

CENTRO DE ESTATÍSTICA APLICADA – CEA – USP
RELATÓRIO DE CONSULTA

TÍTULO: “Avaliação antioxidante da romã.”

PESQUISADORA: Fernanda Archilla Jardini

ORIENTADOR: Jorge Mancini Filho

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP

FINALIDADE: Mestrado

PARTICIPANTES DA ENTREVISTA: Jorge Mancini Filho

Fernanda Archilla Jardini

Denise Aparecida Botter

Júlia Maria Pavan Soler

Rafael S. Grossn

Adriana Silva de Moura

Afonso Massao Yamaguchi

DATA: 27/04/2004

FINALIDADE DA CONSULTA: Assessoria no processo de análise preliminar dos dados do experimento sobre as propriedades antioxidantes da romã.

RELATÓRIO ELABORADO POR: Adriana Silva de Moura

Afonso Massao Yamaguchi

1. Introdução

Atualmente, no Brasil, há um grande consumo de produtos industrializados, que possuem em sua composição muitos compostos sintéticos. Este fato causa preocupação em relação à composição desses produtos.

Um dos compostos integrantes de produtos industrializados é o antioxidante, que tem a função de evitar que o produto se deteriore, ou seja, que ocorram reações de oxidação nos radicais livres formados a partir dos lipídios encontrados no produto, cujos resultados são compostos prejudiciais à saúde.

A presente pesquisa procura obter formas alternativas de conservantes, oriundas de produtos naturais, pois os convencionalmente utilizados, por serem sintéticos, possuem restrição à sua utilização e, em grandes quantidades, podem prejudicar a saúde. Entre os produtos naturais que poderiam ser utilizados como conservantes destaca-se um derivado de extrato de romã.

O experimento laboratorial, atualmente em fase de coleta de dados, tem como objetivo verificar qual o desempenho do conservante à base de romã em relação aos conservantes sintéticos.

Para se realizar as análises estatísticas dos dados, que visa comparar o conservante à base de romã com o sintético, é que se procurou o auxílio do Centro de Estatística Aplicada (CEA).

2. Descrição do Experimento

O experimento laboratorial iniciou-se com a separação da polpa e da semente da romã e com a transformação de cada uma em um extrato desidratado e moído. Posteriormente, os extratos foram diluídos em diferentes solventes (água destilada, álcool etílico e éter etílico) de forma apropriada.

A oxidação é avaliada sobre um composto de β -caroteno e ácido linoléico, em meio aquoso. A avaliação é realizada com apenas esse composto e com combinações entre ele, o conservante sintético BHT e o extrato de romã. O conservante sintético

BHT será usado como padrão de controle, devido ao largo uso industrial e por suas características serem bem conhecidas.

Cada um dos antioxidantes estudados foi avaliado em diferentes volumes, temos uma quantidade fixa de composto de β -caroteno e ácido linoléico, mais uma quantidade variável (50, 100 ou 200 ml) de conservante BHT, ou de extrato de romã ou de ambos.

O experimento é realizado em dois dias, sendo que no primeiro dia há a preparação do extrato de romã para os dois dias. Em cada dia ocorre a preparação do composto de β -caroteno para uso neste mesmo dia e são realizadas, em cada um dos dias, três repetições do experimento para cada combinação de antioxidante e volume.

Como o processo de oxidação é lento optou-se por manter uma temperatura controlada em 50° C que acelera este processo.

O experimento *in vitro* consiste em se observar a mudança de cor, em comparação a uma escala padrão, do composto de β -caroteno e ácido linoléico, com ou sem conservantes, a cada 15 minutos, no intervalo de 120 minutos.

Este protocolo experimental pode ser considerado dentro da classe dos planejamentos completamente casualizados, com quatro fatores fixos e um fator hierárquico.

3. Descrição das Variáveis

As variáveis analisadas no experimento podem ser classificadas em dois grupos: variável resposta e variáveis explicativas.

A variável que é mensurada no experimento é a mudança de cor no composto em observação. Esta medida não é utilizada diretamente, pois o composto de β -caroteno e ácido linoléico não é feito todo ao mesmo tempo, e sim conforme a necessidade de uso, o que torna possível a existência de diferenças entre os compostos utilizados em cada uma dos ensaios experimentais. Para resolver este possível problema optou-se por resumir e padronizar os valores medidos em cada um dos ensaios. Para tanto, em cada um dos compostos utilizados, subtraiu-se o valor da primeira medida do valor da última medida, padronizando-se essa diferença pela

diferença entre a primeira medida da última medida do composto de β -caroteno e ácido linoléico sem conservante. Este resultado é a porcentagem de oxidação, que subtraímos da unidade, finalmente nos dando a porcentagem de inibição, que será utilizada neste estudo como sendo a variável resposta.

As variáveis explicativas ou fatores serão:

- Extrato: 2 níveis (1-polpa; 2-semente);
- Solvente: 3 níveis (1-éter; 2-álcool; 3-água);
- Antioxidante: 3 níveis (1-BHT; 2-Extrato; 3-BHT+Extrato);
- Volume: volume total de conservante na solução, 3 níveis (1-50ul; 2-100ul; 3-200ul);
- Dia: dia de realização do experimento, 2 níveis (1-primeiro dia; 2-segundo dia).

Observa-se que os compostos antioxidantes que combinam o BHT e o Extrato de Polpa de romã estarão sempre em iguais proporções.

Como os dados foram parcialmente coletados, temos apenas dois fatores disponíveis para análise o Antioxidante e o Volume.

4. Situação do Projeto

O projeto encontra-se em fase de coleta de dados experimentais. Estima-se que todos os ensaios de laboratório estarão terminados até o começo do mês de agosto de 2004.

5. Análise Estatística Preliminar

A análise estatística preliminar será realizada com apenas uma parte das informações do experimento. Não estaremos analisando o efeito de extrato e solvente, os quais foram fixados respectivamente nos níveis de polpa e álcool etílico.

A análise descritiva foi realizada através de gráficos de perfis de médias e de medidas resumo. A análise dos gráficos 1 e 2, do Apêndice, nos revelam que o

composto branco possui uma queda exponencial em seus valores de cor. Sendo que o adicionamento de algum tipo de antioxidante reduz acentuadamente essa queda tornando-a, aparentemente, linear.

O Gráfico 3, do Apêndice, apresenta a variação da média da variável resposta cor de acordo com as combinações dos fatores Antioxidante e Volume em relação ao fator Dia. Visualizamos que o dia pode ter um efeito importante na explicação da inibição da oxidação, uma vez que há indicação de um possível efeito de interação entre o dia e o volume dentro de antioxidante. Os resultados apresentados na Tabela 1, do Apêndice, parecem evidenciar esse comportamento, pois os valores da porcentagem de inibição para o BHT no primeiro dia são maiores que no segundo, porém isto não se repete para os valores de inibição dos outros antioxidantes, Extrato de romã e BHT + o Extrato de romã.

A comparação descritiva entre as medições da cor dos dias 1 e 2, apresentada no Gráfico 4, do Apêndice, do composto branco, indica que há diferença entre os valores obtidos entre os dias. Observamos que mesmo que o valor de estabilidade final seja o mesmo, o valor inicial é diferente, e como os dois grupos de valores chegam ao mesmo tempo na estabilidade, podemos dizer que a queda dos valores no dia 1 é mais rápida que no dia 2. Os valores do dia 1 começam maiores que os valores do dia 2.

Considerando o BHT nas triplicações (Gráfico 5), temos que todos os valores do dia 2 são superiores aos valores do dia 1, indicando, mais uma vez, existir diferença entre os dias. Adicionalmente, visualizamos que os valores do dia 2 caem com maior velocidade que os valores do dia 1.

Na análise inferencial dos dados deste experimento foi aplicada a técnica de análise de variância clássica, utilizando-se o programa SAS V8.0 e Minitab R13.

Optou-se por um modelo mais simples, sem o fator Dia, pois os protocolos adotados na realização do experimento pressupõem que não há diferenças entre as medições realizadas entre os dias.

O modelo adotado neste caso foi:

$$Y_{ijk} = \mu + \beta_i + \gamma_j(i) + e_{ijk}$$

Sendo:

Y_{ijk} : Porcentagem de inibição observada para o i-ésimo nível do fator Antioxidante, j-ésimo nível do fator Volume dentro do i-ésimo nível do fator Antioxidante e k-ésima unidade experimental;

μ : Porcentagem de inibição média, quando não existe efeito dos fatores;

β_i : efeito principal para o i-ésimo nível do fator Antioxidante;

$\gamma_j(i)$: efeito principal para o j-ésimo nível do fator Volume dentro do i-ésimo nível do fator Antioxidante;

e_{ijk} : erro $\sim N(0, \sigma^2)$;

i, j, k = 1 a 3.

Considerando o ajuste do modelo linear descrito anteriormente, concluímos através dos resultados da Tabela 2, que existe um efeito significativo ($p < 0,0001$) para os efeitos dos fatores Antioxidante e Volume dentro de Antioxidante.

Os resíduos do modelo ajustado não contradizem as hipóteses de erros com distribuição normal e com variância constante, Gráfico 7, apesar de alguns dos pontos terem um comportamento atípico.

Utilizamos um teste de Tukey para comparar os diferentes níveis do fator Antioxidante, cujo resultado que pode ser visto na Tabela 3, constata-se que existem diferenças significativas do nível 2 (Extrato de romã) de Antioxidante para os níveis 1 (BHT) e 3 (BHT + Extrato), ao nível de significância de 5%. Dado o mesmo nível de 5% de significância, podemos dizer que não temos evidências de diferença entre os níveis 1 e 3 do fator Antioxidante. Concluímos então que tanto o antioxidante BHT como o BHT mais o extrato de romã não possuem capacidade antioxidante diferentes e são superiores, ou seja, tem maior capacidade antioxidante que o extrato de romã puro.

Utilizamos um teste de Tukey para comparar os diferentes níveis do fator Volume dentro de Antioxidante, cujo resultado pode ser visto na Tabela 4. Concluímos que, para todos os antioxidantes, fixando-se o fator antioxidante e comparando os níveis de volume dentro desse antioxidante, o menor deles possui um efeito menor que os demais, que não possuem diferenças significativas, a 5% de significância, no efeito de inibição da oxidação.

6. Conclusão e Sugestões

Apesar da análise descritiva sugerir um efeito de dia nos valores medidos optamos por ignorar esse efeito e trabalhar apenas com os fatores Antioxidante e Volume, que são de interesse no estudo. Neste caso aumenta-se o número de réplicas na análise estatística (graus de liberdade do resíduo) e, possivelmente, aumenta-se também a soma de quadrados residual devido à fonte de variabilidade Dia.

A análise nos mostrou que o antioxidante artificial BHT é mais eficiente que o extrato de romã, porém a combinação de BHT e romã é equivalente ao antioxidante BHT puro. Na prática, este resultado, permite que o conservante sintético comumente utilizado (BHT), seja substituído, por uma combinação deste com o extrato de romã, o qual, por reduzir a quantidade do sintético apresenta um menor risco à saúde. Ainda que, se compararmos os volumes dentro de um nível de antioxidante qualquer, o menor volume apresenta efeito menor que os demais que não apresentaram diferenças significativas no efeito de inibição da oxidação.

Sugerimos que o projeto em questão seja encaminhado para análise completa no CEA no próximo semestre, ou quando houver disponibilidade total dos dados.

Bibliografia:

Andrade, D.F. e Singer, J.M. (1986). **Análise de Dados Longitudinais**. São Paulo: Associação Brasileira de Estatística (7o. Simpósio Nacional de Probabilidade e Estatística).

Neter, J., Kutner, M.H., Nachtsheim, C.J. e Wasserman, W. (1996). **Applied Linear Statistical Models**. 3ed. Boston: WCB MacGraw-Hill.

Anexo – Gráficos e Tabelas

Gráfico 1: Perfis médios para as medidas de cor do Dia 1

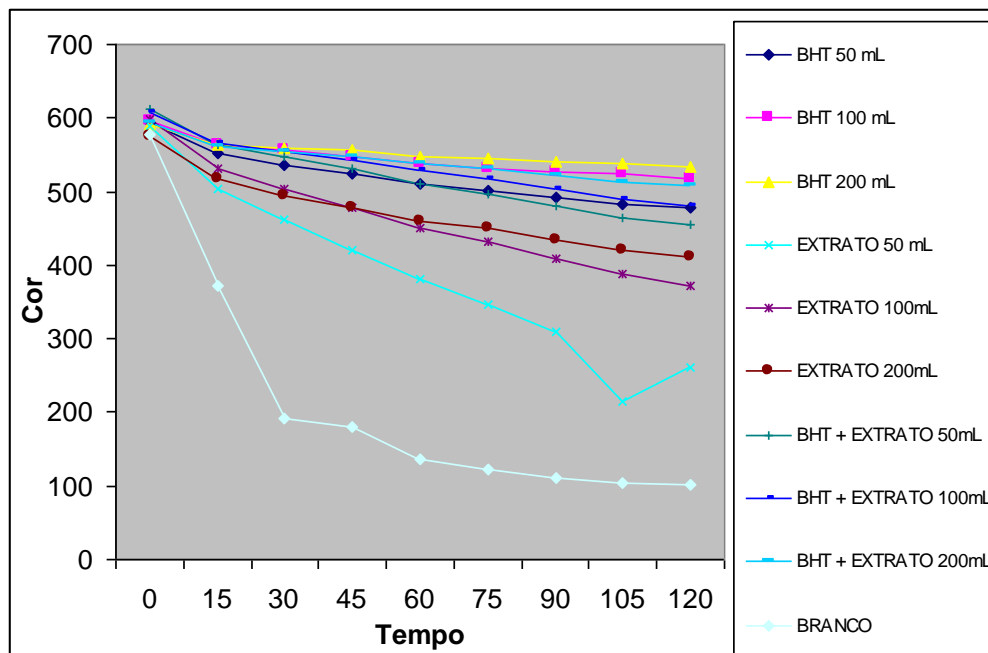


Gráfico 2: Perfis médios para as medidas de cor do Dia 2

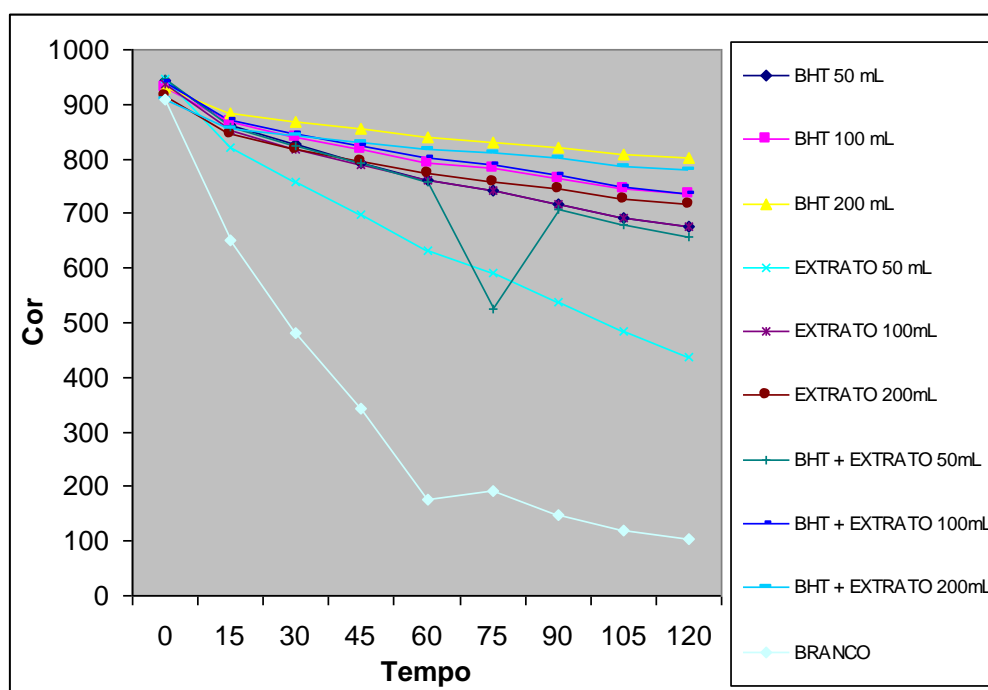


Gráfico 3: Gráfico de interação entre Dia e Antioxidante x Volume

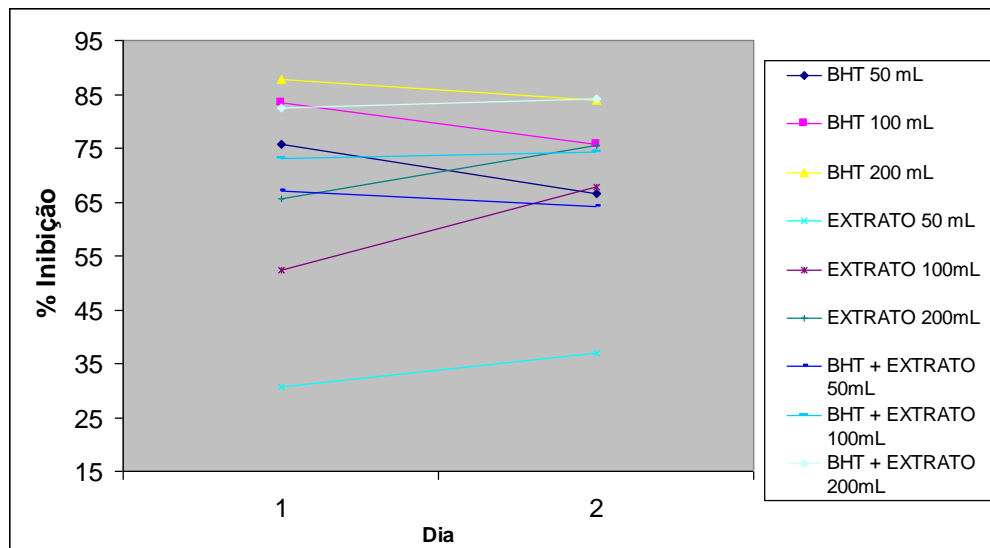
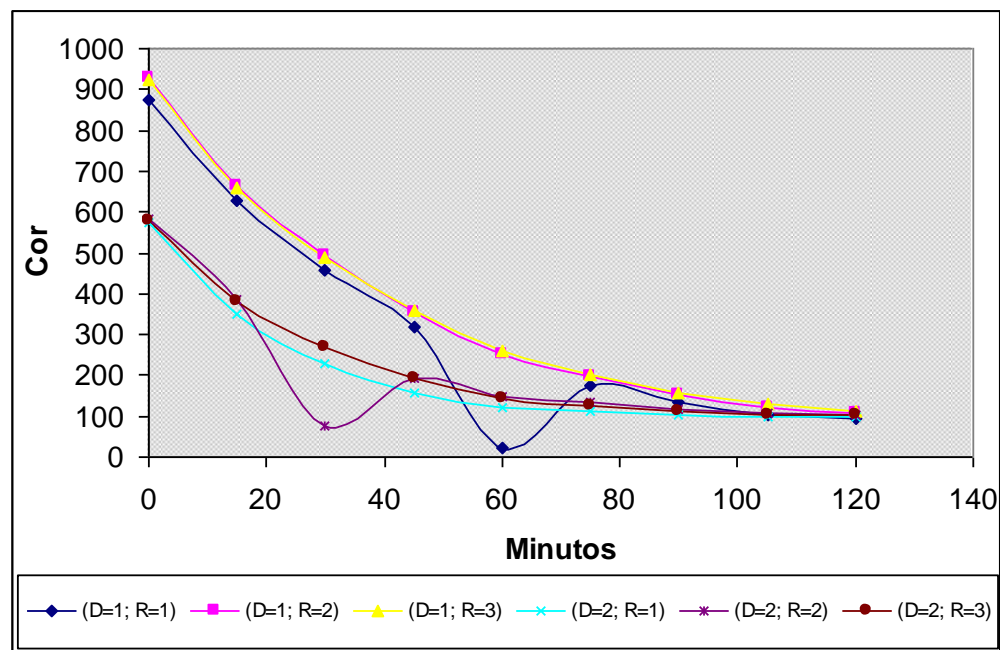
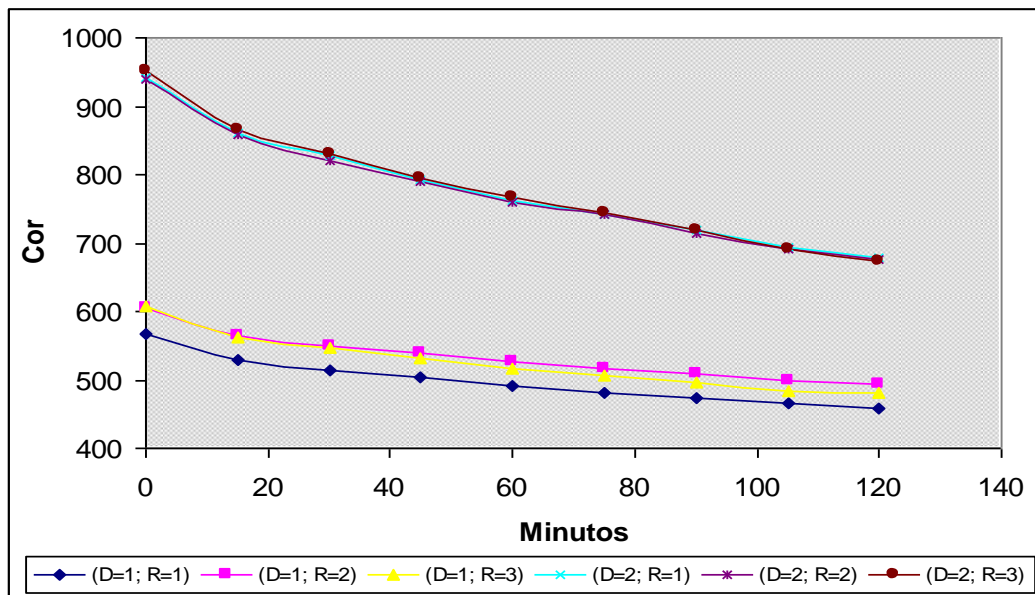


Gráfico 4: Perfis individuais para o composto sem conservantes os valores da Cor nos dias 1 e 2



* R- denota o réplica

Gráfico 5 – Perfis individuais para os valores da cor do composto com o antioxidante BTH nos dias 1 e 2



* R- denota o réplica

Gráfico 6 – Gráfico de médias e desvios da porcentagem de inibição para o fator Volume dentro do fator Antioxidante

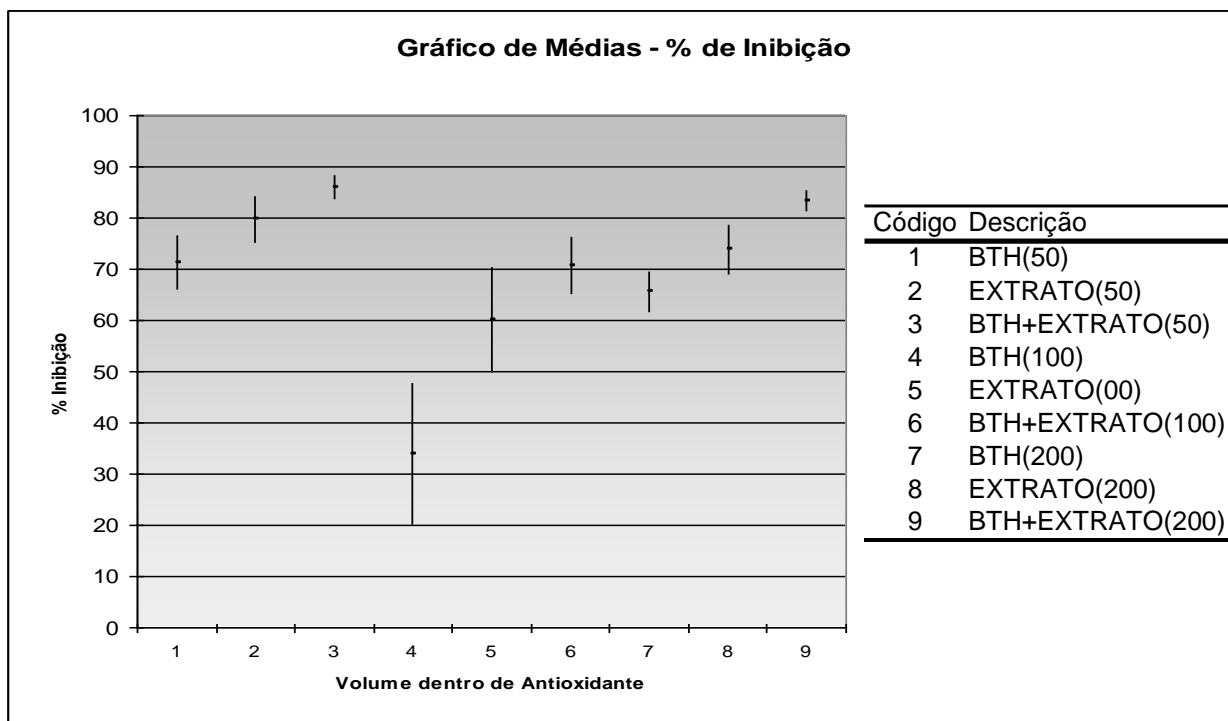


Gráfico 7 – Análise de resíduos

Análise de Resíduos

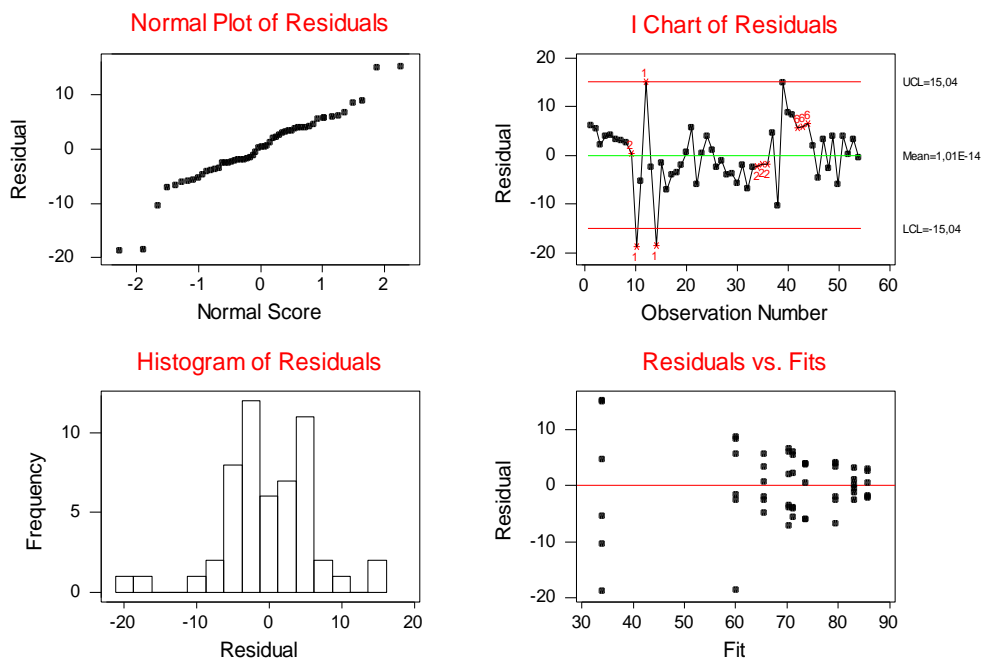


Tabela 1: Medidas resumo para a Porcentagem de Inibição por Dia

Antioxidante	volume	dia			
		1		2	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
1	50	75.77	2.15	66.64	1.01
	100	83.47	0.44	75.83	2.64
	200	87.89	1.35	83.94	0.19
2	50	30.74	17.14	36.88	12.8
	100	52.45	9.59	67.67	1.69
	200	65.69	1.95	75.41	2.49
3	50	66.95	3.94	64.16	4.19
	100	73.18	5.11	74.3	5.7
	200	82.28	1.81	84.11	1.97
Total		68.71	18.14	69.88	14.33

Tabela 2: Tabela de ANOVA

Fatores	Gaus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	F Value	Valor p
Intercepto	1	259313	259313	5421	<.0001
Antioxidante	2	5873	2936	61	<.0001
Volume(Antioxidante)	6	5887	981	21	<.0001
Resíduo	45	2153	48		
Total	54	273226			

Tabela 3: Comparações múltiplas pelo método de Tukey para o fator Antioxidante

Comparações múltiplas com nível de significância de 5% são indicados por ***				
Comparação Antioxidante	Diferença de médias	Intervalos simultâneos de 95%		Sig
		Limite Inferior	Limite Superior	
1-3	4.762	-0.826	10.349	
1-2	24.115	18.527	29.702	***
2-3	-19.353	-24.941	-13.766	***

Tabela 4: Comparações múltiplas pelo método de Tukey para o fator Volume dentro de Antioxidante.

Antioxidante	Volume 1	Volume 2	Intervalos simultâneos com 95% e confiança		
			limite inferior	Centro	limite superior
BHT	50	100	-21,48	-8,45	4,58
	50	200	-27,74	-14,71	-1,68
	100	200	-19,29	-6,26	6,77
EXTRATO	50	100	-39,28	-26,25	-13,22
	50	200	-49,77	-36,74	-23,71
	100	200	-23,52	-10,49	2,54
BHT + EXTRATO	50	100	-81,22	-68,19	-55,16
	50	200	-90,67	-77,64	-64,61
	100	200	-22,48	-9,45	3,58