

c) *Índice de saponificação ou de Koettstorfer*

Generalidades — Sabemos que os corpos graxos exigem uma certa quantidade de álcali para deslocar e combinar-se com a totalidade de seus ácidos graxos combinados em forma de glicerídio. Ora, êste álcali que é sempre a KOH , combina-se em maiores proporções com os ácidos de baixo pêso molecular, e, conseqüentemente, dará um índice de saponificação maior; para as substâncias que contenham glicerídios, formados com ácidos de pêso molecular elevado, como acontece com os óleos, êste índice será menor.

Designa-se por índice de saponificação ou de Koettstorfer o pêso, avaliado em miligramas de KOH que pode saturar os ácidos graxos de uma grama de gordura.

Determinação — A técnica usada por nós foi a seguinte:

Um pêso exato de óleo (de preferência 5 gr.) adicionado de 50 cm^3 de potassa meio normal é introduzido em um balão de 250 cm^3 com um refrigerante de refluxo. Leva-se a banho-maria, durante meia hora, cuidando-se, que não seja ultrapassado êste tempo, para evitar causa de êrro. Após meia hora, junta-se ao licor, ainda quente, 5 a 6 gôtas de fenolftalina e titula-se com ácido clorídrico, meio normal.

O resultado obtido representará o número de cm^3 da potassa usada, em liberdade. A diferença, entre o total da solução de potassa e o número de cm^3 de HCL $n/2$, representará a quantidade de potassa combinada.

O resultado final será dado pela fórmula:

Si chamarmos:

n — total cm^3 de KOH .

a — cm^3 de HCL $n/2$.

0,028 gr. de KOH — correspondente a 1 cm^3 de solução $n/2$.

p — gr. de óleo usado.

$$\frac{(n - a) \times 0,028}{p} = \text{quantidade de K O H exigidos para 1 gr. de óleo.}$$

Seja para o nosso ensaio:

$$\frac{(50 - 16,57) \times 0,028}{5} = 0,18720 \quad \text{Resultado êste}$$

que transformado em miligramas, ou 187,20, será o índice procurado.

Índice de Iodo

O índice de iodo é a quantidade dêste metaloide, em miligramas, que se fixa a 100 gramas de gordura.

Generalidades — Êste índice é muito variável para as substâncias graxas. Nulo para os glicerídios de ácidos saturados, êle se faz notar nos que contenham ácidos da série oleica, atingindo o seu máximo naquelles cujos ácidos possuem de 2 a 5 enlaces duplos na sua molécula.

Haverá entretanto, resultados inexatos, quando estas substâncias tenham sofrido uma oxidação pronunciada. Neste caso, o oxigênio se fixará nas ligações duplas, tomando assim o lugar do iodo, diminuindo o índice cuja quantidade exata para saturar cada uma delas é de dois átomos.

Êste índice dá, portanto, ótima orientação ao analista, para verificar qualitativamente, os ácidos gordurosos, principalmente, nos óleos, onde predominam os ácidos oleico, linoleico, linolênico etc., todos não saturados.

São preconizados vários métodos para esta determinação, cujo comentário farei rapidamente:

1.º — *Método de Hübl* — Foi por muito tempo considerado clássico, perdendo entretanto o seu lugar, pela demora de sua execução, assim como pela alterabilidade dos reativos.

Neste método, o reativo de contáto é o iodo a 5 % em solução alcoólica, a qual se junta um volume igual de uma solução de cloreto mercúrico a 6 %. O tempo de contáto é exatamente de 2 horas. Foi inicialmente o método escolhido para êste trabalho, sendo porém abandonado pela diversidade de resultados, após quatro ensaios com a mesma amostra de óleo.

2.º — *Método de Hanus* — É o método de uso mais corrente entre os nossos laboratórios. O reativo de contáto é uma solução acética de brometo de iodo titulada. O tempo de contáto tem a duração de meia hora.

Neste método, si a preparação do reativo exige muitas operações, o resultado bastante satisfatório e o menor tempo gasto a compensam.

3.º — *Método de Wijs* — Neste, o reativo de contáto é uma solução acética de cloreto de iodo, durando também 30 minutos.

4.º — *Método de Rosemund e Kuhnhen* — Êste método, segundo os autores, é tão exato quanto o de Hanus, sendo o tempo de contáto, somente de 10 minutos. O reativo principal é o dibromo-sulfato de piridina em solução acética.

5.º — Modernamente, prefere-se o índice de *Tiocianogênio*. O reativo de contáto neste método será composto de uma solução a 5 % de sulfocianato de Chumbo, em anidrido acético e de uma solução de Br a 1,68 % em tetracloreto de carbono. O tempo de duração varia de 20 a 24 horas. Faz-se duas provas em branco, e titula-se o sulfocianato livre por iodometria. Com o valor obtido, por diferença, tem-se a quantidade de iodo correspondente ao Tiocianogênio combinado à substância graxa.

Por simples cálculo de equivalência, obtém-se o índice de Tiocianogênio, que deve ser referido a 100 gr. de gordura.

Este índice feito juntamente com o método de Hanus, nos dará por meio de fórmulas a qualidade e quantidade dos ácidos graxos não saturados, contidos no óleo.

Deixamos de executá-lo, por nos faltar elementos que nos dessem uma idéia mais detalhada sôbre a sua teoria e precisão.

Foi escolhido para o nosso trabalho entre êstes métodos, o de Hanus, cuja técnica descrita nos "Methods of Analysis A. O. A. C." em resumo, é a seguinte: 0,200 de óleo pesado, em frasco de 250 cm³., com rôlha esmerilhada, em Balança Sartorius Werke sensível a 1/10 de miligrama, é dissolvido em 10 cm³ de CHCl³.

Junta-se 25 cm³ do licor de Hanus, cuja técnica de preparação descrevemos mais abaixo. Ao mesmo tempo, faz-se nas mesmas condições uma prova em branco.

Espera-se trinta minutos, agitando-os, ocasionalmente.

O licor de Hanus tem a seguinte preparação:

Dissolve-se, a quente, 13 gr.615 de iodo ressublimado em 825 cm³ de CH³COOH puro (não deve reduzir K²CR²O⁷ em H²SO⁴).

Esfria-se esta solução. Toma-se 25 cm³. do mesmo CH³COOH, em que se dissolvem 3 cm³. de Br. Titulam-se 5 cm³. desta solução com Na²SO³ n/10, juntando, previamente, 10 cm³. de KI a 15 %.

Uma vez titulada a solução acética de Br. consegue-se o volume, a ser juntado à solução de iodo, pela seguinte fórmula:

$$A = \frac{B}{C}$$

sendo, $A =$ volume de Br, a ser adicionado à solução de iodo.

$B = 800 \times$ volume de $\text{Na}^2\text{S}^2\text{O}^3$ n/10 equivalente a 1 cm^3 da solução acética de iodo.

$C =$ volume de $\text{Na}^2\text{S}^2\text{O}^3$ n/10, equivalente a 1 cm^3 da solução de Bromo.

Feito êste cálculo que varia em cada preparação do reativo, junta-se a quantidade de Br. para dobrar o halogênio existente. Em todo caso, haverá, ainda um excesso de iodo na solução, pois o título exigido é de 13gr.2 por litro. Neste caso, multiplicar-se-á, o volume total da solução por 13,2 e se obterá a quantidade teórica para que haja o título exigido. Subtraíse esta quantidade do pêso de iodo já titulado; a diferença será, exatamente, o iodo em excesso, que exigirá quantidade de CH^3COOH , para levar o licor de Hanus ao título de 13gr2 de iodo para 1000 cm^3 .

Voltando à prova inicial, passados, exatamente, os 30 minutos, junta-se a cada balão 15 cm^3 de KI a 15%, e adiciona-se 100 cm^3 de água destilada fria, previamente fervida, lavando as rôlhas com esta água, por meio de pissete.

Titula-se, cada uma das provas com $\text{Na}^2\text{S}^2\text{O}^3$ n/10 juntando algumas gôtas de gôma de amido a 1%, quando o líquido estiver levemente amarelado.

A diferença entre a prova em branco e o líquido desconhecido, dará o número de cm. de Tiosulfato de de sódio n/10 equivalente a quantidade de iodo fixada por 0,2 de óleo a examinar. Êste resultado refere-se a 100 gramas de óleo.

Em provas consecutivas obtivemos resultados que variaram entre 119,2 — 119,5, sendo, portanto, o índice de óleo que estudamos, calculado em média: 119,26.

Obtidos os resultados dos ensaios que procedemos, faremos com êles uma rápida comparação com os de outros autores citados:

Pêso específico

Allen	0,924
Fabris D. Negri	0,926
Dietrich	0,936
Holde	0,924
James e Baugman	0,913
Tolm. Muson	0,920
Villavecchia	0,923 — 0,936
————— (*)	0,9256

Índice de refração

Thorner	60.°	— 1,4611
James e Baugman	20.°	— 1,4736
Vasconcelos	25.°	— 1,4736
Tolm. Muson	1,4702	— 1,4699
Bolton Revis	1,4701	
—————	25.°	— 1,4736

Índice de Saponificação

Allen	193	— 194
Fabris D. Negri	188	— 189
Spuller	193	
Holde	193	
James Baugmam	188	
Villavecchia	188	— 194
Vasconcelos	185,7	
—————	186	— 187

Índice de Iodo

Thorner	129	
Fabris D. Negri	119,2	— 120,2
Dietrich	122	— 133
Holde	135	
James - Baugmam - Hanus ...	130,8	
Tolman e Muson	108,3	— 104,1
Bolton Revis	106	
Vasconcelos - Hübel	126,4	
———— Hanus	119,2	— 120

(*) Os resultados precedidos de um traço, são os obtidos por nós.

Com êste quadro podemos ver que os resultados não diferem totalmente, concluindo-se mesmo que o óleo por nós examinado assemelha-se por seus índices aos de outras regiões.

Ao mesmo tempo, com exceção do índice de iodo, enquadra-se perfeitamente na tabela de Winton.

Por esta razão, podemos aplicar os estudos já feitos para o óleo de girassol, também para o nosso, assim como estender as nossas conclusões aos de outras regiões.

Capítulo III

PROVA DE DIGESTIBILIDADE

Ao encerrarmos a parte analítica do óleo, com os índices descritos, o fizemos por razões já citadas, bem como, não podemos conceber que se entregue à alimentação, um azeite, sem dêle ter, uma idéia de sua digestibilidade e do seu valor energético.

Êste último será tratado na segunda parte dêste capítulo.

Não encontramos em química-bromatológica um ensaio de digestibilidade, fato êste que sempre nos chamou atenção, pois, tratando esta cadeira da análise dos alimentos, não se justifica que deixe de lado tão importante assunto.

Não trazemos nada de novo, somente tratamos de estudar a lipólise dos óleos, por intermédio da lipase pancreática, de maneira a se tornar fácil uma experiência, *in vitro*, neste sentido.

Já nos referimos ao quimismo duodenal, o que nos facilita tratar livremente do assunto abaixo, sem tornar a repetí-lo.

Uma idéia exata da digestão de um óleo, teríamos, si administrassemos uma quantidade certa desta substância, numa ração alimentar, para no resíduo fecal, dosarmos a parte não saponificada no intestino.

Esta, ainda que a mais satisfatória, não alcançaria o fim almejado, pois sairia dos limites do laboratório de química-bromatológica, além de outras dificuldades decorrentes.

Pensamos, também, e realizamos alguns ensaios, em submeter os óleos, *in vitro*, à ação lipolítica do suco duodenal de uma pessoa sã. Esta prova impraticável, no que diz respeito a fonte do material reativo, pois chegamos a fazer 10 tubagens duodenais, colhendo uma vez, normalmente êste suco, necessitaria, portanto, pessoa capacitada para procedê-la, assim como de indivíduos, que de boa vontade consentissem esta operação, o que, como todos sabem, é difficílissimo.

A única prova realizada com suco duodenal, que abaixo transcrevemos, não pode ser confirmada, motivo porque não lhe damos o valor merecido. Entretanto, ela nos abriu caminho para outras experiências.

Esta prova foi feita com o seguinte princípio: “o óleo, em meio alcalino, sofreria ação da lipase pancreática, contida naquele suco, e desdobrar-se-ia, em ácidos graxos e glicerina, à temperatura de 40°, num tempo determinado”.

Assim, a 10 cc. de azeite, adicionavamos igual volume de água distilada, e 2 cc. de suco levado a $\text{pH} = 8,5$. Após uma agitação forte, para facilitar o emulsionamento, levavamos à estufa regulada a 40°, durante 20 horas.

Ao mesmo tempo, praticavamos uma prova em branco, com suco duodenal aquecido à ebulição durante 5 minutos, submetendo às mesmas condições da prova problema.

Para levar em conta, a acidez que o próprio meio de lipólise pudesse adquirir, fizemos também 2 “testemunhas”: um contendo 10 cc. de água e 2 cc. do suco normal, outro com a lipase destruída.

Tivemos, então, titulando a acidez com NaOH $n/20$ em meio aquoso, o quadro seguinte:

<i>Prova em branco:</i>	<i>Prova problema:</i>
	Após lipólise
Óleo de olivas de origem portuguesa - 3,8 cc. Na O H	40 cc. Na O H n/20
Óleo de amendoim riograndense — alcalino	1,9 cc. „
Óleo de algodão paulista — alcalino	alcalino „
Óleo de girassol riograndense — alcalino	12,4 cc. „

Nesta prova tomavamos como óleo padrão o de olivas, e não relutámos em dosar a acidez em meio aquoso, porque os ácidos graxos libertados solubilizam-se totalmente nágua em presença dos sais biliares. (Gley).

Aproveitamos êste fato justamente, por ser semelhante ao que se processa normalmente no intestino delgado.

Êste ensaio, citado sómente para ilustrar as nossas experiências pois dele não podemos tirar conclusões positivas por não haver contra prova, forneceu-nos dados, como já foi dito, para estabelecermos o princípio da nossa técnica definitiva.

Propuzemo-nos preparar um líquido de ação lipolítica, de propriedades semelhantes ao suco duodenal.

Neste sentido usamos diversas substâncias de origem comercial, para chegarmos a composição que nos dêsse resultados confirmados por mais de 3 ensaios.

Assim depois de várias experiências em que usamos pancreatinas de várias procedências, e substâncias que contivessem sais biliares em quantidade satisfatória, optamos pela pancreatina Riedel, com 25 % de substância ativa, e bile dessecada do Laboratório Geyer,

com as quais preparamos o reativo nas proporções que nos pareceram mais indicadas, sejam:

Pancreatina, Riedel 25 % — estabilizada em glicerina	0,5
Bile dessecada — Geyer	1 gr.
Água destilada em quantidade suficiente para	100 cm ³ .

A solução agitada demoradamente, e neutralizada à fenolftaleína, na proporção de uma gota para cada 10 cm³., dá ao líquido um pH superior a 8 e inferior a 9, reação esta comum para suco duodenal.

Este reativo, possui atividade lipolítica com intensidade aproximada a da lipase pancreática, que verte para o intestino humano, e sais biliares em quantidade suficiente para dissolver os ácidos que se formam com o desdobramento dos glicerídios que os óleos contêm.

Deve, entretanto, ser preparado para uso imediato, porque a lipase em meio líquido, tem a sua atividade diminuída depois de 24 horas, e não encontramos um antisséptico cuja presença não inibisse a sua ação.

Com o reativo, preparado sempre nestas condições, executámos uma série de ensaios, com as mais variadas amostras de óleos que pudemos encontrar, cuja relação damos a seguir:

- 1 amostra de óleo de sésamo de origem desconhecida;
- 1 amostra de óleo de algodão do comércio, de origem paulista;
- 1 amostra de óleo de algodão mineiro;
- 2 amostras de óleo de olivas do comércio, de origem portuguesa;
- 1 amostra de óleo de amendoim da 1.^a prensagem;
- 1 amostra de óleo de amendoim refinado;
- 1 amostra de óleo de amendoim do comércio;
- 1 amostra de óleo de girassol de 1.^a prensagem;
- 1 amostra de óleo de girassol refinado;
- 1 amostra de óleo de girassol do comércio.

Os óleos de amendoim e de girassol eram de fabricação do nosso estado.

Êstes ensaios eram feitos em três séries, cujo material usado compunha-se de: balões Erlenmeyer de 100 cc., estufa regulada a 40°, bureta de Mohr de 50 cc. graduada ao décimo, solução n/10 de Na OH e indicador de fenolftaleina a 1 % em solução alcoólica. O reativo neutralizado em presença dêste indicador apresentava já coloração vermelho clara dispensando, nova adição, para a titulação final.

A primeira série era formada por frascos Erlenmeyer contendo 20 cc. do reativo corado previamente aquecido para destruir a lipase, ficando um como testemunha, para que se levasse em conta a acidez que pudesse advir. Aos outros frascos eram juntados 5 cc. do óleo a examinar.

Na segunda e terceira série, 5 cc. de cada amostra de óleo eram submetidos a ação do reativo (20 cc.), tendo cada uma o seu frasco testemunha.

Completadas as séries, os frascos eram levados à estufa a 40°, permanecendo alí, durante 20 horas.

A seguir, era feita a titulação, com a solução de Na OH n/10.

Nestas provas, também os ácidos graxos eram titulados em meio aquoso, por estarem solubilizados pelos sais biliares presentes.

Eram obtidos assim três resultados:

1.º — acidez livre de óleos, da qual se descontava a correspondente ao frasco testemunha.

2.º e 3.º — representavam a acidez total, compreendendo a acidez livre, mais acidez decorrente da ação de lipolise sôbre os glicerídios dos óleos, ou acidez combinada.

A acidez combinada era então o que buscavamos.

Assim: na ordem já mencionada obtivemos para: os frascos testemunhas um resultado nunca maior do

que 1,5 cm³ de Na OH n/10; as provas em branco, descontada a acidez precedente:

Amostra do óleo de sésano origem desconhecida menos de	5 cc.
Amostra de óleo de algodão (paulista) menos de	2 cm ³
Amostra de óleo de algodão (mineiro) menos de	2,5 „
Amostra de óleo de olivas A menos de	8 „
„ „ „ „ „ B „ „	6 „
„ „ „ „ amendoim 1. ^a prensa-gem menos de	8 „
Amostra de óleo de amendoim refinado menos de	3 „
Amostra de óleo de amendoim do comércio menos de	3 „
Amostra de óleo de girassol de 1. ^a prensa-gem menos de	15 „
Amostra de óleo de girassol refinado menos de	2 „
Amostra de óleo de girassol do comércio menos de	1 „

Os resultados da segunda e terceira série coincidiavam em geral, salvo causa de êrro imprevista.

O resultado procurado era obtido deduzindo do total de cm³ de Na OH, as quantidades correspondentes a acidez do meio e a acidez livre.

Êstes, tomados em média, serviram-nos para estabelecer, comparativamente, o gráu de desdobramento do óleo de girassol, em relação as amostras dos outros óleos, em condições semelhantes ao processo de digestão das gorduras, no organismo humano.

Consideramos resultados definitivos para 5 cc da amostra de:

Óleo de sésamo — origem desconhecida	— 24 cm ³ de Na OH n/10			
Óleo de algodão de São Paulo	— ” ” ” ”			
Óleo de Algodão de Minas	— ” ” ” ”			
” ” olivas A (português)	— ” ” ” ”			
Óleo de olivas B (português)	— 22 ” ” ” ”			
Óleo de amendoim 1. ^a prensagem	— 30 ” ” ” ”			
Óleo de amendoim refinado	— 25 ” ” ” ”			
” ” ” comércio	— 21 ” ” ” ”			
Óleo de girassol 1. ^a prensagem	— 30 ” ” ” ”			
Óleo de girassol refinado . .	— 26 ” ” ” ”			
” ” ” do comércio	— 25,5, ” ” ” ”			

Pelos resultados obtidos vemos que o óleo de sementes de girassol, sofre ação lipolítica, nas mesmas condições e com igual intensidade dos demais azeites experimentados.

Não houve mesmo, nenhum em que a lipáse tivesse sua ação aumentada ou diminuída, de maneira notável, embora os óleos tivessem composição química variada.

Este fato, encontra confirmação nas propriedades gerais das lipáses.

Arthus, tratando destas enzimas, diz que elas desdobram os ésteres graxos, saturados ou não saturados, e conseqüentemente exercem sua ação química sobre tôdas graxas neutras.

Não julgámos plausível, portanto, sob ponto de vista de digestibilidade, que se indique, como padrão na alimentação qualquer uma das espécies de óleo experimentadas, pois estão em igualdade de condições.

Quanto a técnica que apresentámos, deduz-se, claramente, que sendo uma prova de valor comparativo,

exige para isto, um confronto, nas mesmas condições, com uma amostra do óleo a examinar, de pureza reconhecida.

Valor Calorimétrico do Óleo de Girassol

As substâncias oxidáveis como as gorduras, possuem duas espécies de energia: uma latente, chamada energia potencial que se mantém enquanto o corpo não sofrer alteração alguma; outra cinética ou atual, que é a transformação da primeira, por meio de agentes estranhos, e que se manifesta por fenômenos caloríficos.

Segundo esta divisão, o poder energético dos alimentos pode ser referido pela energia potencial que encerram, pois esta corresponde a totalidade de calorias que eles contêm, ou, então, pelas calorias que realmente são aproveitadas pelo organismo, correspondentes a parte absorvida na digestão.

As primeiras, chamadas calorias brutas, são empregadas geralmente para a medida do valor calorimétrico dos corpos oxidáveis.

Por caloria, ou grande caloria, entende-se a quantidade de calor produzido por um corpo na bomba calorimétrica, necessária para aumentar de 1° C., a temperatura de 1000 cm. de água, partindo de uma temperatura conhecida.

A bomba calorimétrica imaginada por Berthelot, sofreu modificações, aperfeiçoando-se, que deram origem a um novo aparelho chamado obús de Berthelot-Mahler.

Para não entrarmos em detalhes técnicos pois esta determinação só a obtivemos por uma gentileza muito especial dos Srs. químicos do Laboratório dos Frigoríficos Nacionais, o calorímetro de Berthelot-Mahler

não difere, em princípio, de outros descritos nos tratados especializados e livros didáticos.

Esta bomba ou obús, é formada por um recipiente de paredes resistentes, cuja tampa, que se adata ao aparêlho por meio de rôsca, é atravessada por duas tubuladuras especiais: uma, que dá passagem ao fio condutor de eletricidade, outra ao condutor de oxigênio.

A parede interior da bomba é revestida por uma camada de esmalte.

No seu interior ela possui um suporte para um pequeno cadinho de platina, no qual se coloca um pêso certo (1 gr.) da substância cujo valor calorimétrico se quer medir.

Após ter verificado a correção de temperatura do aparêlho e o seu valor em água, e a bomba estar preparada para o ensaio, isto é, contendo um pêso conhecido de óleo, como no nosso caso, introduz-se nesta, pelo condutor, oxigênio a 20 atmosferas.

Leva-se ao agitador mecânico, que já contém a quantidade de água, correspondente, fecha-se com uma tampa de ebonite para que não haja influência da temperatura exterior, mergulha-se na água um termômetro graduado a 1/1000, e liga-se o agitador para manter esta sempre em movimento.

Verificada a temperatura no qual se fixa o termômetro, que é chamada temperatura inicial, faz-se passar a corrente elétrica, regulada por um reóstato, pelo interior da bomba. O óleo ou qualquer outra substância oxidável, com a centelha produzida, entra em combustão, em presença do oxigênio sob pressão, com transformação integral em CO_2 e H_2O .

Verifica-se o final da operação por intermédio duma lâmpada colocada no circuito elétrico, que se apaga. Lê-se então, no termômetro o aumento de temperatura.

Terminada a operação, faz-se o cálculo que se segue:
(temperatura final — temperatura inicial) valor em água = número de calorias para o peso usado da substância.

Para 1 gr. de óleo de girassol foi obtido um valor energético igual a 8,92 grandes calorias.

CONCLUSÕES

Sôbre o óleo de girassol:

- I — O Rio Grande do Sul possui terreno e clima favoráveis ao cultivo do girassol, tornando possível a industrialização do óleo.
- II — O óleo de girassol, deste estado, assemelha-se por suas constantes aos de outras regiões.
- III — O óleo de girassol possui digestibilidade igual aos demais óleos alimentícios.
- IV — O óleo possui poder energético suficiente para ser incluído nas rações alimentares usuais.

Sôbre a prova de digestibilidade:

- I — Grande simplicidade de técnica.
 - II — Pode ser estendida à tôdas as graxas alimentícias, devendo ser feita, comparativamente, com tipos padrões.
 - III — As substâncias empregadas são acessíveis a qualquer laboratório químico-bromatológico.
 - IV — É pouco dispendiosa e de fácil execução.
-