pH 12,0. A espécie LH apareceu à medida que o pH diminuiu e a concentração da espécie L foi reduzida, atingindo uma formação máxima de 70,3 % em pH 10,7. A espécie LH₂ atingiu o máximo de formação de 55,9 % em pH 9,6. As espécies LH₃, LH₄ e LH₅ encontraram-se formadas em pH 8,9; 7,9 e 6,2, com formações máximas de 36,0 %, 81,2 % e 74,0 %, respectivamente. As espécies LH₆, LH₇ e LH₈ encontraram-se formadas abaixo de pH 4,5.

As curvas de distribuição das espécies para o ácido fítico obtido de sementes de abóbora, melancia e mamão foram semelhantes, indicando que o ácido fítico foi obtido com sucesso das respectivas sementes.

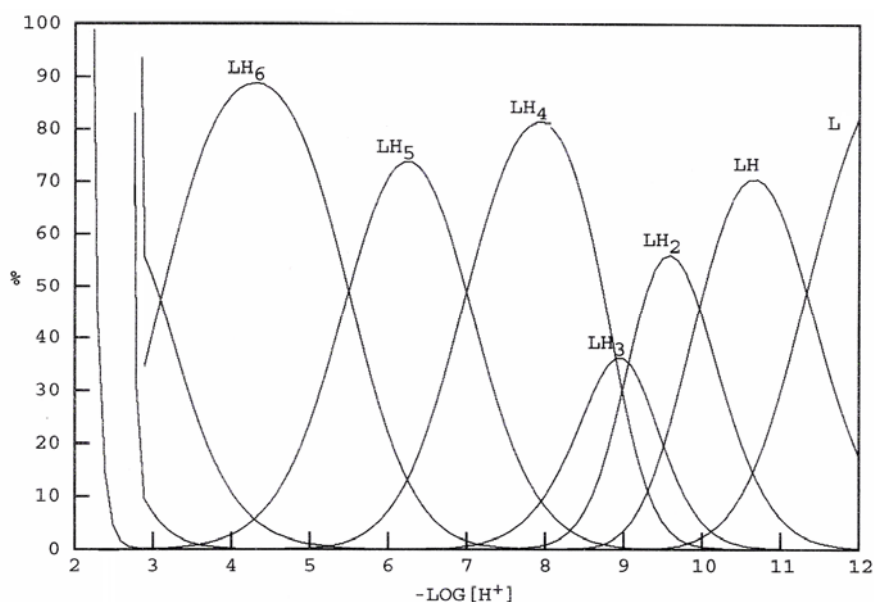


Figura 23. Curvas de distribuição das espécies em função do p[H] para o sistema contendo 0,1 mmol de ácido fítico de melão, $\mu = 0,10 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaCl}$, a $25 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ e atmosfera de argônio.

As semelhanças entre as curvas de titulação potenciométricas das amostras com a do padrão, bem como entre as curvas de distribuição das espécies e os valores das constantes de protonação, indicam que o ácido fítico encontra-se presente em solução e que suas propriedades ácido-básicas foram mantidas para as diferentes amostras.

5.8 ESTUDOS ESPECTROSCÓPICOS DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

Os estudos espectroscópicos de absorção na região do Ultravioleta-Visível foram realizados para caracterizar o ácido fítico obtido das diferentes sementes quanto ao seu potencial quelante frente ao íon metálico Fe(III) em solução aquosa.

A partir da curva de distribuição das espécies obtida por Quirrenbach et al. (2009) através de estudos potenciométricos para o sistema ácido-fítico-Fe(III), as espécies predominantes em valores de pH mais próximos ao do intestino delgado foram sintetizadas em solução aquosa e seu comportamento espectroscópico avaliado. As espécies $[\text{MH}_5\text{L}]^{4-}$, $[\text{MH}_4\text{L}]^{5-}$, $[\text{MH}_3\text{L}]^{6-}$ e $[\text{MH}_2\text{L}]^{7-}$ foram sintetizadas para cada amostra, ajustando-se o pH do meio reacional para 4,3; 6,0; 7,3 e 8,6, respectivamente.

Os espectros de Uv-Vis para os sistemas contendo ácido fítico na forma de sal de dodecassódio e aquele obtido das sementes de melão, em ausência e presença do íon metálico Fe(III), estão representados nas Figuras 24 e 25, respectivamente.

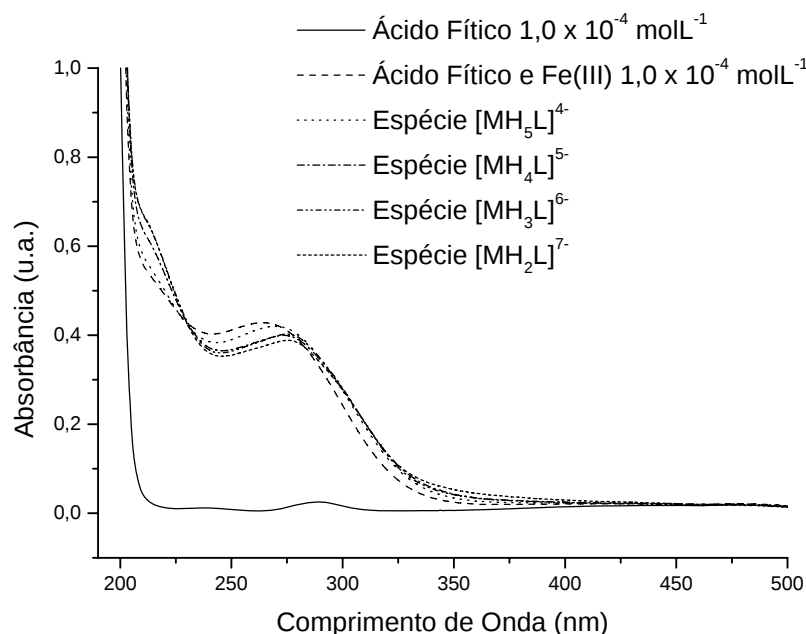


Figura 24. Espectro de UV-Vis do complexo ácido fítico - Fe(III), sal de dodecassódio, a $36 \pm 0,1$ °C, força iônica $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, atmosfera de argônio.

Observa-se na Figura 24 que o ácido fítico livre não absorve na região do Uv-Vis. À medida que se eleva o pH, o ligante torna-se mais deprotonado, aumentando os sítios de coordenação livres do ligante, favorecendo assim a complexação com o íon Fe(III).

Quirrenbach et al. (2009) observou para o sistema ácido fítico-Fe(III) a formação de duas bandas de absorção em 218 e 274 nm, referente à transferência de elétrons do ligante para o metal. A banda larga em 274 nm para o complexo ácido fítico-Fe(III) corresponde à frequência de 36.496 cm^{-1} , o que equivale à energia de 436 kJ mol^{-1} . Este elevado valor de energia sugere que a interação entre o ligante e o íon metálico é efetiva, o que equivale a uma ligação coordenativa.

Para o complexo ácido fítico Fe(III), sal de dodecassódio (Figura 24), observa-se a formação de uma banda de absorção na região de comprimento de onda de 265 nm, referente à transferência de elétrons do ligante para o metal. A banda de absorção é

mantida com leves deslocamentos para as espécies $[\text{MH}_5\text{L}]^{4-}$, $[\text{MH}_4\text{L}]^{5-}$, $[\text{MH}_3\text{L}]^{6-}$ e $[\text{MH}_2\text{L}]^{7-}$, formadas pelo aumento do pH no meio reacional, revelando a interação do ácido fítico com o íon metálico Fe(III). A banda larga em 265 nm para o complexo corresponde à frequência de $37735,85 \text{ cm}^{-1}$, o que equivale à energia de ligação de $450,85 \text{ kJ mol}^{-1}$. Este elevado valor de energia está de acordo com o valor observado por Quirrenbach et al. (2009) para o ácido fítico dipotássico, e equivale a uma ligação coordenativa, sugerindo que a interação entre o ácido fítico dodecassódico e o íon Fe(III) também foi efetiva.

A Figura 25 representa o espectro obtido para o complexo ácido fítico-Fe(III), obtido de sementes de melão. Nota-se que o comportamento do ácido fítico de melão foi semelhante ao padrão, com formação da banda de absorção em 266 nm.

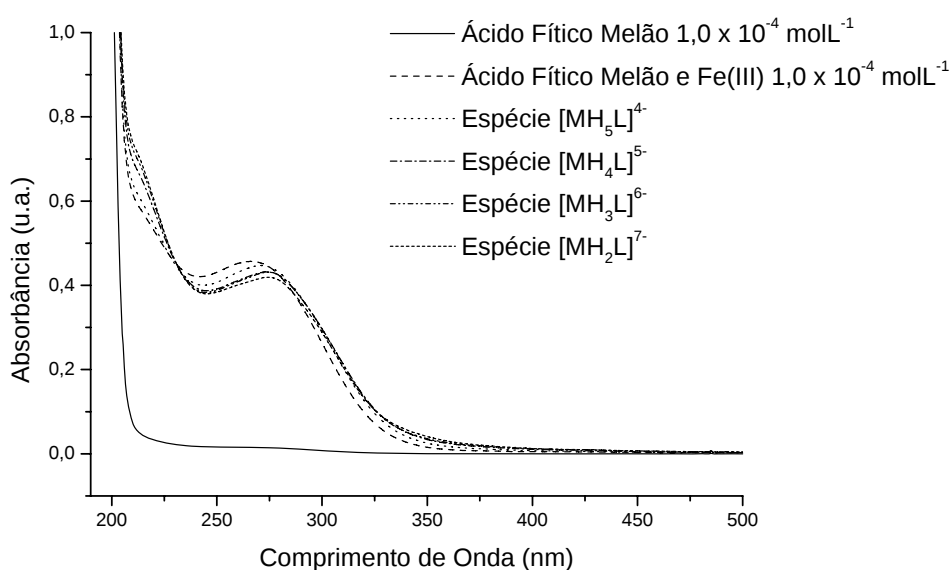


Figura 25. Espectro de UV-Vis do complexo ácido fítico - Fe(III), obtido de sementes de melão, a $36 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, força iônica $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaCl, atmosfera de argônio.

Os espectros de absorção para os complexos ácido fítico Fe(III), obtidos de sementes de abóbora, melancia e mamão foram semelhantes, com máximos de absorção em 266,

266 e 259 nm, respectivamente. Os valores de frequência, bem como os valores de energia de ligação para os complexos de ácido fítico obtido de sementes de abóbora, mamão, melancia e melão podem ser observados na Tabela 08.

Tabela 08. Valores de frequência e energias de ligação para os complexos formados pelo ácido fítico padrão dodecassódico e ácido fítico obtido das diferentes sementes com o íon metálico Fe(III).

Amostra	Comprimento de Onda (nm)	Frequência (cm ⁻¹)	Energia de Ligação (kJ mol ⁻¹)
Padrão	265	37735,85	450,85
Abóbora	266	37593,98	449,15
Mamão	259	38610,04	461,29
Melancia	266	37593,98	449,15
Melão	266	37593,98	449,15

Os elevados valores de energia de ligação estão de acordo com Quirrenbach et al. (2009) e equivalem à ligações coordenativas, sugerindo que a interação entre o ácido fítico obtido de todas as sementes e o íon metálico foi efetiva. O ácido fítico obtido das sementes de abóbora, melancia e melão, todas da mesma família, apresentou a mesma força de interação com o íon metálico, o que pode ser visualizado pelos valores de energia de ligação. Também, pode-se concluir que, apesar do menor rendimento obtido para o ácido fítico de mamão e da menor quantidade deste componente na semente, a afinidade entre o ácido fítico e o íon Fe(III) foi maior, visto que apresenta um valor de energia de interação mais elevado.

Os estudos espectroscópicos na região do Ultravioleta-Visível revelaram que o ácido fítico obtido das diferentes sementes apresenta potencial quelante, frente ao íon metálico Fe(III), semelhante ao do ácido fítico padrão.

As técnicas de cromatografia em camada delgada, infravermelho, potenciometria e ultravioleta-visível, utilizadas para caracterizar as amostras de ácido fítico, revelaram que

os procedimentos adotados para sua extração e purificação a partir das diferentes sementes foram eficientes, e que o produto final obtido encontrou-se altamente purificado.

5.9 ENSAIOS DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ÁCIDO FÍTICO

5.9.1 Mecanismo de Ação Antioxidante do Ácido Fítico

Os compostos podem exercer sua ação antioxidante ligando-se competitivamente ao oxigênio, retardando a etapa de iniciação, interrompendo a etapa de propagação pela destruição ou pela ligação dos radicais livres, inibindo os catalisadores ou estabilizando os hidroperóxidos.

Os antioxidantes primários são doadores de hidrogênio que inibem ou estabilizam os radicais livres, e compreendem os antioxidantes sintéticos BHA, BHT, TBHQ, galatos e tocoferóis.

Antioxidantes secundários reduzem a velocidade de oxidação por diferentes maneiras, porém não convertem radicais livres em compostos mais estáveis. Estes antioxidantes são capazes de quelar metais pró-oxidantes e desativá-los, doar átomos de hidrogênio a antioxidantes primários, decompor hidroperóxidos em espécies não radicais, desativar o oxigênio singlete, absorver radiação ultravioleta ou agir como supressores de oxigênio. Estes compostos são comumente chamados de agentes sinérgicos porque, por si só, apresentam pequeno efeito na oxidação da gordura, mas reforçam ou prolongam a ação antioxidante dos antioxidantes primários. Podem ser compostos orgânicos ou inorgânicos e geralmente apresentam caráter ácido. Os sinérgicos incluem ácidos cítrico, fosfórico e ascórbico, e fosfatídeos (OETTERER; REGITANO-d'-ARCE; SPOTO, 2006). Dentro desta classificação pode-se enquadrar o ácido fítico.

Agentes quelantes reduzem o efeito pró-oxidante de metais, reduzindo seu potencial redox e estabilizando-os em sua forma oxidada. O ácido cítrico, o ácido fosfórico (e seus derivados polifosfatos) e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) são exemplos de agentes quelantes de metais. A capacidade quelante dos oligofosfatos aumenta com o número de grupamentos fosfato até um máximo de seis (OETTERER; REGITANO-d'-ARCE; SPOTO, 2006).

Dentre os agentes sinérgicos, o ácido fítico apresenta potencial antioxidante em virtude da formação de quelatos estáveis com ferro, suprimindo as reações oxidativas catalisadas pelo metal. Quirrenbach et al. (2009) constataram que o ácido fítico interage fortemente com os íons metálicos Fe(II) e Fe(III) tanto em solução quanto no estado sólido, o que pode prevenir processos oxidativos catalisados por este metal, visto que o ácido fítico atua como um antioxidante natural. Todavia, apesar da forte interação entre o ácido fítico e os íons metálicos Fe(II) e Fe(III), espera-se que a capacidade antioxidante do ácido fítico seja menor que aquela apresentada pelo EDTA, por exemplo, o que pode ser evidenciado pelos valores elevados das constantes de formação dos complexos EDTA-Fe(III) (MARTELL; SMITH, 1974), comparativamente às constantes de formação dos complexos ácido fítico-Fe(III) (QUIRRENBACH et al., 2009). Segundo Martell e Smith (1974), a constante de formação para a espécie ML é 25,1, enquanto a espécie $[ML]^{9-}$ do ácido fítico apresenta constante de 18,87 (QUIRRENBACH et al., 2009). O maior valor da constante de formação para a espécie totalmente deprotonada do EDTA sugere uma interação mais efetiva com o íon metálico, resultando em uma capacidade antioxidante mais pronunciada.

Reações oxidativas catalisadas pelo ferro frequentemente envolvem ativação do oxigênio e subsequente reação com o ferro, gerando espécies mais reativas, como o radical hidroxila. Em presença do ácido fítico, o ferro não encontra-se tão disponível, o

que pode explicar a produção bloqueada de radicais hidroxila e a redução da peroxidação lipídica (GRAF; EMPSON; EATON, 1987). Este efeito é devido à ocupação dos seis sítios de coordenação do ferro, resultando em quelatos ferro-fitado solúveis e suprimindo as reações oxidativas catalisadas por este metal (GRAF; EMPSON; EATON, 1987; GRAF; EATON, 1990).

O ácido fítico, obtido neste trabalho de sementes de abóbora, melancia, melão e mamão, bem como o ácido fítico padrão na forma de sal de dodecassódio, apresentou potencial quelante frente ao íon metálico Fe(III), conforme revelaram os estudos espectroscópicos de absorção na região do ultravioleta-visível (Figuras 24 e 25, pág. 120 e 121, respectivamente). Desta forma, o ácido fítico, com seis grupamentos fosfato, apresenta potencial antioxidante por manter o ferro em sua forma mais oxidada, Fe^{3+} , o que implica em uma pronunciada função antioxidante na preservação de alimentos.

5.9.2 Ensaio do Potencial Antioxidante pelo Método de FRAP

Por apresentar em sua molécula doze átomos de hidrogênio substituíveis, o ácido fítico apresenta elevado potencial quelante, o que confere a este ligante a propriedade antioxidante. O mecanismo pelo qual o ácido fítico apresenta atividade antioxidante é pela complexação de íons metálicos, como Fe(III) e Cu(II), que catalisam a oxidação lipídica, e não pelo consumo de radicais livres ou doação de elétrons para o emparelhamento dos mesmos em radicais reativos. A ausência de uma estrutura de anel conjugado e grupos hidroxila impossibilita o ácido fítico de doar elétrons para outras moléculas, uma vez que sua estrutura não favorece a deslocalização de elétrons.

O método de FRAP está baseado no princípio de que o complexo sem cor Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazeno) é reduzido a um complexo azul Fe^{2+} -TPTZ pela ação

de antioxidantes com aumento na absorbância em 593 nm. Porém, como mostrou o estudo realizado por Quirrenbach et al. (2009), o ácido fítico interage melhor com o íon Fe(III) do que com o íon Fe(II), desta forma, o ligante complexa com o íon metálico Fe(III) não fornecendo elétrons para a sua redução. Visualmente, o efeito observado é a precipitação do reagente de FRAP pela adição de ácido fítico ou a não mudança de coloração da solução, indicando que não houve redução do Fe(III). Pode-se concluir que o ácido fítico não responde ao ensaio de FRAP devido ao seu mecanismo secundário de ação antioxidante.

5.9.3 Ensaio da Capacidade Consumidora de Radicais DPPH

O ensaio da capacidade consumidora de radicais DPPH foi realizado com as soluções das amostras cristalizadas de ácido fítico, a fim de evitar a alteração do pH do meio. Sabe-se que a absorção do radical DPPH em 517 nm é independente do pH na faixa de pH de 5,0-6,5 (BLOIS, 1958). Desta forma, a alteração de pH provocada pela adição das soluções concentradas de ácido fítico para as diferentes amostras poderia alterar os resultados do ensaio de DPPH.

O ácido fítico, padrão ou obtido experimentalmente, não respondeu ao ensaio do radical DPPH, visto que a forma deste composto atuar como antioxidante é pela complexação de íons metálicos que catalisam a oxidação lipídica, e não pela captura de radicais livres, o que está de acordo com os resultados observados por Filgueiras et al. (2009).

O teste foi importante ainda para mostrar que o ácido fítico não é um substrato oxidável, pois o radical livre DPPH não foi capaz de oxidá-lo. O ácido fítico é estável à oxidação lipídica, o que pode ser interessante para sua utilização como aditivo seguro em

alimentos. Estes resultados implicam em uma alternativa de antioxidante natural com potencial de aplicação em diversos produtos nos quais atualmente são adicionados exclusivamente antioxidantes sintéticos.

6 CONCLUSÕES

O ácido fítico foi extraído das sementes de abóbora, melancia, melão e mamão com uma solução de HCl $0,65 \text{ mol L}^{-1}$ durante uma hora de agitação a temperatura ambiente.

O extrato bruto foi purificado em resina de troca aniônica fraca DOWEX MWA-1 livre de base, na forma de Cl^- , de 35 a 75 mesh e a eluição da coluna cromatográfica foi realizada com soluções de HCl.

O ácido fítico foi detectado espectrofotometricamente na fração eluída com HCl $0,70 \text{ mol L}^{-1}$, sendo que a melancia apresentou o maior conteúdo de ácido fítico em solução, e a abóbora o maior conteúdo na semente.

Os procedimentos de extração e purificação adotados resultaram em soluções estáveis com densidades e grau de pureza comparável ao disponível comercialmente.

Os conteúdos de fósforo determinado para as amostras foram semelhantes entre si e próximos à quantidade de fósforo encontrada para o padrão.

A cromatografia em camada delgada revelou que os procedimentos de extração e purificação não liberaram fosfato da molécula de ácido fítico, e o hexafosfato de inositol foi o principal componente obtido a partir das diferentes sementes.

A presença de picos característicos nos espectros de infravermelho, com pequenos deslocamentos nas frequências em relação ao padrão, caracterizou as amostras.

As curvas de titulação potenciométrica, bem como os valores das constantes de protonação, foram semelhantes ao padrão, o que confirma as propriedades ácido-básicas do ácido fítico.

Os estudos espectroscópicos no Uv-Vis revelaram que o ácido fítico obtido das fontes alternativas apresenta potencial quelante, frente ao íon metálico Fe(III) , e que a interação entre o ligante e o íon metálico foi efetiva.

O ácido fítico apresenta potencial antioxidante em virtude da formação de quelatos estáveis com ferro. Desta forma, o ácido fítico apresenta uma pronunciada função antioxidante na preservação de alimentos.

Devido ao mecanismo secundário de ação antioxidante, o ácido fítico não respondeu aos ensaios de FRAP ou DPPH. O teste do DPPH revelou ainda que o ácido fítico não é um substrato oxidável, o que pode ser interessante para sua utilização como aditivo seguro em alimentos.

Este trabalho revelou novas fontes de obtenção do ácido fítico. As sementes de abóbora, melancia e melão, frutas da família *Cucurbitaceae*, se mostraram fontes ricas em ácido fítico, e as sementes de mamão representam uma nova fonte de obtenção deste composto.

Os procedimentos propostos podem representar uma via alternativa para obtenção do ácido fítico. Estes se mostraram rápidos e reprodutíveis, e podem ser facilmente aplicados pelas indústrias, pois além de utilizar resíduos como matéria-prima, requerem materiais e reagentes simples e de baixo custo. O produto final pode ser obtido como solução ou ácido fítico no estado sólido com elevado grau de pureza e alto rendimento.

7 REFERÊNCIAS

AHN, H. J.; KIM, J. H.; JO, C.; KIM, M. J.; BYUN, M. W. Comparison of irradiated phytic acid and other antioxidants for antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 88, p. 173-178, 2004.

AHN, H. J.; KIM, J. H.; YOOK, H. S.; BYUN, M. W. Irradiation effects on free radical scavenging and antioxidant activity of phytic acid. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 7, p. 2221-2224, 2003.

ANGYAL, S. J.; RUSSEL, A. F. Methyl esters of inositol phosphates. The structure of phytic acid. **Australian Journal of Chemistry**, v. 22, p. 383-390, 1969.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists: **The Journal of AOAC INTERNATIONAL** 69, 667, 1986; Method 986.11, final action 1988.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos de tecnologia de alimentos**. v. 3. São Paulo: Atheneu Editora, 1998, p. 167-171.

BEBOT-BRIGAUD, A.; DANGE, C.; FAUCONNIER, N.; GÉRARD, C. ^{31}P NMR, potentiometric and spectrophotometric studies of phytic acid ionization and complexation properties toward Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Cd^{2+} . **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 75, p. 71-78, 1999.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/ antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 15-27, 1999.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 292, p. 70-76, 1996.

BENZIE, I. F. F.; SZETO, Y. T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 633-636, 1999.

BERETTA, G.; GRANATA, P.; FERRERO, M.; ORIOLI, M.; FACINO, R. M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric/fluorimetric assays and chemometrics. **Analytica Chimica Acta**, v. 533, p. 185-191, 2005.

BERTONCELJ, J.; DOBERSEK, U.; JAMNIK, M.; GOLOB, T. Evaluation of the phenolic content, antioxidant activity and colour of Slovenian honey. **Food Chemistry**, v. 105, p. 822-828, 2007.

BLOIS, M.S. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961. **Dispõe sobre Normas Técnicas Especiais Reguladoras do Emprego de Aditivos Químicos a Alimentos**, Brasília, DF, de 3 de setembro de 1954. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 de agosto de 2008.

CARLI, L. Síntese, caracterização e estudo da interação e do comportamento térmico dos complexos de ácido fítico com os metais de transição Mn(II), Co(II) e Ni(II). 2005. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil.

CARVALHO, P. R. Aditivos dos alimentos. **Revista LOGOS**, n. 12, p. 57-69, 2005.

CHAMPAGNE, E. T.; HINOJOSA, O. Independent and mutual interactions of copper(II) and zinc(II) ions with phytic acid. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 30, p. 15-33, 1987.

CHEN, Y.; CHEN, J.; LUO, Z.; MA, K.; CHEN, X. Synchronous fluorescence analysis of phytate in food. **Microchimica Acta**, v. 164, p. 35-40, 2009.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997, p. 59-93.

CREA, F.; DE STEFANO, C.; MILEA, D.; SAMMARTANO, S. Formation and stability of phytate complexes in solution. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, p. 1108-1120, 2008.

CÚNEO, F.; AMAYA-FARFAN, J.; CARRARO, F. Distribuição dos fitatos em farelo de arroz estabilizado e tratado com fitase exógena. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 94-98, 2000.

DE CARLI, L.; ROSSO, N. D.; SCHNITZLER, E.; CARNEIRO, P. I. B. Estudo da Estabilidade do Complexo Ácido Fítico e o Íon Ni(II). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 19-26, 2006.

DE STEFANO, C.; MILEA, D.; SAMMARTANO, S. Speciation of phytate ion in aqueous solution. Protonation constants in tetraethylammonium iodide and sodium chloride. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 48, n. 1, p. 114-119, 2003.

DE STEFANO, C.; MILEA, D.; SAMMARTANO, S. Speciation of phytate ion in aqueous solution thermodynamic parameters for protonation in NaCl. **Thermochimica Acta**, v. 423, p. 63-69, 2004.

DeGRAFT-JOHNSON, J.; KOLODZIEJCZYK, K.; KROL, M.; NOWAK, P.; KROL, B.; NOWAK, D. Ferric-reducing ability power of selected plant polyphenols and their metabolites: implications for clinical studies on the antioxidant effects of fruits and vegetable consumption. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 100, p. 345-352, 2007.

EL-ADAWY, T.; TAHA, K. M. Characteristics and composition of different seed oils and flours. **Food Chemistry**, v. 74, p. 47-54, 2001.

ENUJIUGHA, V. N.; AYODELE-ONI, O. Evaluation of nutrients and some anti-nutrients in lesser-know, underutilized oilseeds. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 38, p. 525-528, 2003.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, p. 277-285, 2004.

FERRÃO, J. E. M. **Fruticultura tropical. Espécies com frutos comestíveis**. v. 1. Lisboa: Instituto de Investigação Científica Tropical; Missão de Macau em Lisboa, 1999, p. 328-339, 401-405, 486-487, 494-496.

FILGUEIRAS, C. T.; SOARES, A. L.; SHIMOKOMAKI, M.; IDA, E. I.; CASAGRANDE, R. Avaliação da atividade antioxidante do ácido fítico de germe de milho. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1787-1791, 2009.

GIAMI, S. Y. Effect of fermentation on the seed proteins, nitrogenous constituents, antinutrients and nutritional quality of fluted pumpkin (*Telfairia occidentalis* Hook). **Food Chemistry**, v. 88, p. 397-404, 2004.

GRAF, E.; EATON, J. W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 8, p. 61-69, 1990.

GRAF, E.; EMPSON, K. L.; EATON, J. W. Phytic acid a natural antioxidant. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 24, p. 11647-11650, 1987.

HALL, J. R.; HODGES, T. K. Phosphorus metabolism of germinating oat seeds. **Plant Physiology**, v. 41, p. 1459-1464, 1966.

HARLAND, B. F.; OBERLEAS, D. A modified method for phytate analysis using an ion-exchange procedure: application to textured vegetable proteins. **Cereal Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 827-832, 1977.

HARLAND, B. F.; OBERLEAS, D. Anion-exchange method for determination of phytate in foods: collaborative study. **Journal-Association of Official Analytical Chemists**, v. 69, n. 4, p. 667-670, 1986.

HIROSE, M.; HOSHIYA, T.; AKAGI, K.; FUTAKUCHI, M.; ITO, N. Inhibition of mammary gland carcinogenesis by green tea catechins and other naturally occurring antioxidants in female Sprague-Dawley rats pretreated with 7,12-dimethylbenz[α]anthracene. **Cancer Letters**, v. 83, p. 149-156, 1994.

HORWITZ, W. Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL. v. 2, ed. 17, Maryland: AOAC INTERNATIONAL, 2000, cap. 45, p. 42-44.

ISBRANDT, L. R.; OERTEL, R. P. Conformational states of myo-inositol hexakis(phosphate) in aqueous solution. A ^{13}C NMR, ^{31}P NMR, and Raman spectroscopic investigation. **American Chemical Society**, v. 102, n. 9, p. 3144-3148, 1980.

JENNINGS, A. C.; MORTON, R. K. Changes in nucleic acids and other phosphorus-containing compounds of developing wheat grain. **Australian Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 2, p. 332-341, 1963.

LATTA, M.; ESKIN, M. A simple and rapid colorimetric method for phytate determination. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, p. 1313-1315, 1980.

LEAL, E. S. Extração, obtenção e caracterização parcial de ácido fítico do germe grosso de milho e aplicação como antioxidante. 2000. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Londrina, Brasil.

LEE, B. J.; HENDRICKS, D. G. Phytic acid protective effect against beef round muscle lipid peroxidation. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 2, p. 241-244, 1995.

LEE, J.D. **Química inorgânica não tão concisa**. 5ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher Ltda., 1999, 527p.

LEHRFELD, J.; MORRIS, E. R. Overestimation of phytic acid in foods by the AOAC anion-exchange method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 2208-2210, 1992.

LIANG, J.; HAN, B.; NOUT, M. J. R.; HAMER, R. J. Effect of soaking and phytase treatment on phytic acid, calcium, iron and zinc in rice fractions. **Food Chemistry**, v. 115, p. 789-794, 2009.

MANICA, I.; MARTINS, D. S.; VENTURA, J. A. **Mamão: tecnologia de produção, pós-colheita, exportação, mercados**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2006, p. 9-18.

MARTELL, A. E.; MOTEKAITIS, R. J. **The determination and use of stability constants**. New York: VCH, 1992, 229 p.

MARTELL, A. E.; SMITH, R. M. **Critical stability constants**. V. 1: Amino acids. New York: Plenum Press, 1974.

MIDORIKAWA, K.; MURATA, M.; OIKAWA, S.; HIRAKU, Y.; KAWANISHI, S. Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 288, n. 3, p. 552-557, 2001.

NAPPI, G. U.; RIBEIRO-CUNHA, M. R.; COELHO, J. V.; JOKL, L. Validação de métodos para determinação dos ácidos fítico e oxálico em multimistura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 4, p. 811-820, 2006.

NSIMBA, R. Y.; KIKUZAKI, H.; KONISHI, Y. Antioxidant activity of various extracts and fractions of *Chenopodium quinoa* and *Amaranthus spp.* seeds. **Food Chemistry**, v. 106, p. 760-766, 2008.

OETTERER, M.; REGITANO-d'-ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Editora Manole, 2006, p. 243-299.

PATON, G.; NOAILLY, M.; MOSSOYAN, J. C. Conformational preferences and intramolecular interactions of myo-inositol hexakisphosphoric acid by ^1H e ^{31}P NMR studies. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 12, p. 401-407, 1999.

PERSSON, H.; TÜRK, M.; NYMAN, M.; SANDBERG, A. Binding of Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Cd^{2+} to inositol tri-, tetra-, penta-, and hexaphosphates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3194-3200, 1998.

PETERSON, D. M. Oat antioxidants. **Journal of Cereal Science**, v. 33, p. 115-129, 2001.

PLAAMI, S. Myoinositol Phosphates: Analysis, Content in Foods and Effects in Nutrition. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 30, p. 633-647, 1997.

POZDNYAKOV, I. P.; PLYUSNIN, V. F.; GRIVIN, V. P.; VOROBYEV, D. Y.; BAZHIN, N. M.; PAGÉS, S.; VAUTHEY, E. Photochemistry of Fe(III) and sulfosalicylic acid aqueous solutions. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 182, p. 75-81, 2006.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

QUIRRENBACH, H. R. Determinação das constantes de estabilidade, síntese e caracterização dos complexos de ácido fítico com os íons Fe(II) e Fe(III). 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil.

QUIRRENBACH, H. R.; KANUMFRE, F.; ROSSO, N. D.; CARVALHO FILHO, M. A. Comportamento do ácido fítico na presença de Fe(II) e Fe(III). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 26-34, 2009.

RAO, P. S.; LIU, X.; DAS, D. K.; WEINSTEIN, G. S.; TYRAS, D. H. Protection of ischemic heart from reperfusion injury by myo-inositol hexaphosphate, a natural antioxidant. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 52, p. 908-912, 1991.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

SCHWARZENBACH, G.; FLASCHKA, H. **Complexometric Titration**. London: Methuen CO., 1969, p. 245-250.

SHAMSUDDIN, A. M.; VUCENIK, I.; COLE, K. E. IP₆: a novel anti-cancer agent. **Life Sciences**, v. 61, n. 4, p. 343-354, 1997.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, 397 p.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007, 490 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2002, 836 p.

THE MERCK INDEX, twelfth edition, 1996, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, N. J., U.S.A.

TORRES, J.; VEIGA, N.; GANCHEFF, J. S.; DOMÍNGUEZ, S.; MEDEROS, A.; SUNDBERG, M.; SÁNCHEZ, A.; CASTIGLIONI, J.; DÍAZ, A.; KREMER, C. Interaction of myo-inositol hexakisphosphate with alkali and alkaline earth metal ions: spectroscopic, potentiometric and theoretical studies. **Journal of Molecular Structure**, v. 874, p. 77-88, 2008.

TSAI, P.; HUANG, H. Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle. **Food Research International**, v. 37, p. 313-318, 2004.

TSAI, P.; McINTOSH, J.; PEARCE, P.; CAMDEN, B.; JORDAN, B. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract. **Food Research International**, v. 35, p. 351-356, 2002.

WADE, H. E.; MORGAN, D. M. Fractionation of phosphates by paper ionophoresis and chromatography. **Biochemical Journal**, v. 60, p. 264-270, 1955.

WHO a. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Disponível em: <whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546123_chap11.pdf>. Acesso em: 06 de outubro de 2009.

WHO b. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Disponível em: <whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546123_chap12.pdf>. Acesso em: 06 de outubro de 2009.

WHO c. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Vitamin and mineral requirements in human nutrition. Disponível em: <whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241546123_chap13.pdf>. Acesso em: 06 de outubro de 2009.

WILLIAMS, S. G. The role of phytic acid in the wheat grain. **Plant Physiology**, v. 45, p. 376-381, 1970.

XI, J.; SHOUQIN, Z. Antioxidant activity of ethanolic extracts of propolis by high hydrostatic pressure extraction. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 42, p. 1350-1356, 2007.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p. 176-186, 2001.

ZARDO, D. M.; DANTAS, A. P.; VANZ, R.; WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Intensidade de pigmentação vermelha em maçãs e sua relação com os teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidativa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 148-154, 2009.