**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Ação antioxidante de extratos de especiarias e suas misturas
binárias e ternárias sobre a estabilidade oxidativa de óleo de soja**

Marilis Yoshie Hayashi Shimano

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2012**

Marilis Yoshie Hayashi Shimano
Farmacêutica-Bioquímica

Ação antioxidante de extratos de especiarias e suas misturas binárias e ternárias sobre a estabilidade oxidativa de óleo de soja

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Profa. Dra. **THAIS MARIA FERREIRA DE SOUZA VIEIRA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2012

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Shimano, Marilis Yoshie Hayashi

Ação antioxidante de extratos de especiarias e suas misturas binárias e ternárias sobre a estabilidade oxidativa de óleo de soja / Marilis Yoshie Hayashi Shimano.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2012.
110 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Alecrim 2. Compostos fenólicos 3. Metodologia de superfície de resposta
4. Óleo de soja 5. Orégano 6. Oxidação lipídica 7. Sálvia 8. Tomilho I. Título

CDD 664.369
S556a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais, pelo apoio necessário, apesar da distância. À minha irmã Iris, sempre ao meu lado.

Às professoras Marisa A. B. Regitano d'Arce e Thais M. F. de Souza Vieira pelas orientações neste trabalho, ensinamentos e conselhos.

Aos amigos Rodrigo e Paulo, que, de meros colegas de mestrado tornaram-se grandes e eternos amigos. À amiga Suzuki, companheira de todas as horas. A todos os colegas de graduação, pós-graduação, companheiros de APG, que estiveram em minha vida e contribuíram de alguma forma. A todos os amigos que fiz, dentro e fora da ESALQ, durante esses anos.

À técnica Maria Fernanda e a mestre Débora Ravelli, pelo companheirismo e pela ajuda essencial em laboratório. Às técnicas de laboratório Adna e Ivani pela ajuda nas análises cromatográficas.

A todos os companheiros do laboratório de Óleos e Gorduras, pelos momentos de descontração e pela ajuda.

A todos os professores, em especial aos Profs. Severino Matias de Alencar, Solange Guidolin Canniatti Brazaca e Silene Bruder Silveira Sarmento pela utilização dos laboratórios e equipamentos.

A todos os funcionários do departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, em especial ao Fábio B. Rodrigues e à Regina C. C. Marafon.

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

"Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo dos céus".
Eclesiastes 3:1

SUMÁRIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
1 INTRODUÇÃO	13
2 EMPREGO DE ESPECIARIAS COMO ANTIOXIDANTES NATURAIS	15
Resumo	15
Abstract.....	15
2.1 Introdução.....	16
2.2 Óleo de soja e oxidação lipídica	16
2.3 Antioxidantes.....	19
2.3.1 Antioxidantes sintéticos	21
2.3.2 Antioxidantes naturais.....	23
2.3.3 Compostos fenólicos.....	23
2.3.4 Especiarias com atividade antioxidante.....	27
2.3.5 Metodologias de extração	31
2.3.6 Metodologias de avaliação da atividade antioxidante in vitro	33
2.3.6.1 Métodos de seqüestro de espécies reativas geradas no meio reacional	34
2.3.6.1.1 DPPH	34
2.3.6.1.2 ABTS.....	35
2.3.6.1.3 FRAP.....	35
2.3.6.1.4 ORAC.....	35
2.3.6.2 Métodos de inibição da oxidação lipídica / métodos em sistemas lipídicos.....	36
2.3.6.2.1 Teste acelerado em estufa.....	37
2.3.6.2.1.1 Índice de Peróxido (IP).....	37
2.3.6.2.1.2 Absortividade na região do ultravioleta	39
2.3.6.2.2 Determinação da estabilidade oxidativa pelo Rancimat.....	40
2.4 Considerações finais	41
Referências	42
3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE ESPECIARIAS ATRAVÉS DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	57
Resumo	57
Abstract.....	57
3.1 Introdução.....	58
3.2 Material e métodos.....	59

3.2.1 Preparo das especiarias.....	59
3.2.2 Processo de extração.....	60
3.2.3 Determinação de teor de compostos fenólicos totais.....	60
3.2.4 Identificação química dos extratos de especiarias.....	60
3.2.4.1 Derivatização.....	61
3.2.4.2 Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM).....	61
3.2.5 Delineamento experimental e análise estatística.....	62
3.3 Resultados e Discussão.....	63
3.4 Conclusão	79
Referências	79
4 USO DE EXTRATOS DE ESPECIARIAS E SUAS MISTURAS BINÁRIAS E TERNÁRIAS SOBRE A ESTABILIDADE OXIDATIVA DE ÓLEO DE SOJA.....	85
Resumo.....	85
Abstract	85
4.1 Introdução	86
4.2 Material e métodos	87
4.2.1 Óleo de soja	87
4.2.2 Preparo das especiarias.....	87
4.2.3 Processo de extração e determinação do teor de compostos fenólicos totais	87
4.2.4 Teste acelerado em estufa	88
4.2.4.1 Índice de peróxido	88
4.2.4.2 Absortividade na faixa do ultravioleta (UV).....	89
4.2.5 Estabilidade oxidativa em Rancimat	89
4.2.6 Delineamento experimental e análise estatística.....	90
4.3 Resultados e discussão	91
4.4 Conclusão	101
Referências	102
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	105
APÊNDICES.....	107

RESUMO

Ação antioxidante de extratos de especiarias e suas misturas binárias e ternárias sobre a estabilidade oxidativa de óleo de soja

A oxidação de lipídeos produz compostos indesejáveis que alteram as características organolépticas de alimentos lipídicos e reduzem a qualidade nutricional. Nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica são adicionados antioxidantes sintéticos para retardar ou prevenir a deterioração lipídica. Devido aos estudos sobre a possível toxicidade dos antioxidantes sintéticos e ao apelo por compostos ativos naturais, o uso de antioxidantes naturais presentes em ervas e especiarias representa uma alternativa promissora. No presente trabalho foram estudadas as condições de obtenção de extratos hidroalcoólicos de especiarias e sua aplicação em óleo de soja refinado em teste acelerado. O estudo do efeito da temperatura e do grau de hidratação do etanol sobre o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de alecrim, orégano, sálvia e tomilho foi realizado com aplicação de planejamento experimental e metodologia de superfícies de resposta. As condições para uma extração eficiente dos compostos fenólicos de alecrim e tomilho desidratados foram o uso de etanol 50% (v/v) e temperatura entre 45 a 50°C. Extrato de sálvia com maiores concentrações em fenólicos totais foram obtidos com etanol 50% (v/v) em uma faixa de temperatura de 57,5 a 60°C. O extrato de orégano requer uso de etanol 40-50% (v/v), em qualquer temperatura na faixa estudada (30 a 60°C). Os compostos identificados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foram os ácidos cafeico e dihidrocafeico, timol e arbutina. Os extratos de alecrim, orégano e tomilho preparados nas condições otimizadas, bem como suas misturas binárias e ternárias, foram adicionados ao óleo de soja refinado e submetidos a teste acelerado em estufa a 60°C. Os resultados de Índice de Peróxido e Absortividade na faixa do ultravioleta evidenciaram que as misturas de extratos foram capazes de oferecer proteção antioxidante ao óleo de soja refinado. Combinações com alecrim apresentaram os melhores efeitos protetores, sendo a melhor combinação das proporções 15% de tomilho, 65% de alecrim e 20% de orégano, totalizando 100 mg de compostos fenólicos totais/g de óleo.

Palavras-chave: Alecrim; Orégano; Tomilho, Sálvia; Oxidação lipídica; Compostos Fenólicos; Metodologia de Superfície de Resposta

ABSTRACT

Antioxidant activity of spices extracts and their binary and ternary mixtures on soybean oil oxidative stability

The lipid oxidation produces undesirable compounds that alter the organoleptic characteristics of food lipids and reduce the nutritional quality. In the food, cosmetics and pharmaceutical industries, synthetic antioxidants are added to retard or prevent the lipid deterioration. Due to the possible toxicity of synthetic antioxidants and the call for active natural compounds, the use of natural antioxidants present in herbs and spices is a promising alternative. Thus, this study evaluated the antioxidant activity of extracts of spices and their mixtures on refined soybean oil. The study of temperature and solvent mixture effects on the phenolic extraction from dried rosemary, oregano, sage and thyme was performed according to response surface methodology and mathematical models. The conditions for an efficient extraction of the phenolic compounds from rosemary and thyme were ethanol 50% at 45-50°C; from sage was ethanol 50% at a temperature range from 57.5 to 60°C, and from oregano was ethanol 40-50% at any temperature in the studied range (30-60°C). The compounds identified by gas chromatography-mass spectrometry were dihydrocaffeic and caffeic acids, thymol and arbutin. Selected hydroalcoholic extracts of rosemary, oregano and thyme were added to soybean oil subjected to accelerated storage tests. Peroxide values and absorptivity at UV showed that mixtures of extracts were able to provide antioxidant protection to soybean oil. Mixtures with rosemary showed better protective effects than the others. The region of the surface response of the mixtures in which the best protection is offered lies in the proportions of rosemary from 0.50 to 0.80, 0.10 to 0.30 of oregano and thyme from 0.05 to 0.30, in a total of 100 mg GAE/g oil.

Keywords: Rosemary; Oregano; Thyme, Sage; Lipid oxidation; Phenolic Compounds; Response Surface Methodology

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a população tem se preocupado em adquirir hábitos de vida mais saudáveis através da ingestão de alimentos de origem natural e/ou com apelo funcional. O consumo de compostos antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora contra os processos oxidativos no organismo através de reações que estabilizam os radicais livres, os quais podem ser responsáveis pelo processo de envelhecimento do corpo e pelo aparecimento de uma série de patologias. Com isso, pesquisas tem sido desenvolvidas com o objetivo de encontrar matérias-primas que possuam essa ação.

Outro fator que desperta interesse em pesquisas é a oxidação em alimentos. Esse processo, maior causa de degradação de alimentos lipídicos, compromete sua qualidade, alterando as características nutricionais (degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais) e organolépticas (formação de compostos de odor e sabor desagradáveis).

Ervas e especiarias, utilizadas tradicionalmente na culinária para dar sabor e aroma aos alimentos, representam um potencial de aplicação em produtos alimentícios com o intuito tecnológico de evitar a oxidação de alimentos lipídicos, pois podem atuar como antioxidantes naturais. Essa ação deve-se principalmente aos compostos fenólicos existentes na sua composição. Dessa forma, há um grande interesse em extrair, identificar e isolar os compostos fenólicos de ervas e especiarias, e avaliar a ação antioxidante desses compostos, isolados ou em extratos, em alimentos lipídicos.

Tanto em pesquisas como no desenvolvimento de novos produtos, o grande desafio é encontrar as melhores condições para obtenção de extratos eficientes com o menor custo. Para atender esse objetivo, métodos estatísticos representam uma ferramenta bastante útil no planejamento de experimentos.

Dessa forma, esse trabalho foi conduzido visando avaliar o efeito de alguns parâmetros no preparo de extratos de especiarias desidratadas sobre o teor de compostos fenólicos totais, a identificação dos compostos dos extratos por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e, a partir da seleção dos extratos, avaliar o efeito primário e possíveis efeitos de sinergia e de antagonismo de misturas por meio da aplicação de planejamentos experimentais e análise de superfície de resposta. Portanto, o objetivo desse

trabalho foi avaliar o efeito da adição de extratos hidroalcoólicos de especiarias e suas misturas sobre a estabilidade oxidativa de óleo de soja refinado, e decidir pela melhor concentração com o auxílio de técnicas estatísticas, tais como a modelagem de planejamentos experimentais.

2 EMPREGO DE ESPECIARIAS COMO ANTIOXIDANTES NATURAIS

Resumo

Uma das reações mais comuns e importantes em alimentos é a oxidação lipídica, em que radicais livres são produzidos e geram compostos indesejáveis que afetam a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos. Os radicais livres também são produzidos em condições normais do metabolismo humano, no entanto, são tóxicos e estão relacionados aos processos de envelhecimento e a algumas doenças. Em ambos os casos, sistemas antioxidantes são necessários. Devido à tendência mundial para a utilização de produtos naturais e a crescente preocupação em relação à saúde, essa revisão tem por objetivo ressaltar a importância dos antioxidantes naturais como agentes conservantes em alimentos, especialmente ervas aromáticas e especiarias, os principais compostos responsáveis, e os procedimentos analíticos para avaliação do processo de extração de compostos fenólicos e da ação antioxidante destes em alimentos.

Palavras-chave: Antioxidantes naturais; Ervas aromáticas; Extração de compostos fenólicos; Capacidade antioxidante; Estabilidade oxidativa

Abstract

The lipid oxidation is one of the most common and important reactions, in which free radicals are produced and generate undesirable compounds affecting sensory and nutritional quality of food. Free radicals are also produced in normal human metabolic conditions, however, they are toxic and related to aging process and degenerating diseases. In both cases, antioxidant systems are necessary. Due to the worldwide trend toward the use of natural products and the growing concern about health, this review aims to highlight the importance of natural antioxidants as food preservatives, especially aromatic herbs and spices, its main compounds, and the analytical procedures to access the phenolics extraction process and the antioxidant action in food.

Keywords: Natural antioxidants; Aromatic herbs; Phenolic compounds extraction; Antioxidant capacity; Oxidative stability

2.1 Introdução

O processo de oxidação é a principal causa de degradação de alimentos lipídicos, tornando-os inapropriados para o consumo devido à formação de compostos de odor e sabor desagradáveis (ranço), à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, além da geração de compostos secundários potencialmente tóxicos (WAGNER; ELMADFA, 2000; RAMALHO; JORGE, 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

A oxidação também ocorre no organismo humano, sendo um processo metabólico essencial das células, com geração de radicais livres relacionados aos processos de envelhecimento e doenças degenerativas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O aumento da procura por produtos de origem natural por parte dos consumidores tem resultado no grande número de pesquisas relacionadas aos antioxidantes naturais presentes em diversas fontes como frutas, vegetais, ervas aromáticas, bebidas, entre outros. As ervas e especiarias, bastante utilizadas na culinária para conferir aroma e sabor no preparo de alimentos e também na medicina popular, se destacam nesse cenário pela sua propriedade antioxidante, que é atribuída especialmente à presença de compostos fenólicos.

Considerando a exigência da população e o potencial de uso de ervas e especiarias, o estudo desses produtos se faz necessário de forma a encontrar as melhores condições de aplicação de ervas aromáticas e especiarias em alimentos lipídicos, bem como a identificação dos seus componentes fenólicos.

2.2 Óleo de soja e oxidação lipídica

Um dos óleos vegetais mais produzidos e consumidos no país é o óleo de soja. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de soja em grão, farelo e óleo de soja, responsável por aproximadamente 29% da produção mundial (ABIOVE, 2012; THE AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION, 2012).

Os óleos vegetais são compostos por triglicerídeos, ou seja, ésteres formados por glicerol e três ácidos graxos, e por outros componentes menores como tocoferol, esteróis e vitaminas lipossolúveis, podendo também apresentar ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos (FARIA et al., 2002). A tabela 2.1 apresenta os ácidos graxos presentes no óleo de soja. O alto índice de ácidos graxos insaturados torna os óleos vegetais e outros alimentos lipídicos propensos ao processo de formação de ranço,

já que as duplas ligações representam pontos reativos ao oxigênio (REGITANO D'ARCE, 2006).

A oxidação do óleo é um processo afetado por diversos fatores como a sua composição em ácidos graxos, a temperatura, a luz incidente, a presença de oxigênio, e a ação de íons metálicos, dentre outros (ANDERSON; LINGNERT, 1999; HRAS et al., 2000; NAZ et al., 2005; WAGNER; ELMADFA, 2000). O fator primordial é a presença de oxigênio (REGITANO-D'ARCE, 2006). Além disso, o processamento de alimentos pode alterar sua estrutura, resultando na maior exposição ao oxigênio dos lipídeos presentes e consequente oxidação, bem como o comprometimento do sistema antioxidante natural do alimento (MADSEN; BERTELSEN, 1995).

Tabela 2.1 – Composição em ácidos graxos do óleo de soja

Ácidos graxos	Nomenclatura	Composição (g/100g)
C<14		ND – 0,1
C 14:0	Mirístico	ND – 0,2
C 16:0	Palmitico	8,0 – 13,5
C 16:1	Palmitoleico	ND – 0,2
C 18:0	Estearico	2,0 – 5,4
C 18:1	Oleico	17 – 30
C 18:2	Linoleico	48,0 – 59,0
C 18:3	Linolênico	4,5 – 11,0
C 20:0	Araquídico	0,1 – 0,6
C 20:1	Eicosenoico	ND – 0,5
C 22:0	Behênico	ND – 0,7

ND – não detectável, $\leq 0,05\%$

Fonte: Brasil (2005); Codex Alimentarius (2011)

A oxidação pode ocorrer através de enzimas (lipoxigenases), termoxidação (temperatura elevada), fotoxidação (induzida pela luz) e auto-oxidação, sendo este último o principal mecanismo de deterioração lipídica (REGITANO-D'ARCE, 2006).

A auto-oxidação nos alimentos ocorre segundo um mecanismo de reação em cadeia de radicais livres e divide-se em três fases: iniciação, propagação e terminação, representadas na figura 2.1. Na primeira fase, a molécula de ácido

graxo insaturado sofre abstração do átomo de hidrogênio adjacente a dupla ligação, catalisada por luz, calor ou presença de íons metálicos, formando-se um radical livre. Na fase de propagação, o radical livre reage com o oxigênio molecular, formando um radical livre peróxido. Esse último reage com outra molécula insaturada para a formação de um hidroperóxido e um radical livre que é capaz de dar continuidade à reação em cadeia. A fase de terminação é determinada pelas reações dos radicais livres entre si, formando espécies não radicais estáveis (REGITANO-D'ARCE, 2006; SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008). Reações de propagação são essencialmente responsáveis pela natureza auto-catalítica da oxidação (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

Em que:

RH = ácido graxo insaturado

$R\cdot$ = radical livre

$ROO\cdot$ = radical peróxido

$ROOH$ = hidroperóxido

$RO\cdot$ = radical alcóxila

Figura 2.1 – Esquema geral da auto-oxidação lipídica

Fonte: Adaptado de Akoh e Min (2008)

Os hidroperóxidos podem sofrer reações de decomposição e gerar outros radicais livres (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008). Aldeídos, cetonas, alcoóis, hidrocarbonetos, também são gerados, os quais são voláteis e responsáveis pelo odor desagradável do ranço (HAMILTON, 1994).

Para evitar os processos oxidativos e prolongar o *shelf-life* (vida de prateleira) dos alimentos lipídicos, modificações das condições ambientais (embalagem, condições de estocagem) e a utilização de substâncias antioxidantes são medidas adotadas (WAGNER; ELMADFA, 2000).

Não somente em alimentos ocorre a formação de radicais livres devido à oxidação. Nos organismos vivos, a produção de energia necessária para as atividades essenciais das células leva à produção de radicais livres em condições normais, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), o radical peroxila ($ROO^{\bullet}$) e espécies não radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2), chamados de "espécies reativas de oxigênio" (EROs) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). As EROs, capazes de reagir com as biomoléculas, estão envolvidas tanto no processo de envelhecimento, como também em diversas patologias. A membrana celular, lipoproteica, pode sofrer interferência no seu transporte ativo e passivo normal, ou se romper, levando à morte celular. Reações de oxidação nas paredes dos vasos sanguíneos e no DNA podem levar ao desencadeamento de doenças cardiovasculares e de oncogênese, respectivamente. Enzimas podem ter sua atividade anulada se houver qualquer alteração em seus aminoácidos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Portanto, a presença de sistemas ou compostos que previnem ou retardam a oxidação nos alimentos e no organismo é fundamental.

2.3 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias que diminuem ou impedem a oxidação de substratos oxidáveis (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995). Em relação aos alimentos, um antioxidante pode ser definido como "uma substância que em pequenas quantidades é capaz de prevenir ou retardar grandemente a oxidação de materiais facilmente oxidáveis" (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

Os antioxidantes podem possuir atividade enzimática ou não. Exemplos de antioxidantes enzimáticos são: o superóxido dismutase, a catalase, a glutational peroxidase e a glutational redutase. Já os antioxidantes não enzimáticos incluem os

antioxidantes sintéticos e naturais (α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico e os compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos, entre outros)) (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Os compostos antioxidantes podem agir em diferentes níveis do processo oxidativo, tais como: reação com os radicais livres; ligação competitiva ao oxigênio molecular; sequestro de íons metálicos ou estabilização de hidroperóxidos (REGITANO-D'ARCE, 2006). E, de acordo com seu mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários ou secundários. Os secundários podem ainda ser divididos em sinérgicos, removedores de oxigênio singlete e agentes quelantes (ESKIN; PRZYBYLSKI, 2001).

Os antioxidantes primários são substâncias com núcleo fenólico, com várias substituições no anel e atuam diretamente sobre os radicais livres. Por serem melhores doadores de hidrogênio que as moléculas lipídicas insaturadas, os antioxidantes primários doam átomos de hidrogênio aos radicais livres ($\text{ROO}\bullet$, $\text{RO}\bullet$ e $\text{R}\bullet$) tornando-os indisponíveis para a propagação da reação em cadeia. Assim, espécies inativas são formadas. O radical proveniente do antioxidante é estabilizado por ressonância e, por isso, possui baixa reatividade ($\text{A}\bullet$) (Figura 2.2). Exemplos dessa classe são os antioxidantes sintéticos butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propila (PG), e *tert*-butil-hidroquinona (TBHQ) (RAMALHO; JORGE, 2006; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

Figura 2.2 – Forma de ação dos antioxidantes primários

Fonte: Adaptado de Akoh e Min (2008)

Os antioxidantes secundários não agem diretamente sobre os radicais livres, mas reduzem a velocidade da oxidação (REGITANO-D'ARCE, 2006).

Os sinérgicos são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, mas quando utilizados em combinação adequada com os antioxidantes primários, podem aumentar ou recuperar a atividade destes. Alguns antioxidantes primários

quando usados em combinação também podem atuar sinergicamente. Ácido cítrico, ácido ascórbico e palmitato de ascorbila são bons exemplos desse grupo (BAILEY, 1996; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

Os removedores de oxigênio singlete atuam como agentes redutores e capturam o oxigênio presente no meio, evitando a propagação da auto-oxidação. Como exemplos, podem ser citados o ácido ascórbico, seus isômeros e derivados (BAILEY, 1996; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

Os agentes quelantes, também chamados de sequestrantes, possuem ação sobre os íons metálicos, como cobre e ferro, catalisadores da oxidação lipídica. Esses agentes se complexam com os íons metálicos e formam compostos estáveis. Os mais comuns são ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diaminotetracético (EDTA) (BAILEY, 1996; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

Os compostos presentes em plantas e animais amplamente estudados como antioxidantes em alimentos podem ser incluídos como antioxidantes mistos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonoides e derivados do ácido cinâmico (ESKIN; PRZYBYLSKI, 2001; RAMALHO; JORGE, 2006).

Nos alimentos lipídicos, os antioxidantes retardam o início da oxidação ou reduzem a velocidade em que ela acontece. O seu papel não é aumentar ou melhorar a qualidade dos alimentos, mas mantê-la e prolongar a sua vida útil. Eles devem ser de baixo custo, atóxicos, eficazes em baixas concentrações, estáveis e resistentes ao processamento (efeito *carry-through*) (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

2.3.1 Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados pela indústria para preservar os alimentos são: BHA, BHT, PG, e TBHQ, geralmente usados em combinação (ESKIN; PRZYBYLSKI, 2001). Como pode ser observado na figura 2.3, os antioxidantes sintéticos possuem um anel fenólico, e diferem entre si pelas substituições nesse anel.

Figura 2.3 – Antioxidantes sintéticos

Fonte: Adaptado de Bailey (1996)

O BHA e o BHT são compostos bastante lipofílicos, porém, pouco efetivos como antioxidantes isolados em óleos vegetais; por isso, são normalmente usados em sinergia entre eles, ou com o PG (menos lipofílico). Essas três substâncias apresentam o inconveniente de serem voláteis sendo pouco efetivas em condições de temperatura elevada. Já o TBHQ possui excelente *carry-through*, sendo o melhor antioxidante para óleos de fritura, e é utilizado em associação com o ácido cítrico (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

Esses compostos são regulamentados por país e possuem um limite máximo de adição aos alimentos. No Brasil, as concentrações máximas permitidas em óleos e gorduras são de 100 mg/kg para o BHT e o PG, e 200 mg/kg para o BHA e o TBHQ (BRASIL, 1988), e de 200 mg/kg (sobre o teor lipídico) de BHA, BHT, PG e TBHQ em margarinas (BRASIL, 2005).

Os antioxidantes sintéticos, apesar de muito efetivos e altamente estáveis, podem provocar inflamações e formação de tumores (THOMPSON et al., 2001; BAUER et al., 2001). Países da União Europeia e o Canadá não permitem o uso de TBHQ em alimentos (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

A possível toxicidade de compostos sintéticos e a preferência dos consumidores por produtos de origem natural tem resultado em grande número de pesquisas sobre compostos bioativos, com o intuito de reduzir a utilização dos antioxidantes sintéticos.

2.3.2 Antioxidantes naturais

Dentre as fontes de antioxidantes naturais estão os materiais vegetais brutos como frutas, sementes, cereais, óleos e plantas medicinais. A presença de compostos fenólicos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos, antocianinas, taninos hidrolisáveis, lignanas, cumarinas, estilbenos, além do ácido ascórbico, tocoferóis e carotenoides, contribuem para os efeitos benéficos desses alimentos. Estes compostos, individualmente ou em sinergia, podem agir por diferentes mecanismos para conferir um sistema de defesa efetivo contra o ataque dos radicais livres (EL GHARRAS, 2009; OLIVEIRA et al., 2009; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

Tocoferóis e tocotrienóis são os antioxidantes naturais mais comuns encontrados, principalmente, em óleos vegetais. Existem quatro formas isoméricas do tocoferol: α , β , γ , e δ -tocoferol, sendo o α -tocoferol o mais abundante nos alimentos e o de maior atividade biológica como vitamina E. Sua atividade antioxidante reside no grupamento fenólico da sua estrutura, em que o tocoferol doa um hidrogênio ao radical peroxila (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008). No entanto, dependendo do sistema testado, da concentração, do tempo de oxidação e do método usado para acompanhar a oxidação, os tocoferóis podem agir como pró-oxidantes (FRANKEL, 1996). A concentração ótima para garantir a estabilidade oxidativa de óleo de soja está entre 340 e 660 mg.Kg⁻¹ de tocoferóis (EVANS; KODALI; ADDIS, 2002), embora a legislação brasileira permita a adição de 300 mg.kg⁻¹ de tocoferóis em óleos e gorduras, como aditivos intencionais, com função de antioxidante (BRASIL, 1988).

2.3.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos abrangem numerosos produtos do metabolismo secundário das plantas, geralmente envolvidos em mecanismos de defesa contra radiação e patógenos. Sua estrutura química básica é um anel aromático com um grupo hidroxila ligado a um dos carbonos do anel e, de acordo com o número de

anéis fenólicos e os grupamentos ligados a esses anéis, os compostos fenólicos podem ser classificados em: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos e lignanas. Além disso, eles podem estar associados a carboidratos e ácidos orgânicos (MANACH et al., 2004).

Os flavonoides possuem uma estrutura básica formada por dois anéis aromáticos (A e B) ligados por uma ponte de três carbonos, geralmente na forma de um anel heterocíclico com um oxigênio (C) (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001), e podem ser subdivididos em: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavanóis (catequinas e proantocianidinas) (MANACH et al., 2004). As figuras 2.4 e 2.5 representam a estrutura básica dos flavonoides e suas subclasses. Diferenças na estrutura química desses compostos é que vão determinar uma maior ou menor atividade antioxidante e sua solubilidade (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2004).

Diversos estudos sugerem que os flavonoides podem ter efeitos benéficos à saúde, como por exemplo, no câncer e em doenças cardíacas (PATIL et al., 2009).

Figura 2.4 – Estrutura básica dos flavonoides

Fonte: Adaptado de Yanishlieva-Maslarova (2001)

Figura 2.5 – Estrutura química dos flavonoides

Fonte: Adaptado de Belitz, Grosch e Schieberle (2004) e Manach (2004)

Os ácidos fenólicos (figura 2.6) são moléculas que possuem um grupamento carboxílico funcional ligado ao anel fenólico. Podem ser divididos em: derivados de ácido benzóico e derivados de ácido cinâmico. Os ácidos hidroxibenzoicos encontram-se na forma livre ou esterificada (MANACH et al., (2004). O ácido gálico (ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) é um exemplo clássico (POKORNÝ, 2003). Os ácidos hidroxicinâmicos são raramente encontrados na forma livre, mas como derivados glicosilados ou ésteres de ácido quínico, ácido chiquímico e ácido tartárico. Os principais representantes são os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico (EL GHARRAS, 2009).

Figura 2.6 – Estrutura química dos ácidos fenólicos

Fonte: Adaptado de Manach et al. (2004) e Yanishlieva-Maslarova (2001)

As lignanas são encontradas principalmente em sementes oleaginosas como a linhaça. A estrutura química básica são dois anéis fenilpropano ligados (MANACH et al., 2004).

O estilbeno mais conhecido é o resveratrol, encontrado principalmente em uva (MELO, 2010).

2.3.4 Especiarias com atividade antioxidante

As especiarias podem ser denominadas como as partes (raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes e talos) de uma ou mais espécies vegetais utilizadas de modo tradicional para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas (MADSEN; BERTELSEN, 1995; BRASIL, 2005).

Existem numerosos trabalhos na literatura que relatam a atividade antioxidante desses produtos, e em alguns casos, comparável aos antioxidantes sintéticos (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000; LI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; SHAN et al., 2005; SINGH et al., 2006; SZABO et al., 2010; WONG; LEONG; KOH, 2006).

A família *Lamiaceae* consiste em aproximadamente 3500 espécies que são nativas principalmente na área do Mediterrâneo, embora algumas tenham origem na Austrália, no Sudoeste da Ásia e na América do Sul (JUSTO et al., 2008). Alecrim (*Rosmarinus* sp.), manjerição (*Ocimum* sp.), manjerona (*Marjorana* sp.), orégano (*Origanum* sp.), tomilho (*Thymus* sp.) e sálvia (*Salvia* sp.) são exemplos conhecidos dessa família (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

O alecrim tem sido mais extensivamente estudado. É uma planta perene aromática, nativa da região do Mediterrâneo, cujo nome é derivado do latim *rosmarinus*, que significa "orvalho do mar" (SASIKUMAR, 2004). Seus extratos foram os primeiros a serem comercializados como antioxidantes naturais (YANISHLIEVA; MARINOVA, 2001) e tem sido usados em combinação com tocoferóis, observando-se sinergismo entre eles (SCHWARZ, 2002).

O nome *Origanum* tem origem grega, em que *oros* significa "montanha" e *ganos*, "alegria". É uma espécie que cresce espontaneamente nas montanhas do Mediterrâneo (KIRSTI KAARINA; SEIJA MARJATTA, 1998). Além do seu uso como agente de aroma e sabor, ele se destaca por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNÝ, 2006).

A sálvia é um arbusto nativo do Mediterrâneo, cujo nome é originário do latim *salvare*, "para curar ou salvar". Assim como o alecrim, tem sido usado desde antigamente para fins medicinais (SCHWARZ, 2002).

O tomilho é uma planta aromática utilizada como especiaria e para fins medicinais. O gênero *Thymus* é muito freqüente na região do Mediterrâneo, onde algumas espécies formam um tipo especial de vegetação arbustiva, bem adaptada

ao clima de verão quente e seco. O nome *Thymus* pode ter sido originado das palavras gregas *thyo* (perfume) ou *thymos* (força, coragem) (MORALES, 2002).

A atividade antioxidante de ervas e especiarias deve-se primariamente à presença de compostos fenólicos. Além dos já mencionados flavonoides e ácidos fenólicos, as especiarias apresentam principalmente terpenoides em sua constituição com reconhecida atividade antioxidante. Os diterpenos fenólicos encontram-se presentes principalmente no alecrim e na sálvia (SCHWARZ, 2002). A tabela 2.1 apresenta alguns desses compostos fenólicos.

Um dos primeiros estudos sobre especiarias foi realizado por Chipault et al. (1952), em que 32 espécies foram avaliadas quanto ao seu efeito antioxidante em banha. O alecrim e a sálvia exibiram maior efeito; orégano e tomilho também apresentaram resultados promissores. Essas especiarias também foram capazes de aumentar a estabilidade oxidativa de produtos assados.

Desde então, inúmeros estudos a respeito das propriedades antioxidantes dessas especiarias tem sido realizados, demonstrando a sua capacidade em reduzir radicais livres e de quelar metais (AMAROWICZ et al., 2009; ERKAN; AYRANCI; AYRANCI, 2008; GIÃO et al., 2007; JUSTO et al., 2008; MATA et al., 2007; SHAN et al., 2005; SU et al., 2007).

A eficiência antioxidante de extrato etanólico de alecrim em óleo de soja foi comparável à de uma mistura de BHA e BHT (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000). A adição de partes aéreas de alecrim ao azeite de oliva virgem foi capaz de retardar o processo oxidativo (AYADI; GRATI-RAMOUN; ATTIA, 2009). Extratos comerciais de alecrim foram mais eficientes em evitar a formação de compostos primários da oxidação em óleo de soja do que os antioxidantes BHT e α -tocoferol (SAMOTYJA; MAŁECKA, 2010). Babović et al. (2010) verificaram que o extrato de folhas secas de alecrim em óleo de girassol foi mais eficiente que o BHA e o extrato comercial de alecrim. Essa eficiência também foi verificada em alimentos de origem animal como anchovas (TURHAN; SAGIR; TEMIZ, 2009).

Dentre os compostos fenólicos analisados por Erkan, Ayranci e Ayranci (2008), o ácido carnósico apresentou maior atividade antioxidante em alecrim e teve seu mecanismo de ação antioxidante proposto por Masuda, Inaba e Takeda (2001). O ácido carnósico não é estável e pode se decompor em outros produtos fenólicos como éster metílico do ácido carnósico, carnosol, rosmanol, epirosmanol e 7-O-metilepirosmanol (BACKLEH; LEUPOLD; PARLAR, 2003).

Tabela 2.2 – Compostos fenólicos em algumas espécies da família *Lamiaceae*

Compostos fenólicos	Ervas e especiarias	Referência
Ácido 12-metilcarnósico	Alecrim e sálvia	Del Bano et al. (2003); Bonoli, Pelillo e Lercker (2003)
Ácido cafeico	Alecrim, sálvia, orégano e tomilho	Shan et al. (2005)
Ácido carnósico	Alecrim e sálvia	Frankel et al. (1996); Shan et al. (2005); Miura, Kikuzaki e Nakatani (2002)
Ácido gálico	Tomilho	Shan et al. (2005)
Ácido <i>p</i> -coumárico	Sálvia, orégano e tomilho	Shan et al. (2005)
Ácido rosmarínico	Alecrim, sálvia, orégano e tomilho	Frankel et al. (1996); Shan et al. (2005); Lagouri e Nisteropoulou (2009)
Ácido vanílico	Alecrim e sálvia	Zheng e Wang (2001)
Apigenina	Alecrim e sálvia	Wojdyło, Oszmiański e Czemerys (2007)
Campferol	Orégano	Shan et al. (2005)
Carnosol	Alecrim e sálvia	Frankel et al. (1996); Shan et al. (2005); Miura, Kikuzaki e Nakatani (2002)
Carvacrol	Orégano e tomilho	Schwarz, Ernst e Ternes (1996); Shan et al. (2005)
Catequina	Alecrim e sálvia	Shan et al. (2005)
Isorosmanol	Alecrim e sálvia	Nakatani e Inatani (1984); Miura, Kikuzaki e Nakatani (2002)
Epirosmanol	Alecrim e sálvia	Nakatani e Inatani (1984); Miura, Kikuzaki e Nakatani (2002); Shan et al. (2005)
Luteolina	Alecrim, sálvia e tomilho	Zheng e Wang (2001); Wojdyło, Oszmiański e Czemerys (2007)
Metilcarnosato	Alecrim e sálvia	Bicchi, Binello e Rubiolo (2000); Pizzale et al. (2002)
Quercetina	Sálvia	Wojdyło, Oszmiański e Czemerys (2007)
Rosmadiol	Alecrim e sálvia	Nakatani e Inatani (1983); Shan et al. (2005)
Rosmanol	Alecrim e sálvia	Nakatani e Inatani (1981); Inatani et al. (1982); Miura, Kikuzaki e Nakatani (2002)
Rosmariquinona	Alecrim	Mahmoud, AL-Shirhy e Son (2005)
Timol	Tomilho	Shan et al. (2005)

De acordo com Frankel et al. (1996), o extrato de alecrim e os compostos ácidos carnósico e rosmarínico foram significativamente mais ativos que o carnosol em óleo de milho. Em contraste, em sistema emulsionado, o extrato de alecrim, o ácido carnósico e o carnosol foram mais ativos que o ácido rosmarínico. Hernández-

Hernández et al. (2009) observaram que extratos de alecrim são antioxidantes mais eficientes que compostos fenólicos isolados.

Além da atividade antioxidante, vários estudos relatam as ações antimicrobiana e antifúngica e a capacidade de inibição da acetilcolinesterase do óleo essencial de alecrim (ANGIONI et al., 2004; BOZIN et al., 2007; MATA et al., 2007; WANG et al., 2008). A ação anti-inflamatória de extratos clorofórmicos de alecrim foi demonstrada por Altinier et al. (2007), com resultados semelhantes à indometacina, um fármaco anti-inflamatório.

Almeida-Doria e Regitano-d'Arce (2000) também verificaram que a eficiência do orégano em retardar a oxidação de óleo de soja é comparável a uma mistura de BHA e BHT. Em produtos cárneos, folhas secas da espécie *Origanum dictamnus* foram adicionadas em bolas de frango pré-cozidas (RACANICCI et al., 2004), e extratos de orégano adicionados em massa de carne de porco (HERNANDÉZ-HERNANDÉZ et al., 2009); em ambos os produtos, observou-se que houve eficiência antioxidante das especiarias. Efeito protetor de extrato de orégano na oxidação de manteiga foi observado por Amarowicz et al. (2009). O ácido rosmarínico tem sido relatado como responsável pela ação antioxidante e está presente em altas concentrações no orégano (HERNANDÉZ-HERNANDÉZ et al., 2009).

Em confronto com os antioxidantes sintéticos, a sálvia foi mais eficiente que o BHT em proteger o óleo de canola contra a oxidação (BANDONIENÉ et al., 2000) e comparável ao BHA em óleo de girassol (BABOVIĆ et al., 2010). Miura, Kikuzaki e Nakatani (2002) constataram que componentes presentes na sálvia possuem atividade antioxidante comparável ao BHT (miltirona, atuntzensina A, luteolina, 7-O-luteolina e eupafolina) e ao α -tocoferol (carnosol, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, galdosol e ácido carnósico).

O tomilho foi capaz de retardar a oxidação de azeite de oliva virgem, porém não mais eficiente que o alecrim (AYADI; GRATI-RAMOUN; ATTIA, 2009). A adição de extrato de tomilho à manteiga retardou seu processo oxidativo (AMAROWICZ et al., 2009). O ácido rosmarínico também é um dos compostos encontrados no tomilho com atividade antioxidante reconhecida (DORMAN et al., 2003; LAGOURI; NISTEROPOULOU, 2009; ZHENG; WANG, 2001).

Além do uso de compostos isolados e de extratos de especiarias individuais, a adição de misturas é um meio interessante de proteção contra a deterioração

oxidativa. Em estudo realizado por Almeida-Doria e Regitano-d'Arce (2000), a mistura de extratos de alecrim e orégano foi tão eficiente em retardar a oxidação de óleo de soja quanto uma mistura de BHA e BHT. Szabo et al. (2010) verificaram que o extrato etanólico obtido da mistura das ervas manjeriço (*Ocimum basilicum*), lovage (*Levisticum officinale*), manjerona (*Majorana hortensis*), milfoil (*Millefoli flos*), orégano (*Origanum vulgare*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e tomilho (*Thymus vulgaris*), em quantidades iguais, apresentou resultados comparáveis ao BHT em óleo de girassol e em banha.

Diversas outras especiarias também exibem ação antioxidante, como cominho, cúrcuma, louro, manjeriço, manjerona, entre outros (AMAROWICZ et al., 2009; HINNEBURG; DORMAN; HILTUNEN, 2006; JUN et al., 2001; VÁGI et al., 2005; RAVELLI, 2011; AK; GÜLÇIN, 2008; BRAGA et al., 2003; CHATTERJEE; VARIYAR; SHARMA, 2009).

Os alimentos de origem vegetal são misturas complexas de compostos bioativos. É importante conhecer os compostos individuais e sua concentração no alimento, uma vez que cada composto tem um efeito antioxidante diferente. No entanto, o efeito antioxidante do alimento é influenciado pela interação desses compostos entre si, bem como com o solvente utilizado na extração, e por compostos não identificados que podem ter ação antioxidante (EL GHARRAS, 2009).

2.3.5 Metodologias de extração

A eficiência antioxidante de determinados alimentos vegetais depende da presença de compostos fenólicos, sendo que a composição, a estrutura química e os efeitos interativos ou não destes compostos devem ser levados em consideração, bem como os fatores dos processos de extração (solvente e técnica utilizada, tamanho de partícula, tempo e temperatura, por exemplo). Além disso, fatores genéticos, condições ambientais e demais fatores influenciam a quantidade destas substâncias nos vegetais (MOURE et al., 2001).

A recuperação de compostos antioxidantes de ervas e especiarias pode ser feita na forma de extratos, óleos essenciais ou resinas. Os extratos são obtidos por solubilização das substâncias de interesse em solventes orgânicos ou não, ou através de extração com CO₂ supercrítico. Os óleos essenciais, além de serem isolados por extração (solvente ou CO₂), podem ser obtidos por destilação a vapor

ou por expressão mecânica a partir do material vegetal. Já as resinas são solúveis na maioria dos solventes orgânicos, e a maioria são terpenos e sesquiterpenos cíclicos, podendo conter pequenas quantidades de compostos fenólicos voláteis (BREWER, 2011).

Existem diversos métodos para a extração dos compostos antioxidantes em vegetais, no entanto, não existe uma metodologia mais eficiente. Dentre eles, podem ser citados os métodos de extração utilizando solventes líquidos (como acetona, água, etanol, éter e metanol) e a extração supercrítica com o dióxido de carbono (CO₂) (PINELO et al., 2007).

A influência dos solventes na extração tem sido bastante estudada. Chipault et al. (1952) realizaram a extração com etanol e éter de petróleo de 32 ervas, e na sua maioria, os extratos etanólicos exibiram maior atividade antioxidante. O teor de compostos fenólicos no extrato aquoso de *dittany* (*Origanum dictamnus* L.) foi maior que nos extratos metanólico, etanólico e acetônico (MØLLER et al., 1999). Li et al. (2007) compararam extratos aquosos, etanólicos (50%) e metanólicos (80%) de 32 ervas tradicionais chinesas, em que os dois primeiros extratos resultaram em melhor atividade antioxidante pelos métodos FRAP e ABTS e mais alto teor de compostos fenólicos. Extratos de orégano fresco e seco, obtidos com 80% de metanol, demonstraram alto teor de compostos fenólicos e apresentaram atividade antioxidante (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005). Lagouri e Nisteropoulou (2009) verificaram que o metanol foi mais eficiente que a acetona na extração de compostos fenólicos em tomilho. Em estudo realizado por Mata et al. (2007), extratos etanólicos e aquosos de funcho, alecrim, hortelã, poejo e tomilho exibiram boa atividade antioxidante. Extratos aquoso e etanólico de sementes de funcho também exibiram atividade antioxidante. (OKTAY; GYLÇIN; KYFREVIÖĞLU, 2003). Extratos etanólico e aquoso de louro apresentam compostos fenólicos em sua composição e sua atividade antioxidante foi demonstrada em diversos métodos *in vitro* (ELMASTAŞ et al., 2006). Extratos etanólico e aquoso de endro exibiram atividade antioxidante, assim como extratos etanólicos de suas flores (MOHAMMAD AL-ISMAIL; ABURJAI, 2004; SHYU et al., 2009).

Mesmo sob condições mais drásticas de aceleração da oxidação através do método Rancimat, extratos de tomilho (SIMANDI et al., 2001) e de manjerona (*Origanum majorana* L.) obtidos por extração supercrítica e com etanol (e também n-hexano, para o último) mostraram atividade antioxidante, sendo que a atividade

antioxidante foi significativamente maior usando solvente polar (etanol) na extração da manjerona (VÁGI et al., 2005).

Sob o ponto de vista toxicológico, etanol e água são solventes mais seguros que acetona, metanol e outros solventes orgânicos, sendo assim, mais aceitáveis para a indústria de alimentos (OKTAY; GÜLÇİN; KÜFREVOĞLU, 2003). Solventes de maior polaridade, como etanol e água, ou sua mistura são eficazes na extração de compostos fenólicos (MELO, 2010).

A atividade antioxidante de especiarias não depende somente da presença e concentração de compostos fenólicos, mas também da metodologia de extração e do solvente (HERNANDÉZ-HERNANDÉZ et al., 2009).

2.3.6 Metodologias de avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

O conhecimento sobre os constituintes dos alimentos responsáveis pela ação antioxidante tem sido alvo de interesse de pesquisadores, profissionais da área da saúde e de alimentos, e consumidores. No entanto, a separação e o estudo de cada composto antioxidante são onerosos e inviáveis devido à complexidade da composição dos alimentos. Dessa forma, o desenvolvimento de métodos rápidos para a determinação da ação antioxidante é importante, apesar de ensaios baseados em reações químicas *in vitro* não parecerem representativos em situações reais (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Deseja-se que um ensaio seja capaz de reproduzir situações reais e de quantificar o resultado por meio de um padrão adequado (ANTOLOVICH et al., 2002).

Os antioxidantes podem ser avaliados tanto pela habilidade de sequestro de espécies reativas no meio reacional quanto pela eficiência em inibir a peroxidação lipídica (OLIVEIRA et al., 2009).

Várias revisões foram realizadas a respeito dos métodos de avaliação da capacidade antioxidante (ALI et al., 2008; ANTOLOVICH et al., 2002; BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004; MOON; SHIBAMOTO, 2009; OLIVEIRA et al., 2009; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005; SÁNCHEZ-MORENO, 2002; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). No entanto, o grande problema é a falta de validação ou padronização desses métodos, o que torna difícil a comparação entre os resultados das metodologias empregadas (HUANG; OU; PRIOR, 2005). A grande diversidade de métodos analíticos também torna difícil a seleção do método mais adequado.

2.3.6.1 Métodos de sequestro de espécies reativas geradas no meio reacional

Os métodos baseados no sequestro de radicais livres mais utilizados são: DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), FRAP (Poder antioxidante de redução do ferro) e ORAC (Capacidade de absorvência do radical oxigênio) (HUANG; OU; PRIOR, 2005; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

2.3.6.1.1 DPPH

O método de sequestro do radical livre DPPH é capaz de determinar a atividade antioxidante de extratos de especiarias e compostos puros, e se destaca por sua facilidade de execução e rapidez (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; MENSOR et al., 2001), apesar de apresentar algumas desvantagens como o gasto significativo de reagentes, padrão e amostras, e o número de amostras a serem analisadas ao mesmo tempo ser restrito (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Ele se baseia no sequestro do radical DPPH pelos compostos antioxidantes. O DPPH é um radical livre relativamente estável, que, em solução, apresenta uma coloração púrpura. Ao receber um átomo de hidrogênio de um antioxidante, sofre uma reação de redução e perda da coloração (Figura 2.7). Essa descoloração pode ser acompanhada através da medida de absorvência na faixa do UV a 517 nm (BLOIS, 1958; MOLINEUX, 2004). A atividade antioxidante de uma amostra é geralmente expressa em termos de micromoles de equivalentes de Trolox por 100 g de amostra (ET/100 g) (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Figura 2.7 – Reação química do radical DPPH e um antioxidante

Fonte: Adaptado de Bois (1958) e Molineux (2004)

O DPPH é um radical que não apresenta qualquer semelhança estrutural com os radicais peroxila envolvidos na peroxidação lipídica, sendo assim, muitos

antioxidantes que reagem rapidamente com os radicais peroxila podem reagir lentamente ou até mesmo serem inertes ao DPPH (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Dessa forma, se faz necessária a execução de outros ensaios de capacidade antioxidante com base em sistemas lipídicos.

2.3.6.1.2 ABTS

Esse método baseia-se na descoloração do radical catiônico ABTS. Por meio de uma reação com persulfato de potássio, o ABTS é oxidado a um radical catiônico ABTS, que é um cromóforo verde/azul. Na presença de um antioxidante, esse radical é reduzido, e a medida é obtida como porcentagem de inibição da absorbância a 734 nm, sendo os resultados expressos em equivalente de Trolox. O radical ABTS reage rapidamente com antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos (RE et al., 1999).

2.3.6.1.3 FRAP

O método FRAP é baseado na redução do complexo férrico (Fe^{3+}) - 2,4,6-tripiridyl-s-triazine (TPTZ) ao complexo ferroso (Fe^{2+}), em condições de baixo pH. Esta redução é monitorada pelo aparecimento de uma coloração azul em 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996). Os resultados do poder antioxidante de redução do ferro podem ser expressos como equivalente em micromoles de Trolox/grama de amostra (em base seca) ou equivalente em milimols de Fe^{2+} /Kg. É um método rápido, simples, com resultados reprodutíveis, sua única desvantagem é que o sistema deve ser aquoso (MOON; SHIBAMOTO, 2009; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

2.3.6.1.4 ORAC

O método ORAC usa marcadores fluorescentes oxidáveis e 2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) como um gerador de radical peroxila. A capacidade de absorção do radical oxigênio é medida pela perda de fluorescência e pode ser expressa como equivalente em μM de Trolox/L ou g de amostra (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001).

Giada e Mancini-Filho (2009) compararam os métodos FRAP, DPPH e ORAC e observaram que eles se correlacionaram de forma positiva. Apesar dos diferentes mecanismos de reação e métodos de quantificação, os valores de capacidade

antioxidante encontrados nos métodos foram comparáveis, e a escala de atividade seguiu uma tendência similar, mostrando que podem ser utilizados para determinar a capacidade antioxidante isoladamente. Prado (2009) avaliou a atividade antioxidante usando os métodos ABTS e DPPH. Em ambos os métodos, os resultados seguiram a mesma tendência, indicando a semelhança do mecanismo de reação em sequestrar os radicais livres e a ação das mesmas substâncias presentes nos extratos estudados que contribuíram para a atividade.

2.3.6.2 Métodos de inibição da oxidação lipídica / métodos em sistemas lipídicos

Esses métodos de avaliação da atividade antioxidante são baseados na habilidade dos antioxidantes em controlar a extensão da oxidação (ANTOLOVICH et al., 2002). Em situações de processo, torna-se fundamental avaliar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras para que a qualidade das matérias-primas e dos produtos prontos para comercialização seja garantida (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

A inibição da oxidação lipídica é determinada pela capacidade dos antioxidantes em retardar a formação de produtos resultantes desse processo, como peróxidos e dienos conjugados (ANTOLOVICH et al., 2002). O parâmetro usualmente utilizado é o período de indução, que corresponde ao tempo em que a oxidação ocorre de modo lento e estável, até atingir um ponto em que a velocidade da oxidação se torna exponencial (HAMILTON, 1994). A determinação do estado de oxidação de óleos e gorduras ou do efeito antioxidante pode ser realizada sob condições normais de armazenamento ou de oxidação acelerada. No primeiro caso, os testes são demorados e podem levar meses. Dessa forma, métodos que requerem menor tempo para obtenção de resultados ganham particular importância, principalmente para a indústria. Assim, os testes acelerados mais comumente utilizados envolvem tratamento térmico e/ou oxigenação intensa (VERLEYEN; VAN DICK; ADAMS, 2005).

Os testes de oxidação acelerada requerem equipamentos simples e são específicos para a análise da oxidação em alimentos. Dentre os métodos acelerados estão o teste de estufa ou *Schaal Oven Test*, o teste de Swift ou Método do Oxigênio Ativo e o Rancimat (ANTOLOVICH et al., 2002; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

2.3.6.2.1 Teste acelerado em estufa

É o método de oxidação acelerada mais conhecido. Amostras de óleos são armazenadas em estufa a temperatura constante, geralmente entre 60 e 70 graus. Em intervalos de tempo específicos, as amostras são avaliadas quanto ao índice de peróxido e a absortividade no UV. Dentre os métodos de aceleração da oxidação, ele é o mais adequado para prever o *shelf-life* de óleos (KRISTOTT, 2000).

Apesar de o aquecimento ser o meio mais utilizado e o mais eficiente para acelerar a oxidação e permitir o seu acompanhamento, e de as baixas temperaturas permitirem as melhores correlações com o ambiente, existem condições alternativas como a alta iluminação e a extrema temperatura, cuja finalidade também é acelerar a oxidação dos óleos e gorduras. De acordo com Vieira e Regitano-d'Arce (1998), o aquecimento por microondas pode ser utilizado para comparar a estabilidade oxidativa de diferentes óleos, assim como o teste de estufa. Segundo Siqueira (1998), o teste acelerado de fotoxidação e o armazenamento ao ambiente correlacionaram-se de forma positiva, demonstrando a viabilidade da aplicação do teste acelerado em câmara de luz para avaliar a estabilidade oxidativa de óleos. O teste de fotoxidação acelerada é vantajoso, pois requer curto período de tempo e a intensidade da fonte de luz pode ser controlada.

Um único método não é capaz de prever o comportamento de uma amostra, sendo necessário, no mínimo, dois métodos para caracterizar seu grau de oxidação (KRISTOTT, 2000). Para a escolha apropriada dos métodos, torna-se necessário conhecer o mecanismo de oxidação lipídica, que incluem inicialmente a formação de radicais lipídicos livres; compostos primários (os hidroperóxidos); e finalmente a formação de compostos secundários e terciários (KAMAL-ELDIN; POKORNÝ, 2005).

2.3.6.2.1.1 Índice de Peróxido (IP)

Esse parâmetro representa o conteúdo total de hidroperóxidos e peróxidos de hidrogênio formados nos estágios iniciais da oxidação de óleos e gorduras (KRISTOTT, 2000). O termo índice de hidroperóxido seria mais apropriado, uma vez que os hidroperóxidos participam da reação quantitativamente, enquanto peróxidos reagem apenas parcialmente (POKORNÝ, 2005).

A análise por titulação é comumente empregada, por ser um método rápido, simples e não requerer nenhum equipamento específico. Esse método envolve uma titulação iodométrica, em que o iodeto é oxidado a iodo pelos hidroperóxidos. O iodo

produzido é então titulado com solução de tiosulfato padrão e o amido é utilizado como indicador do ponto final da reação. Como a quantidade de iodo é proporcional à de hidroperóxido, a determinação pode ser feita através da medida do volume de tiosulfato gasto para titular o iodo presente na amostra (AOCS, 2003; POKORNÝ, 2005; SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008). As reações e a estequiometria estão indicadas abaixo (Figura 2.8):

Figura 2.8 – Mecanismo de determinação do Índice de peróxido por titulação iodométrica

Fonte: Adaptado de Antolovich et al. (2002)

Os resultados são normalmente expressos em miliequivalentes de oxigênio ativo por kg de amostra (mEq O₂/kg), mas podem ser expressos em milimols de oxigênio ativo por kg de amostra (mmol O₂/kg) (POKORNÝ, 2005).

O uso de solventes orgânicos e de amostra em altas quantidades é uma desvantagem da titulação iodométrica. A possível fixação do iodo liberado às ligações insaturadas dos ácidos graxos, levando a resultados subestimados, a oxidação do iodeto pelo oxigênio dissolvido no meio, a dificuldade em determinar o ponto final da titulação em baixos níveis de peróxidos, bem como variações na reatividade de diferentes peróxidos limitam o uso desse método analítico (POKORNÝ, 2005; GRAY, 1978 apud SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008; SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008).

O método espectrofotométrico com tiocianato férrico é uma alternativa ao método titulométrico, e pode detectar hidroperóxidos presentes em baixas concentrações. O princípio é baseado na habilidade de hidroperóxidos em oxidar íons ferrosos (Figura 2.9). Complexos formados com o íon férrico e o tiocianato apresentam uma coloração vermelha e exibem absorbância em 500-510 nm. É um método útil na avaliação de óleos e alimentos lipídicos (BELITZ; GROSCH, SCHIEBERLE, 2004; DOBARGANES; VELASCO, 2002; KIOKIAS et al., 2010; SHANTA; DECKER, 1994).

Figura 2.9 – Reações de determinação do Índice de peróxido pelo método do tiocianato férrico

Fonte: Adaptado de Kiokias et al. (2010)

Os hidroperóxidos e peróxidos se decompõem em outros produtos, e um baixo IP não significa necessariamente que a amostra analisada possui boa qualidade. O IP, no entanto, é de grande valia na avaliação da atividade antioxidante durante os primeiros estágios da oxidação lipídica em condições brandas (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

2.3.6.2.1.2 Absortividade na região do ultravioleta

Esse método se baseia na determinação de dienos e trienos conjugados dos ácidos linoleico e linolênico, formados durante os estágios iniciais da formação de hidroperóxidos, cuja medida é feita através da leitura espectrofotométrica em UV (KRISTOTT, 2000).

Em 230-235 nm absorvem predominantemente os dienos conjugados (DOBARGANES; VELASCO, 2002) e em 268, trienos conjugados (SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008). Produtos como aldeídos e cetonas também exibem absorção em torno de 265 nm (ROVELLINI; CORTESI; FEDELI, 1997). A medida espectrofotométrica da absorbância entre 220 e 320 nm (varredura) ou pontualmente em 232 e 268 nm, de uma solução da amostra diluída num solvente opticamente transparente, como o isooctano (IUPAC, 1979).

Essa análise pode prover informações sobre a qualidade do óleo, seu estado de preservação e mudanças durante o processamento ou armazenamento. O efeito antioxidante de substâncias pode ser avaliado através do monitoramento da formação de dienos conjugados (MOON; SHIBAMOTO, 2009) e é normalmente usada para comparação de amostras (ANTOLOVICH *et al.*, 2002).

Os dienos conjugados normalmente não ocorrem em ácidos graxos insaturados. No entanto, são facilmente formados durante a oxidação a partir de

uma molécula com duas ligações duplas separadas por um único grupo metilênico, que ocorre mais comumente em ácidos graxos poli-insaturados (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

Esse método é muito útil devido à sua simplicidade e pode ser usado para acompanhar as fases iniciais do processo de oxidação. Todavia, mesmo em sistemas lipídicos simples, a análise por espectrometria de UV é uma medida genérica, fornecendo pouca informação sobre a estrutura dos compostos. A principal desvantagem deste método é que muitos compostos biológicos e naturais possuem absorbância significativa em torno de 234 nm, interferindo nos resultados de absorbância (ANTOLOVICH et al., 2002; MOON; SHIBAMOTO, 2009).

2.3.6.2.2 Determinação da estabilidade oxidativa pelo Rancimat

O Rancimat é um aparelho desenvolvido para a determinação automatizada do período de indução. Esse teste baseia-se na oxidação forçada através da injeção de fluxo de ar contínuo e temperatura elevada (80 e 120°C) definidos. Os compostos voláteis, que são formados durante a oxidação das amostras de óleo, são coletados em um frasco contendo água destilada. Muitos desses compostos são ácidos de baixo peso molecular, que mudam a condutividade da água, a qual é medida continuamente, e o período de indução é determinado no ponto de inflexão em que a condutividade aumenta exponencialmente. Portanto, os resultados podem ser obtidos mais rapidamente em comparação ao armazenamento e ao teste acelerado em estufa (KRISTOTT, 2000). Quanto maior for o período de indução de uma amostra adicionada de antioxidantes, maior será a proteção oferecida à instalação do ranço.

Esse método apresenta algumas inconveniências, tais como: obtenção de resultados mensuráveis em condições elevadas de oxidação; os produtos de decomposição são de natureza diferente dos obtidos nas condições normais de armazenamento, e impossibilidade de avaliação da capacidade antioxidante de compostos termolábeis (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

A figura 2.10 representa o esquema de funcionamento do Rancimat.

Figura 2.10 – Esquema do Rancimat

Fonte: Adaptado de Jain e Sharma (2010)

2.4 Considerações finais

A oxidação lipídica é a grande responsável pela formação de compostos de aroma e sabor indesejáveis. O controle de fatores como temperatura, tempo de armazenamento, luz, presença de metais, presença de oxigênio, e a utilização de substâncias antioxidantes são necessários a fim de retardar o processo oxidativo e garantir a qualidade sensorial e nutricional de alimentos lipídicos.

Com o objetivo de substituir os aditivos alimentares sintéticos ou reduzir seu uso, os antioxidantes naturais tem sido muito pesquisados quanto à fonte (frutas, vegetais e especiarias), composição nos alimentos e avaliação da capacidade de sequestro dos radicais livres.

Apesar de numerosos estudos sobre os compostos antioxidantes, há uma grande variedade de métodos de extração, bem como de avaliação da capacidade antioxidante, o que torna a comparação uma tarefa difícil. Além disso, a extração desses compostos é afetada por diversos fatores como tempo, temperatura, porcentagem de solvente, entre outros, que devem ser estudados a fim de verificar as condições ótimas de extração.

Referências

- AK, T.; GÜLÇİN, İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v.174, n.1, p.27-37, 2008.
- ALI, S.S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, Barking, v.41, n.1, p.1-15, 2008.
- ALMEIDA-DORIA, R.F.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.20, n.2, p.197-203, 2000.
- ALTINIER, G.; SOSA, S.; AQUINO, R.P.; MENCHERINI, T.; LOGGIA, R.D.; TUBARO, A. Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.55, n.5, p.1718-1723, 2007.
- AMAROWICZ, R.; ŻEGARSKA, Z.; RAFAŁOWSKI, R.; PEGG, R.B.; KARAMAĆ, M.; KOSIŃSKA, A. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of ethanolic extracts of thyme, oregano, and marjoram. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.111, n.11, p.1111-1117, 2009.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices**. Champaign, 2003. 1v.
- ANDERSON, K.; LINGNERT, H. Kinetic studies of oxygen dependence during initial lipid oxidation in rapeseed oil. **Journal of Food Science**, Chicago, v.64, n.2, p.262-266, 1999.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COÏSSON, J.D.; ARLORIO, M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.52, n.11, p.3530-3535, 2004.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, London, v.127, n.1, p.183-198, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em: <<http://www.abiove.com.br>>. Acesso em: 01 jun 2012.

AYADI, M.A.; GRATI-KAMOUN, N.; ATTIA, H. Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.47, n.10, p.2613-2619, 2009.

BABOVIĆ, N.; ŽIŽOVIĆ, I.; SAIČIĆ, S.; IVANOVIĆ, J.; PETROVIĆ, S. Oxidative stabilisation of sunflower oil by antioxidant fractions from selected *Lamiaceae* herbs. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, Belgrade, v.16, n.4, p.287-293, 2010.

BAILEY, A.E. **Bailey's industrial oil and fat products**. 5 th. New York: John Wiley, 1996. 560p.

BAKLEH, M.; LEUPOLD, G.; PARLAR, H. Rapid quantitative enrichment of carnosic acid from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by isoelectric focused adsorptive bubble chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n.5, p.1297-1301, 2003.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence and potential uses. **Food Chemistry**, Barking, v.99, n.1, p.191-203, 2006.

BANDONIENĖ, D.; PUKALSKAS, A.; VENSKUTONIS, P.R.; GRUZDIENĖ, D. Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. **Food Research International**, Barking, v.33, n.9, p.785-791, 2000.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.1, p.113-123, 2006.

BAUER, A.K.; DWYER-NIELD, L.D.; HANKIN, J.A.; MURPHY, R.C.; MALKINSON, A.M. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. **Toxicology**, Limerick, v.169, n.1, p.1-15, 2001.

BECKER, E.M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant evaluation protocols: Food quality and health effects. **European Food Research Technology**, Berlin, v.219, n.6, p.561-571, 2004.

BELITZ, H.-D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 3 rd ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2004. 1070p.

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**, New York, v.239, n.1, p.70-76, 1996.

BICCHI, C.; BINELLO, A.; RUBIOLO, P. Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis. **Phytochemical Analysis**, Sussex, v.11, n.4, p.236-242, 2000.

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

BONOLI, M.; PELILLO, M.; LERCKER, G. Fast separation and determination of carnosic acid and rosmarinic acid in different rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts by capillary zone electrophoresis with ultra violet-diode array detection. **Chromatographia**, New York, v.57, n.7-8, 505, 512, 2003.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIC, I.; JOVIN, E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.55, n.19, p.7879-7885, 2007.

BRAGA, M.E.M.; LEAL, P.F.; CARVALHO, J.E.; MEIRELES, M.A.M. Comparison of yield, composition, and antioxidant activity of turmeric (*Curcuma longa* L.) extracts obtained using various techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.51, n.22, p.6604-6611, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, London, v.28, n.1, p.25-30, 1995.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 23, de 15 de fevereiro de 2005. Aprova "Regulamento Técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleos e gorduras - subcategoria creme vegetal e margarinas". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 16 fev. 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 05 ago. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova "REGULAMENTO TÉCNICO PARA ÓLEOS VEGETAIS, GORDURAS VEGETAIS E CREME VEGETAL". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 set. 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 05 ago. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde (CNS). Resolução nº 4, de 24 de novembro de 1988. Aprova revisão das Tabelas I, III, VI e V referentes a Aditivos Intencionais, bem como os Anexos I, II, III e VII, todas do Decreto nº 55.871, de 26 de março de 1965. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 dez. 1988. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 05 ago. 2011.

BREWER, M.S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v.10, n.4, p.221-247, 2011.

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. **Food Chemistry**, Barking, v.93, n.2, p. 223-226, 2005.

CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO). Codex Standard for Named Vegetable Oils, CODEX STAN 210-1999. Disponível em <<http://www.codexalimentarius.org>>. Acesso em: 20 out 2012.

CHATTERJEE, S.; VARIYAR, P.S.; SHARMA, A. Stability of lipid constituents in radiation processed fenugreek seed and turmeric: role of phenolic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.57, n.19, p.9226-9233, 2009.

CHIPAULT, J.R.; MIZUNO, G.R.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O. The antioxidant properties of natural spices. **Food Reviews International**, New York, v.17, n.1-6, p.46-55, 1992.

DEL BAÑO, M.J.; LORENTE, J.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; DEL RÍO, J.A.; ORTUÑO, A.; QUIRIN, K.; GERARD, D. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.51, n.15, p.4247-4253, 2003.

DOBARGANES, M.C.; VELASCO, J. Analysis of lipid hydroperoxides. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.104, n.7, p.420-428, 2002.

DORMAN, H.J.D.; PELTOKETO, A.; HILTUNEN, R.; TIKKANEN, M.J.
Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected *Lamiaceae* herbs. **Food Chemistry**, Barking, v.83, n.2, p.255-262, 2003.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M.
Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p.446-452, 2006.

EL GHARRAS, H. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.44, n.12, p.2512-2518, 2009.

ELMASTAŞ, M.; GÜLÇİN, İ.; İŞILDAK, Ö.; KÜFREVİOĞLU, Ö.İ.; İBAOĞLU, K.; ABOUL-ENEIN, H.Y. Radical scavenging activity and antioxidant capacity of bay leaf extracts. **Journal of the Iranian Chemical Society**, Tehran, v.3, n.3, p.258-266, 2006.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, Barking, v.110, n.1, p.76-82, 2008.

ESKIN, N.A.M.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidants and shelf life of foods. In: ROBINSON, D.S.; ESKIN, N.A.M. (Ed.). **Food shelf life stability**: chemical, biochemical and microbiological changes, Boca Raton: CRC Press, 2000. chap.6, p.175-209.

EVANS, J.C.; KODALI, D.R.; ADDIS, P.B. Optimal tocopherol concentrations to inhibit soybean oil oxidation. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v.79, n.1, p.47-51, 2002.

FARIA, E.A.; LELES, M.I.G.; IONASHIRO, M.; ZUPPA, T.O.; ANTONIOSI, F.N.R. Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. **Eclética Química**, São Paulo, v.27, p.111-119, 2002.

FRANKEL, E.N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. **Food Chemistry**, Barking, v.57, n.1, p.51-55, 1996.

FRANKEL, E.N.; HUANG, S-W.; AESCHBACH, R.; PRIOR, E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.44, n.1, p.131-135, 1996.

GIADA, M.D.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant capacity of the striped sunflower (*Helianthus annuus* L.) seed extracts evaluated by three in vitro methods. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v.60, n.5, p.395-401, 2009.

GIÃO, M.S.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M.L.; RIVERO-PÉREZ, M.D.; PEREIRA, C.I.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Infusions of Portuguese medicinal plants: dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v.87, n.14, p.2638-2647, 2007.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.18, n.1, p.125–126, 1995.

HAMILTON, R.J. The chemistry of rancidity in foods. In: ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. (Ed.). **Rancidity in foods**. Glasgow: Chapman & Hall. 1994. chap.1, p.1-21.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E.; PONCE-ALQUICIRA, E.; JARAMILLO-FLORES, M.E.; LEGARRETA, G.I. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. **Meat Science**, Barking, v.81, n.2, p.410-417, 2009.

HINNEBURG, I.; DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, Barking, v.97, n.1, p.122-129, 2006.

HRAS, A. R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. **Food Chemistry**, Barking, v.71, n.2, p.229-233, 2000.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.

INATANI, R.; NAKATANI, N.; FUWA, H.; SETO, H. Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.).

Agricultural and Biological Chemistry, Tokyo, v. 46, n.6, p.1661-1666, 1982.

JAIN, S.; SHARMA, M.P. Review of different test methods for the evaluation of stability of biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v.14, n.7, p.1937-1947, 2010.

JUN, W.J.; HAN, B.K.; YU, K.W.; KIM, M.S.; CHANG, I.S.; KIM, H.Y.; CHO, H.Y. Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. **Food Chemistry**, Barking, v.75, n.4, p.439-444, 2001.

JUSTO, O.R.; MORAES, A.M.; BARRETO, G.P.M.; MERCADANTE, A.Z.; VIEIRA E ROSA, P.T. Evaluation of the antioxidant potential of plant extracts obtained by supercritical fluid extraction. **Química Nova**, São Paulo, v.31, n.7, p.1699-1705, 2008.

KAMAL-ELDIN, A.; POKORNÝ, J. Lipid oxidation products and methods used for their analysis. In: KAMAL-ELDIN, A.; POKORNÝ, J. (Ed.). **Analysis of Lipid Oxidation**. Illinois: AOCS Press, 2005. chap.1, p.1-7.

KIOKIAS, S.; VARZAKAS, T.H.; ARVANITOYANNIS, I.S.; LABROPOULOS, A.E. Lipid oxidation and control of oxidation. In: YILDIZ, F. (Ed.). **Advances in Food Biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2009, chap.12, p.383-408.

KIRSTI KAARINA, P. K. N.; SEIJA MARJATTA, M. K. Processing, effects and use of Oregano and marjoram in foodstuffs and in food preparation. In: SOMERVILLE, G. (Ed.). **The Design Life of Structures**. London: Spon Press, 1998.

KRISTOTT, J. Fats and oils. In: KILCAST, D.; SUBRAMANIAM, P. (Ed.). **The stability and shelf-life of food**. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 2000. chap.12, p.279-310.

LAGOURI, V.; NISTEROPOULOU, E. Antioxidant properties of *O. onites*, *T. vulgaris* and *O. basilicum* species grown in Greece and their total phenol and rosmarinic acid content. **Journal of Food Lipids**, Trumbull, v.16, n.4, p.484-498, 2009.

LI, H.; JIANG, Y.; WONG, C.; CHENG, K.; CHEN, F. Evaluation of two methods for the extraction of antioxidants from medicinal plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.388, n.2, p.483-488, 2007. MADSEN, H.L.; BERTELSEN,

G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.6, n.8, p.271-277, 1995.

MAHMOUD, A.A.; AL-SHIRHY, S.S.; SON, B.W. Diterpenoid quinones from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Phytochemistry**, New York, v.66, n.14, p.1685-1690, 2005.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v.79, n.5, p.727-747, 2004.

MARIUTTI, L.R.B; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em produtos alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.10, n.2, p.96-103, 2007.

MASUDA, T.; INABA, Y.; TAKEDA, Y. Antioxidant mechanism of carnosic acid: structural identification of two oxidation products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.49, n.11, p.5560-5565, 2001.

MATA, A.T.; PROENÇA, T.; FERREIRA, A.R.; SERRALHEIRO, M.L.M.; NOGUEIRA, J.M.F.; ARAÚJO, M.E.M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, Barking, v.102, n.3, p.778-786, 2007.

MOHAMMAD AL-ISMAIL, K.M.; ABURJAI, T. Antioxidant activity of water and alcohol extracts of chamomile flowers, anise seeds and dill seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.84, n.2, p.173-178, 2004.

MELO, P. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**. 2010. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS SANTOS, T.C.; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of dp_{ph} free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v.15, n.2, p.127-130, 2001.

- MIURA, K.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.50, n.7, p.1845-1851, 2002.
- MOLINEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Hat Yai, v.26, n.2, p.211-219, 2004.
- MØLLER, J.K.S.; MADSEN, H.L.; AALTONEN, T.; SKIBSTED, L.H. Dittany (*Origanum dictamnus*) as a source of water-extractable antioxidants. **Food Chemistry**, Barking, v.64, n.2, p.215-219, 1999.
- MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.57, n.5, p.1655-1666, 2009.
- MORALES, R. The history, botany and taxonomy of the genus *Thymus*. In: STAHL-BISKUP, E.; SÁEZ, F. (Ed). **Thyme: the genus *Thymus***. London:Taylor & Francis, 2002. chap.1, p.1-43.
- MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influence of spice phenolic compounds on lipoperoxidation and lipid profile of rats tissues. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n.4, p.411-424, 2004.
- MOURE, A.; CRUZ, J.M.; FRANCO, D.; DOMINGUEZ, J.M.; SINEIRO, J.; DOMINGUEZ, H.; NUÑEZ, M.J.; PARAJÓ, J.C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, Barking, v.72, n.2, p.145-171, 2001.
- NAKATANI, N.; INATANI, R. Structure of rosmanol, a new antioxidant from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 45, n.10, p.2385-2386, 1981.
- NAKATANI, N.; INATANI, R. A new diterpene lactone rosmadial, from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 47, n.2, p.353-358, 1983.
- NAKATANI, N.; INATANI, R. Two antioxidative diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and a revised structure for rosmanol. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 48, n.8, p.2081-2085, 1984.

NAZ, S.; SIDDIQI, R.; SHEIKH, H.; SAYEED, S.A. Deterioration of olive, corn and soybean oils due to air, light, heat and deep-frying. **Food Research International**, Amsterdam, v.38, n.2, p.127-134, 2005.

OKTAY, M.; GÜLÇİN, I.; KÜFREYİOĞLU, I. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v.36, n.2, p. 263-271, 2003.

OLIVEIRA, A. De O.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TRAVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v.32, n.3, p. 689-702, 2009.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.49, n.10, p.4619-4626, 2001.

PATIL, B.S.; JAYAPRAKASHA, G.K.; MURTHY, K.N.C.; VIKRAM, A. Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.57, n.18, p.8142-8160, 2009.

PINELO, M.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; SINEIRO, J.; SEÑORÁNS, F.J.; REGLERO, G.; NÚÑEZ, M.J. Supercritical fluid and solid-liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study. **European Food Research and Technology**, Berlin, v.226, n.1-2, p.199-205, 2007.

PIZZALE, L.; BORTOLOMEAZZI, R.; VICHI, S.; ÜBEREGGER, E.; CONTE, L.S. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.82, n.14, p.1645-1651, 2002.

POKORNÝ, J. Natural antioxidants. In: ZEUTHEN, P.; BØGH-SØRENSEN, L. **Food Preservation Techniques**. Cambridge, Woodhead Publishing Limited, 2003. p.31-48.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 107p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, n.10, p.4290-4302, 2005.

RACANICCI, A.M.C.; DANIELSEN, B.; MENTEN, J.F.M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant effect of dittany (*Origanum dictamnus*) in pre-cooked chicken meat balls during chill-storage in comparison to rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **European Food Research and Technology**, Berlin, v.218, n.6, p.521-524, 2004.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v.29, n.4, p.755-760, 2006.

RAVELLI, D. **Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias**: correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial. 2011. 113p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v.26, n.9–10, p.1231-1237, 1999.

REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Deterioração de lipídeos – ranço. In: OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manole, 2006. cap.6, p.243-299.

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R. Antioxidants. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. (Ed.). **Food Lipids**: chemistry, nutrition and biotechnology, 3 rd ed., Nova York: CRC Press, 2008. chap.15, p.409-434.

ROVELLINI, P.; CORTESI, N.; FEDELI, E. Ossidazioni dei lipidi. Nota 1. **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, Milano, v.74, p.181-189, 1997.

SAMOTYJA, U.; MAŁECKA, M. Antioxidant activity of blackcurrant seeds extract and rosemary extracts in soybean oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.112, n.12 p.1331–1336, 2010.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, London, v.8, n.3, p.121-137, 2002.

SASIKUMAR, B. Rosemary. In: PETER, K.V. (Ed.). **Handbook of Herbs and Spices**. Volume 2. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 2004. chap. 16, p.243-255.

SCHWARZ, K. Phenolic diterpenes from rosemary and sage. In: SHI, J.; MAZZA, G.; LE MAGUER, M. (Ed.). **Functional foods: biochemical and processing aspects**, volume 2. New York: CRC Press, 2002. chap.6, p..

SCHWARZ, K.; ERNST, H.; TERNES, W. Evaluation of antioxidative constituents from thyme. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.70, n.2, p.217–223, 1996.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U.N. Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. (Ed). **Food Lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**, 3 rd ed., Nova York: CRC Press, 2008. chap.14, p.347-408.

SHAN, B.; CAI, Y.Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, n.20, p.7749-7759, 2005.

SHANTA, N.C.; DECKER, E.A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. **Journal of the AOAC International**, Maryland, v.77, n.2, 1994.

SHYU, Y-S.; LIN, J-T.; CHANG, Y-T.; CHIANG, C-J.; YANG, D-J. Evaluation of antioxidant ability of ethanolic extract from dill (*Anethum graveolens* L.) flower. **Food Chemistry**, Barking, v.115, n.2, p.515-521, 2009.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v.22, n.1, p.94-103, 1999.

SIMANDI, B.; HAJDU, V.; PEREDI, K.; CZUKOR, B.; NOBIK-KOVACS, A.; KERY, A. Antioxidant activity of pilot-plant alcoholic and supercritical carbon dioxide extracts of thyme. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.103, n.6, p.355-358, 2001.

SINGH, G.; MAURYA, S.; DE LAMPASONA, M.P.; CATALAN, C. Chemical constituents, antimicrobial investigations, and antioxidative potentials of *Anethum graveolens* L. essential oil and acetone extract: part 52. **Journal of Food Science**, Chicago, v.70, n.4, p.M208-M215, 2005.

SIQUEIRA, F.M. **Estabilidade oxidativa dos óleos de soja, milho e canola**. 1998. 91p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

SU, L.; YIN, J.; CHARLES, D.; ZHOU, K.; MOORE, J.; YU, L. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. **Food Chemistry**, Barking, v.100, n.3, p.990-997, 2007.

SZABO, M.R.; RADU, D.; GAVRILAS, S.; CHAMBRE, D.; IDITOIU, C. Antioxidant and antimicrobial properties of selected spices extracts. **International Journal of Food Properties**, London, v. 13, n. 3, p. 535-545, 2010.

THE AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION. Disponível em:
<<http://www.soygrowers.com/>>. Acesso em: 01 jun 2012.

THOMPSON, J.A.; CARLSON, T.J.; SUN, Y.; DWYER-NIELD, L.D.; MALKINSON, A.M. Studies using structural analogs and inbred strain differences to support a role for quinine methide metabolites of butylated hydroxytoluene (BHT) in mouse lung tumor promotion. **Toxicology**, Limerick, v. 160, p. 197-205, 2001.

TURHAN, S.; SAGIR, I.; TEMIZ, H. Oxidative stability of brined anchovies (*Engraulis encrasicolus*) with plant extracts. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.44, n.2, p.386–393, 2009.

VÁGI, E.; RAPAVI, E.; HADOLIN, M.; VÁSÁRHELYNÉ PERÉDI, K.; BALÁZS, A.; BLÁZOVICS, A.; SIMÁNDI, B. Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, n.1, p.17-21, 2005.

VIEIRA, T.M.F.S.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Stability of oils heated by microwave: UV-spectrophotometric evaluation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.4, p. 433-437, 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20611998000400015&lng=en&nrm=iso>. access on 09 Aug. 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611998000400015>.

VERLEYEN, T.; VAN DICK, S.; ADAMS, C.A. Accelerated stability tests. In: KAMAL-ELDIN, A.; POKORNÝ, J. (Ed.). **Analysis of Lipid Oxidation**. Illinois: AOCS Press, 2005. chap.9, p.210-233.

WAGNER, K.H.; ELMADFA, I. Effects of tocopherols and their mixtures on the oxidative stability of olive oil and linseed oil under heating. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Frankfurt, v.102, n.10, p.624-629, 2000.

WANG, W.; WU, N.; ZU, Y.G.; FU, Y.J. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, Barking, v.108, n.3, p.1019-1022, 2008.

WOJDYŁO, A.; OSZMIAŃSKI, J.; CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, Barking, v.105, n.3, p.940-949, 2007.

WONG, S.P.; LEONG, L.P.; KOH, J.H.W. Antioxidant activities of aqueous extracts of selected plants. **Food Chemistry**, Barking, v.99, p.775-783, 2006.

YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.M. Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 103, n.11, p.752-767, 2001.

YANISHLIEVA-MASLAROVA N.V. Inhibiting oxidation. In: POKORNÝ, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in foods: practical applications**. Nova York: CRC Press. 2001. p. 22-70.

ZHENG, W.; WANG, S. Antioxidant activity and phenolic composition in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.49, n.11, p.5165-5170, 2001.

3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE ESPECIARIAS ATRAVÉS DA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Resumo

O estudo do efeito do solvente e da temperatura no processo de extração dos compostos fenólicos totais de especiarias foi realizado através de técnicas de planejamento experimental e análise de superfícies de resposta. Foi realizado um planejamento fatorial completo do tipo 2^2 com ponto central. As variáveis independentes estudadas foram o grau de hidratação do etanol e temperatura (30 a 60°C), e a variável dependente foi o teor de compostos fenólicos totais, expresso em mg de equivalentes ao ácido gálico/g erva seca. Os resultados obtidos demonstraram que o processo de extração é fortemente dependente do teor de água. Os compostos fenólicos de alecrim e de tomilho podem ser eficientemente extraídos com etanol 50% (v/v), na faixa de 45 a 50°C. As melhores condições para extração de compostos fenólicos da sálvia foram etanol 50% (v/v) e temperatura entre 57 e 60°C. Em relação ao orégano, é possível prever que, em qualquer temperatura estudada (30 a 60°C), o teor de etanol entre 40 e 50% pode ser aplicado para obter uma melhor extração. Os perfis cromatográficos revelaram que os ácidos cafeico e dihidrocafeico foram os principais compostos fenólicos presentes nas amostras analisadas. O composto arbutina foi identificado somente em extratos de orégano. Apesar de uma etapa de purificação dos extratos anterior à análise cromatográfica ser necessária para remoção de compostos interferentes, foi possível identificar alguns compostos fenólicos de reconhecida atividade antioxidante. Os extratos são fontes de antioxidantes naturais com potencial de aplicação em óleos e alimentos lipídicos.

Palavras-chave: Especiarias; MSR; CG/EM

Abstract

Spices contain high levels of phenolic antioxidants with known antioxidant activity. However there are various extraction methods of these compounds. The effect of solvent (ethanol and water), and temperature (30 to 60 °C) on total phenolic content extracted from rosemary, oregano, sage and thyme was investigated. Response surface methodology was used to estimate the optimum extraction conditions for each spice. The content of total phenolic compounds (mg gallic acid equivalents - GAE/g of dried herbs) was strongly dependend on water content. Rosemary and thyme could be efficiently extracted with ethanol 50% (v/v) at 45 to 50 °C. The best condition for extraction of phenolic compounds in sage was up to 50% ethanol at 57.5 to 60°C. For oregano, it is possible to predict that 40-50% ethanol in a temperature range 30 to 60°C, can be applied in order to have the highest phenolic extraction. The chromatographic profile revealed that caffeic and dihydrocaffeic acid were the main phenolic compounds present in samples. Hydroquinone was the only compound identified in oregano extracts. Although a purification step prior to the chromatographic analysis of extracts may be necessary to remove interfering

compounds, it was possible to identify some important phenolic compounds. The extracts are sources of natural antioxidants with potential to be applied in food oils and lipids.

Keywords: Spices; RSM; GC/MS

3.1 Introdução

Uma melhor qualidade de vida com a mudança de hábitos alimentares através do aumento do consumo de produtos de origem natural tem sido uma tendência da população em geral. Para a indústria de alimentos, é interessante encontrar meios de atender a essa demanda dos consumidores, desenvolvendo produtos que agreguem valor tecnológico e apelo nutricional.

Ervas aromáticas e especiarias são bem conhecidas e utilizadas para conferir sabor e aroma aos alimentos. Estudos tem demonstrado que podem ter propriedades antimicrobianas (BOZIN et al., 2007), anti-inflamatórias (ALBANO; MIGUEL, 2011; POECKEL et al., 2008), anticarcinogênicas (KAEFER; MILNER, 2008), e antioxidantes (ISSA; VOLATE; WARGOVICH, 2006). Os compostos responsáveis pela ação antioxidante se destacam no cenário alimentício por apresentarem ação protetora no processo oxidativo de alimentos lipídicos e devido à possível toxicidade dos antioxidantes sintéticos utilizados pela indústria (DORMAN; HILTUNEN, 2004).

Pesquisas relatam a ação protetora de extratos de especiarias contra a oxidação lipídica em diferentes alimentos (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000; BANDONIENÉ et al., 2002; GRAMZA-MICHALOWSKA; SIDOR; HES, 2011; RACANICCI et al., 2004). Essa ação antioxidante é atribuída principalmente aos compostos fenólicos presentes em diversas ervas como alecrim, orégano, sálvia e tomilho. Alguns exemplos desses compostos são: ácido cafeico, ácido rosmarínico, ácido carnósico, carnosol, rosmanol, timol, carvacrol, catequina, campferol, entre outros (DEL BANO et al., 2003; SHAN et al., 2005; ZHENG; WANG, 2001).

A utilização de solventes (como acetona, água, etanol, éter e metanol) é bastante comum para extração de compostos existentes em vegetais (CHIRINOS et al., 2007; PINELO et al., 2007). Sob o ponto de vista toxicológico, etanol e água são solventes mais seguros que acetona, metanol e outros solventes orgânicos, sendo assim, mais aceitáveis para a indústria de alimentos (OKTAY; GÜLÇİN;

KÜFREVIOĞLU, 2003). Além disso, etanol e água, ou sua mistura, são eficazes na extração de compostos fenólicos (MELO, 2010).

Parâmetros, como solvente de extração, temperatura, tempo, tamanho de partícula e a relação erva/especiaria:solvente, podem afetar o processo de extração, de forma independente ou apresentando interações entre si (JUNTACHOTE et al., 2006). A metodologia de superfície de resposta (MSR) consiste em um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas, útil no desenvolvimento e na otimização de processos, bem como no desenvolvimento e formulação de novos produtos (MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009), e tem sido aplicada em processos de extração de compostos fenólicos em diferentes matérias-primas como casca de avelã (STÉVIGNY et al., 2007), sementes de uva (GHAFOOR et al., 2009), maçã (ÇAM; AABY, 2010), picão-preto (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2011). A MSR é uma ferramenta efetiva para encontrar a combinação de níveis de fatores capazes de produzir uma resposta ótima, com menos ensaios experimentais do que em métodos fatoriais completos tradicionais, sendo ainda possível observar os efeitos das variáveis independentes, que podem ser individuais ou em combinação (BAS; BOYACI, 2007).

Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de solventes e da temperatura sobre a extração dos compostos fenólicos das especiarias através da aplicação de técnicas de planejamento experimental e análise de superfícies de resposta para obtenção de um modelo matemático, a fim de prever as condições ótimas do processo de extração, e identificar os compostos fenólicos através de cromatografia gasosa acoplada à espectrofotometria de massas.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Preparo das especiarias

As especiarias desidratadas alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), tomilho (*Thymus vulgaris* L.) e sálvia (*Salvia officinalis* L.), regulamentadas pela Anvisa (2005), foram adquiridas no Mercado Municipal de Piracicaba, trituradas e armazenadas sob refrigeração até o momento de sua utilização.

3.2.2 Processo de extração

Foram pesados 3,0 g de cada especiaria em erlenmeyers e adicionaram-se 30 mL da mistura de solvente etanol:água (v/v). Posteriormente, foram submetidos a um banho termostático com agitação. A relação etanol:água e as temperaturas foram estabelecidas através do planejamento experimental. O tempo de extração foi estabelecido em 50 minutos, baseado em ensaios preliminares. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 2057 g por 20 minutos e filtrados em papel de filtro tipo Whatman n. 2. Os extratos obtidos foram armazenados sob refrigeração a 7°C em frascos âmbar por até 5 dias.

3.2.3 Determinação de teor de compostos fenólicos totais

Foi utilizado o método espectrofotométrico com emprego do reagente de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999). O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W (HUANG; OU; PRIOR, 2005). Os extratos foram diluídos e uma alíquota de 0,5 mL de cada amostra diluída foi transferida para tubos com tampa de rosca e adicionados 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu:água 1:10 (v/v). Os tubos foram agitados em vórtex e as misturas permaneceram em repouso por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio 4% (m/v), submetidos à agitação em vórtex e os tubos deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-1203 (Shimadzu) a 740 nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e o teor de compostos fenólicos totais foi determinado a partir da construção de uma curva padrão com concentrações conhecidas (2,5 a 50 µg/mL) de ácido gálico. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico por grama de amostra em base seca (mg ácido gálico/g amostra).

3.2.4 Identificação química dos extratos de especiarias

Foram escolhidas três amostras de cada especiaria que abrangessem uma área representativa das superfícies de resposta obtidas, descritas na tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Condições de preparo dos extratos de especiarias

Especiarias	Mistura etanol:água	Temperatura (°C)
	(% etanol)	
Alecrim, Orégano, Sálvia e Tomilho	15	55
	50	45
	85	35

3.2.4.1 Derivatização

Os extratos foram evaporados sob corrente de nitrogênio para retirada do solvente etanol. As frações aquosas restantes foram congeladas e posteriormente submetidas à liofilização. Para realização da análise do perfil químico através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), as amostras (aproximadamente 20 mg do material liofilizado) foram primeiramente submetidas a uma etapa chamada de derivatização. Essa etapa é necessária quando os compostos de interesse não são voláteis nem termicamente estáveis, o que acontece com substâncias de alta massa molar e/ou com grupos funcionais polares (BONATTO, 2006).

Foram adicionados às amostras 100 µL do reagente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA). A mistura foi homogeneizada e levada à estufa por 10 minutos, a 70°C, para reação. Em seguida, o reagente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e o produto da derivatização foi rediluído em 600-800 µL de hexano. Após homogeneização, o sobrenadante foi submetido à injeção em CG-EM.

3.2.4.2 Cromatografia gasosa com espectrometria de massas (CG-EM)

As análises por CG-EM foram conduzidas em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2010 acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu GC 2010 *Plus*. As amostras foram separadas em coluna capilar (RTX5MS 30m x 0,25mm x 0,25 µm). A temperatura inicial da coluna foi de 80°C, permanecendo por 1 minuto; a temperatura de 200°C foi atingida com uma taxa de aquecimento de 5°C/minuto e permaneceu por 1 minuto; a mesma taxa de aquecimento anterior alcançou a temperatura de 250°C, que permaneceu por 8 minutos; e a taxa de aquecimento de 10°C/minuto alcançou a temperatura de 300°C permanecendo por 5 minutos, totalizando 65 minutos de tempo de análise. O hélio foi utilizado como gás de arraste. A temperatura do injetor foi de 280°C e o volume de injeção foi de 1,0 µL em

modo “*split*”. A interface foi mantida em 280°C e o detector operou em modo *scanning* (m/z 40-800). A integração foi feita por meio do software LabSolutions-GCMS. Os compostos fenólicos e derivados foram identificados por comparação com os dados obtidos do CG-EM (tempo de retenção e fragmentação iônica) com a biblioteca Wiley 8.

3.2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Um planejamento fatorial com ponto central foi aplicado para estudar o processo de extração dos compostos fenólicos. As duas variáveis independentes foram relação etanol:água (% etanol, v/v) e temperatura (30 a 60°C). A tabela 3.2 apresenta as faixas de estudo das condições de preparo dos extratos das especiarias e os níveis das variáveis independentes. O delineamento experimental é apresentado na tabela 3.3. O estudo do efeito dos parâmetros na extração foi realizado pelo método de superfície de resposta e análise de regressão múltipla, com o objetivo de definir as condições ótimas de extração dos compostos fenólicos presentes nas especiarias, através do ajuste do modelo matemático de segunda ordem, incluindo termos lineares, quadráticos e as interações entre as variáveis independentes. O modelo obtido foi avaliado com base no coeficiente de determinação (R^2) e o teste F, realizado por meio da análise de variância com auxílio do programa Statistica 10.0 (StatSoft, Inc. 2010). A fórmula geral do modelo é representada pela equação:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (3.1)$$

Em que:

Y = resposta (variável dependente), x_1 , x_2 , x_3 = níveis codificados das variáveis independentes, b_0 = ponto central, b'_s = coeficientes estimados pelo método dos mínimos quadrados.

Tabela 3.2 – Faixas de estudo das condições de preparo de extratos de especiarias e níveis das variáveis explanatórias

Níveis	-1,41	-1	0	1	1,41
Etanol:água (% etanol, v/v)	0	15	50	85	99
Temperatura (°C)	30	35	45	55	60

Tabela 3.3 – Delineamento experimental para o estudo do efeito das variáveis mistura etanol:água e temperatura sobre o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de especiarias

Ensaio	Variáveis explanatórias			
	Mistura etanol:água (% etanol)		Temperatura (°C)	
	Valor codificado	Valor real	Valor codificado	Valor real
1	-1	15	-1	35
2	+1	85	-1	35
3	-1	15	+1	55
4	+1	85	+1	55
5	-1,41	0	0	45
6	+1,41	99	0	45
7	0	50	-1,41	30
8	0	50	+1,41	60
9	0	50	0	45
10	0	50	0	45
11	0	50	0	45
12	0	50	0	45

3.3 Resultados e Discussão

O planejamento fatorial consiste em selecionar um número fixo de níveis para cada uma das variáveis de entrada, e então executar experimentos com todas as possíveis combinações. Como é desejável a redução do número de ensaios ao mínimo possível, utiliza-se um planejamento fatorial com 2 níveis (-1 e +1) para cada variável independente. Se “n” variáveis estiverem envolvidas no estudo de um determinado processo, o número de ensaios a ser realizado para se investigar as combinações possíveis entre as variáveis será 2^n . Para se estimar o erro experimental acrescenta-se no mínimo 3 ensaios referentes ao ponto central, utilizando-se os valores codificados relativos ao nível zero. É possível ainda completar o planejamento realizando ensaios referentes aos pontos axiais, situados a uma distância codificada α ($\alpha=2^{n/4}$) do ponto central. Esses pontos situam-se sobre os eixos das coordenadas e a distância corresponde à metade da diagonal do cubo. Com os resultados é possível calcular os efeitos principais e as interações entre as variáveis independentes, determinar quais são os efeitos significativos, e aplicar a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) e análise de regressão múltipla para

se estabelecer modelos matemáticos de 2ª ordem, contendo os termos lineares, quadráticos e de interação entre as variáveis independentes (BARROS NETO et al., 1996).

A análise dos resultados de variância (ANOVA) permite a verificação da significância dos efeitos das variáveis independentes sobre as respostas e também do ajuste do modelo matemático obtido. Um modelo ideal deve ter boa significância ($p < 0,05$), alta confiabilidade (dados dentro do intervalo de confiança de 95%) e baixa variabilidade ($R^2 > 70\%$) (BARROS NETO et al., 1996). A tabela 3.4 apresenta os resultados do teor de compostos fenólicos totais das quatro especiarias analisadas.

Tabela 3.4 – Teor de compostos fenólicos totais dos extratos de especiarias

Ensaio	Variáveis explanatórias		Teor de fenólicos totais (mg AG/g amostra)*			
	Etanol:água (%etanol, v/v)	Temperatura (°C)	Alecrim	Orégano	Sálvia	Tomilho
1	15	35	43,65	80,58	28,09	46,53
2	85	35	33,77	64,88	13,83	33,77
3	15	55	42,42	94,28	33,76	54,95
4	85	55	30,83	62,09	27,09	35,94
5	0	45	40,15	64,36	27,52	42,27
6	99	45	13,31	21,49	12,69	20,07
7	50	30	36,98	90,73	35,11	45,50
8	50	60	52,25	93,28	53,91	64,55
9	50	45	43,60	91,65	46,20	66,59
10	50	45	56,18	92,36	41,66	59,26
11	50	45	57,93	98,82	46,39	63,32
12	50	45	58,92	94,77	41,80	67,11

*valores expressos como média das duplicatas

A partir desses resultados, foi aplicada a metodologia de resposta e foram calculados os coeficientes de regressão das equações de segunda ordem. Os modelos foram ajustados considerando apenas os efeitos estatisticamente significativos, e estão expressos na tabela 3.5. A análise de variância (tabelas 3.6, 3.7, 3.8 e 3.9), demonstrou que todos os modelos propostos são válidos, pois as regressões são estatisticamente significativas ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$), e as faltas de ajuste não o são ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$). Os valores de coeficiente de determinação (R^2) foram altos, maiores que 0,92.

Tabela 3.5 – Modelos matemáticos de segunda ordem das quatro especiarias analisadas

Especiarias	Equação polinomial de segunda ordem (modelo codificado)
Alecrim	Fenólicos totais (mg AG/g amostra) = $57,6682 - 7,4364 \times (\% \text{ etanol}) - 15,0269 \times (\% \text{ etanol})^2 + 2,1766 \times (\text{temperatura}) - 6,0308 \times (\text{temperatura})^2$
Orégano	Fenólicos totais (mg AG/g amostra) = $94,9089 - 13,0522 \times (\% \text{ etanol}) - 23,3967 \times (\% \text{ etanol})^2$
Sálvia	Fenólicos totais (mg AG/g amostra) = $42,9136 - 5,2456 \times (\% \text{ etanol}) - 13,4040 \times (\% \text{ etanol})^2 + 5,6967 \times (\text{temperatura})$
Tomilho	Fenólicos totais (mg AG/g amostra) = $64,0705 - 7,9075 \times (\% \text{ etanol}) - 16,5926 \times (\% \text{ etanol})^2 + 4,6953 \times (\text{temperatura}) - 4,5937 \times (\text{temperatura})^2$

Tabela 3.6 – Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais de extratos de alecrim

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F
Regressão	1947,536	4	486,884	22,289
Resíduo	131,066	6	21,844	
Falta de ajuste	127,216	4	31,804	16,522
Erro puro	3,850	2	1,925	
Total	2078,602	10		

$$F_{0,954;6} = 4,53; F_{0,95;4;2} = 19,25; R^2 = 0,9307$$

Tabela 3.7 – Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais de extratos de orégano

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F
Regressão	4973,575	2	2486,788	88,322
Resíduo	253,406	9	28,156	
Falta de ajuste	222,009	6	37,002	3,535
Erro puro	31,397	3	10,466	
Total	5226,981	11		

$$F_{0,95;2;9} = 4,26; F_{0,95;6;3} = 8,94; R^2 = 0,9515$$

Tabela 3.8 – Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais de extratos de sálvia

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F
Regressão	1664,749	3	554,916	31,612
Resíduo	140,428	8	17,554	
Falta de ajuste	119,561	5	23,912	3,437
Erro puro	20,867	3	6,956	
Total	1805,177	11		

$$F_{0,95;3;8} = 4,07; F_{0,95;5;3} = 9,01; R^2 = 0,9222$$

Tabela 3.9 – Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais de extratos de tomilho

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F
Regressão	2555,898	4	638,975	53,953
Resíduo	82,775	7	11,825	
Falta de ajuste	43,484	4	10,871	0,830
Erro puro	39,291	3	13,097	
Total	2638,673	11		

$$F_{0,95;4;7} = 4,12; F_{0,95;4;3} = 9,12; R^2 = 0,9671$$

Os resultados mostraram que o processo de extração de compostos fenólicos foi significativamente afetado pelo teor de água da solução e, no caso do alecrim, tomilho e sálvia, também pela temperatura. No entanto, em todas as especiarias, foi observado que o efeito de interação das variáveis independentes não foi significativo. Pode-se observar nos modelos matemáticos obtidos que o efeito quadrático da porcentagem de etanol foi o de maior valor absoluto, ou seja, foi o efeito que mais afetou o teor de fenólicos totais, seguido pelo seu efeito linear. Os valores absolutos dos efeitos lineares e quadráticos da temperatura variaram em cada especiaria estudada, evidenciando a importância do estudo dos parâmetros de extração de compostos fenólicos de diferentes fontes.

O parâmetro do efeito linear da porcentagem de etanol em todos os extratos foi negativo, ou seja, um aumento desse fator provocou uma diminuição do teor de compostos fenólicos totais, ao contrário do efeito linear da temperatura, que foi positivo, indicando que o aumento da temperatura provocou um aumento da resposta. Somente o extrato de orégano não foi afetado pelas variações de temperatura quanto ao teor de compostos fenólicos totais.

Em todos os extratos, os modelos apresentaram parâmetros quadráticos negativos, o que indica que todas as superfícies de resposta obtidas são uma curvatura, com passagem por uma região de máximo teor de compostos fenólicos totais.

Nos extratos de alecrim e tomilho, os efeitos lineares e quadráticos da porcentagem de etanol em água e o efeito quadrático da temperatura foram negativos; o efeito da temperatura linear foi positivo. Os efeitos lineares e quadráticos das variáveis independentes da sálvia foram similares aos do alecrim e do tomilho, no entanto, o efeito da temperatura quadrática não foi estatisticamente

significativo. Em relação ao orégano, apenas os efeitos lineares e quadráticos da porcentagem de etanol foram significativos.

As figuras 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4 apresentam as superfícies de resposta ajustadas aos modelos matemáticos das especiarias estudadas.

Figura 3.1 – Efeito da mistura etanol:água e da temperatura sobre o teor de compostos fenólicos totais em alecrim

Figura 3.2 – Efeito da mistura etanol:água e da temperatura sobre o teor de compostos fenólicos totais em tomilho

Figura 3.3 – Efeito da mistura etanol:água e da temperatura sobre o teor de compostos fenólicos totais em sálvia

Figura 3.4 – Efeito da mistura etanol:água e da temperatura sobre o teor de compostos fenólicos totais em orégano

O aumento da temperatura de 30 para 45 °C promoveu aumento no teor de compostos fenólicos nos extratos de alecrim e de tomilho. O orégano não foi afetado pela mudança de temperatura na faixa estudada. O extrato de sálvia apresentou aumento do teor de compostos fenólicos com o aumento da temperatura (30 para 60°C). Sabe-se que a solubilidade dos fenólicos é aumentada com o incremento na temperatura fato também observado por Durling et al. (2007) ao trabalharem com sálvia na faixa de temperatura de 22 a 40°C, mas sem novos incrementos com o aumento para 63°C. Rababah et al. (2010) também relataram que o aumento de 20°C para 60°C promoveu maior extração de compostos fenólicos em orégano e tomilho.

A hidratação do etanol até aproximadamente 50% melhorou a extratibilidade dos fenólicos de todas as especiarias. Valores de hidratação superiores a 50% já reduziram a eficiência da extração. Dentre as variáveis do processo de extração da sálvia estudadas por Durling et al. (2007), a relação etanol:água teve efeito mais pronunciado. Foi observado que altas porcentagens de etanol provocaram uma recuperação elevada de ácido carnósico e seus compostos relacionados (mais lipofílicos), ao contrário do observado para o ácido rosmarínico (mais hidrofílico) e

compostos fenólicos totais. Juntachote et al. (2006) verificaram que as melhores condições de extração de compostos fenólicos de alecrim, capim-limão, manjerição santo e *galangal* (pertencente à família do gengibre) se encontrava no uso de 3:1 (v/v) de etanol:água variável solvente.

Em extratos de groselha, com o aumento da concentração de etanol até aproximadamente 60%, o teor de compostos fenólicos também aumentou, porém, com redução em concentrações maiores que 60% (CACACE; MAZZA, 2003).

Em estudo realizado por Hossain et al. (2011), as ervas alecrim, manjerona e orégano apresentaram maior teor de compostos fenólicos quando extraídos com 56, 57 e 33% de metanol, respectivamente, em um sistema de extração acelerada por solvente em que altas temperaturas e pressão são utilizadas. Teores elevados de compostos fenólicos foram obtidos com a utilização de 50-60, 60 e 33% de metanol na extração líquida pressurizada de sálvia, manjerição e tomilho (HOSSAIN et al., 2010).

Devido aos diferentes métodos de extração e de determinação de compostos fenólicos totais, bem como pela diferença na composição genética e nas condições ambientais em que estas espécies são cultivadas, torna-se difícil comparar os resultados entre os estudos. No entanto, as tendências são perfeitamente comparáveis.

Com base na análise das superfícies de resposta obtidas para o teor de compostos fenólicos totais, as condições para uma extração eficiente dos compostos fenólicos foram: alecrim e tomilho, uso de etanol 50%, na faixa de 45 a 50°C; sálvia, uso de etanol 50%, a uma faixa de temperatura de 57,5 a 60°C; e orégano, etanol 40-50%, em qualquer temperatura na faixa estudada (30 a 60°C).

A cromatografia gasosa é uma técnica adequada e confiável para determinação e separação de compostos fenólicos e terpênicos, especialmente no caso de matrizes complexas naturais, como extratos de plantas. Quando acoplada à espectrometria de massas, pode fornecer resultados precisos, com elevado grau de especificidade, boa sensibilidade, e também permite a determinação quantitativa simultânea de uma gama de compostos fenólicos e terpenos (RAZBORŠEK et al.; 2007).

Os compostos fenólicos identificados por CG/EM estão apresentados nas tabelas 3.10.

Tabela 3.10 – Tempos de retenção (TR), íons importantes do espectro de massas e porcentagem dos compostos fenólicos silanizados identificados em extratos selecionados de alecrim, orégano, sálvia e tomilho

(continua)

Especiaria, Teor de etanol (%), T (°C)	Composto fenólico	TR (min)	Íon (m/z, abundância em parênteses)	Área (%)
Alecrim, 15, 55	-	-	-	-
Alecrim, 50, 45	Ácido dihidrocafeico	29,50	73(100), 267(77), 268(19), 147(15), 179(13), 45(13), 488(M ⁺)	1,96
	Ácido cafeico	30,70	219(100), 396(78), 73(48), 397(30), 381(27), 191(16), 400(M ⁺)	1,38
Alecrim, 85, 35	Metil éster do ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico	16,77	209(100), 224(63), 73(28), 193(27), 135(26), 89(20), 227(M ⁺)	0,03
	Ácido vanílico	22,94	297(100), 73(76), 312(67), 267(64), 223(53), 253(41), 314(M ⁺)	0,05
	Ácido dihidrocafeico	29,50	73(100), 267(77), 268(19), 147(15), 179(13), 459(13), 488(M ⁺)	0,49
	Ácido cafeico	30,70	219(100), 396(78), 73(48), 397(30), 381(27), 191(16), 400(M ⁺)	0,28
Orégano, 15, 55	Hidroquinona	14,54	239(100), 254(74), 73(29), 240(23), 112(18), 255(18), 258(M ⁺)	0,13
	Trimetil[[<i>p</i> -(trimetilsiloxi)benzil]oxi]-silano	17,04	73(100), 179(92), 268(42), 147(32), 253(31), 267(27), 270(M ⁺)	0,07
	Ácido dihidrocafeico	29,50	73(100), 267(77), 268(19), 147(15), 179(13), 45(13), 488(M ⁺)	1,35
	Ácido cafeico	30,70	73(100), 219(65), 396(49), 45(19), 397(18), 381(14), 400(M ⁺)	1,02
	Hidroquinona-beta-D-glucopiranosídeo (pico 1)	37,24	73(100), 254(50), 103(26), 129(24), 75(20), 378(20), 380(M ⁺)	1,63
	Hidroquinona-beta-D-glucopiranosídeo (pico 2)	39,49	73(100), 254(67), 361(48), 217(30), 147(25), 169(25), 451(M ⁺)	20,85
Orégano, 50, 45	Hidroquinona	14,57	239(100), 254(74), 73(29), 240(23), 112(18), 255(18), 258(M ⁺)	0,20
	Ácido dihidrocafeico	29,52	73(100) 267(77) 268(19) 147(15) 179(13) 45(13) 488(M ⁺)	2,49
	Ácido cafeico	30,72	219(100), 396(78), 73(48), 397(30), 381(27), 191(16), 400(M ⁺)	1,22
	Hidroquinona-beta-D-glucopiranosídeo (pico 1)	37,27	73(100), 254(50), 103(26), 129(24), 75(20), 378(20), 380(M ⁺)	4,70
	Hidroquinona-beta-D-glucopiranosídeo (pico 2)	38,92	73(100), 182(91), 254(43), 103(23), 217(19), 129(18), 379(M ⁺)	2,53
	Hidroquinona-beta-D-glucopiranosídeo (pico 3)	39,49	73(100), 254(67), 361(48), 217(30), 147(25), 169(25), 451(M ⁺)	14,80

Tabela 3.10 – Tempos de retenção (TR), íons importantes do espectro de massas e porcentagem dos compostos fenólicos silanizados identificados em extratos selecionados de alecrim, orégano, sálvia e tomilho

(continuação)

Especiaria, Teor de etanol (%), T (°C)	Composto fenólico	TR (min)	Íon (m/z, abundância em parênteses)	Área (%)
Orégano, 85, 35	Resorcinol	14,55	239(100), 254(70), 73(42), 240(23), 112(18), 255(17), 257(M ⁺)	0,55
	Trimetil[[p-(trimetilsiloxi)benzil]oxi]-silano	17,04	73(100), 179(92), 268(42), 147(32), 253(31), 267(27), 270(M ⁺)	0,03
	Ácido dihidrocafeico	29,50	73(100), 267(77), 268(19), 147(15), 179(13), 45(13), 488(M ⁺)	1,38
	Ácido cafeico	30,71	219(100), 396(78), 73(48), 397(30), 381(27), 191(16), 400(M ⁺)	0,78
	Hidroquinona-beta-D-glucopiranosídeo (pico 1)	37,29	73(100), 254(50), 103(26), 129(24), 75(20), 378(20), 380(M ⁺)	7,21
	Hidroquinona-beta-D-glucopiranosídeo (pico 2)	38,96	73(100), 182(91), 254(43), 103(23), 217(19), 129(18), 379(M ⁺)	6,54
	Hidroquinona-beta-D-glucopiranosídeo (pico 3)	39,51	73(100), 254(67), 361(48), 217(30), 147(25), 169(25), 451(M ⁺)	9,70
	Hidroquinona-beta-D-glucopiranosídeo (pico 4)	40,12	73(100), 254(52), 182(45), 129(27), 103(26), 75(20), 378(M ⁺)	3,08
Sálvia, 15, 55	Ácido dihidrocafeico	29,49	73(100), 267(77), 268(19), 147(15), 179(13), 45(13), 488(M ⁺)	4,08
	Ácido cafeico	30,70	219(100), 396(78), 73(48), 397(30), 381(27), 191(16), 400(M ⁺)	8,13
Sálvia, 50, 45	Ácido dihidrocafeico	29,51	73(100), 267(77), 268(19), 147(15), 179(13), 45(13), 488(M ⁺)	0,43
	Ácido cafeico	30,71	73(100), 219(65), 396(49), 45(19), 397(18), 381(14), 399(M ⁺)	0,85
Sálvia, 85, 35	Ácido dihidrocafeico	29,51	73(100), 267(77), 268(19), 147(15), 179(13), 459(13), 488(M ⁺)	1,31
	Ácido cafeico	30,69	219(100), 73(87), 396(74), 143(38), 397(26), 381(20), 400(M ⁺)	2,08
Tomilho, 15, 55	Timol	12,78	207(100), 73(72), 222(33), 208(19), 96(11), 45(8), 224(M ⁺)	4,08
	Ácido cafeico	30,72	73(100), 219(65), 396(49), 45(19), 397(18), 381(14), 400(M ⁺)	0,71
Tomilho, 50, 45	Ácido dihidrocafeico	29,50	73(100), 267(77), 268(20), 147(15), 179(13), 45(13), 488(M ⁺)	0,88
	Ácido cafeico	30,70	73(100), 219(65), 396(50), 45(20), 397(18), 381(14), 400(M ⁺)	0,68

Tabela 3.10 – Tempos de retenção (TR), íons importantes do espectro de massas e porcentagem dos compostos fenólicos silanizados identificados em extratos selecionados de alecrim, orégano, sálvia e tomilho

(conclusão)

Especiaria, Teor de etanol (%), T (°C)	Composto fenólico	TR (min)	Íon (m/z, abundância em parênteses)	Área (%)
Tomilho, 85, 35	Timol	12,78	207(100), 73(85), 222(27), 208(20), 45(16), 91(10), 225(M+)	4,51
	Ácido dihidrocafeico	29,51	73(100), 267(77), 268(19) 147(15), 179(13), 45(13), 488(M+)	0,34
	Ácido cafeico	30,71	73(100), 219(65), 396(49), 45(19), 397(18), 381(14), 399(M+)	0,36

Muitos compostos não fenólicos foram identificados, tais como açúcares, representando grande porcentagem de área nos picos cromatográficos. Esses compostos são considerados interferentes, e dificultam a separação e identificação de outras substâncias de interesse. Diversos outros picos cromatográficos não foram identificados pela biblioteca Wiley 8. No entanto, foi possível identificar nos extratos selecionados os compostos fenólicos: ácido cafeico, ácido dihidrocafeico, timol e hidroquinona. Em quase a totalidade dos extratos observou-se a presença do ácido cafeico e dihidrocafeico. A presença de hidroquinona glicosilada, arbutina, foi observada nos extratos de orégano.

Os compostos presentes em especiarias foram identificados por Zheng e Wang (2001), por cromatografia líquida de alta eficiência. A sálvia apresentou altos teores de ácido rosmarínico. Estavam presentes também luteolina, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido ferúlico, luteolina 7-O-glicosídeo, 4',5,7,8-tetrahidroxiflavona, escutelareína, apigenina, hispidulina, cirsimarina, carnosol, ácido carnósico e metil carnosato. A espécie *Origanum x majoricum* apresentou os compostos ácido rosmarínico, hispidulina, ácido cafeico e apigenina, em ordem decrescente. O ácido rosmarínico foi encontrado em maior quantidade em tomilho, seguido por luteolina, hispidulina e ácido cafeico. No alecrim, os compostos ácido carnósico e rosmanol exibiram altos teores. Também foram identificados os compostos naringina, ácido rosmarínico, cirsimarina, hispidulina, ácido cafeico, ácido vanílico e apigenina.

Shan et al. (2005) identificaram por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa o ácido cafeico e rosmarínico nas quatro espécies (alecrim, orégano, sálvia e tomilho), sendo o ácido rosmarínico o composto que apresentou maiores teores. O ácido carnósico também foi encontrado em alecrim e sálvia.

Em estudo realizado por Kivilompolo, Obůrka e Hyötyläinen (2007) com CG/EM, os ácidos cafeico, vanílico e *p*-coumárico foram encontrados em alecrim, orégano, sálvia e tomilho; ferúlico e siríngico em orégano, sálvia e tomilho; e o ácido gálico em orégano e sálvia. Também por CG/EM, Razboršek et al. (2007) identificaram os ácidos fenólicos cafeico, carnósico, rosmarínico em alecrim.

Os perfis cromatográficos podem ser encontrados nas figuras 3.5, 3.6, 3.7 e 3.8. Os extratos obtidos com maior teor de etanol e menor temperatura apresentaram maior número de picos cromatográficos em relação aos demais.

O método de Folin-Ciocalteu não é específico para determinação de compostos fenólicos totais; mono/dissacarídeos e ácido ascórbico são as substâncias que mais interferem em extratos de plantas (STRATIL; KLEJDUS; KUBÁŇ, 2007). O método também é influenciado por outros compostos interferentes, tais como aminas aromáticas, dióxido de enxofre, ácidos orgânicos e íons metálicos como Cu^{1+} e Fe^{2+} (HUANG; OU; PRIOR, 2005; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

Figura 3.5 – Perfis cromatográficos dos extratos silanizados de alecrim nas condições: 15 % etanol e 55 °C (A), 50% etanol e 45 °C (B) e 85% etanol e 35 °C (C)

Figura 3.6 – Perfis cromatográficos dos extratos silanizados de orégano nas condições: 15 % etanol e 55 °C (A), 50% etanol e 45 °C (B) e 85% etanol e 35 °C (C)

Figura 3.7 – Perfis cromatográficos dos extratos silanizados de sálvia nas condições: 15 % etanol e 55 °C (A), 50% etanol e 45 °C (B) e 85% etanol e 35 °C (C)

Figura 3.8 – Perfis cromatográficos dos extratos silanizados de tomilho nas condições: 15 % etanol e 55 °C (A), 50% etanol e 45 °C (B) e 85% etanol e 35 °C (C)

O estudo das variáveis que afetam a extração de compostos fenólicos, visando a utilização de um processo aplicável em escala industrial, mostrou que é possível obter extratos com altos teores de compostos fenólicos totais. No entanto, a seleção das condições de extração deve ser baseada não somente no teor de compostos fenólicos totais, mas também na composição dos extratos obtidos em cada condição, para a aplicação em um alimento.

3.4 Conclusão

A metodologia de superfície de resposta foi útil no estudo do processo de extração. O teor de compostos fenólicos totais foi fortemente dependente do solvente no processo de extração, com efeitos diferentes em cada especiaria. O método de Folin-Ciocalteu pode fornecer resultados superestimados quanto ao teor de compostos fenólicos, o que pode ser comprovado pela CG/EM. No geral, extratos preparados com soluções hidroalcoólicas mais concentradas e menor temperatura apresentaram teores de compostos fenólicos totais mais baixos, porém maior diversidade de compostos em relação aos demais extratos analisados. Apesar de uma etapa de purificação dos extratos anterior à análise cromatográfica ser necessária para remoção de compostos interferentes, foi possível identificar alguns compostos fenólicos bastante conhecidos, como o ácido cafeico, ácido dihidrocafeico, timol e hidroquinona. Os extratos obtidos podem ser fonte de antioxidantes naturais com potencial de aplicação em óleos e alimentos lipídicos.

Referências

ALBANO, S.M.; MIGUEL, M.G. Biological activities of extracts of plants grown in Portugal. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v.33, n.2, p.338-343, 2011.

ALMEIDA-DORIA, R.F.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 197-203, 2000.

BANDONIENĖ, D.; VENSKUTONIS, P. R.; GRUZDIENĖ, D.; MURKOVIC, M. Antioxidative activity of sage (*Salvia officinalis* L.), savory (*Satureja hortensis* L.) and borage (*Borago officinalis* L.) extracts in rapeseed oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Frankfurt, v.104, n.5, p.286-292, 2002.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2. ed. Campinas: UNICAMP, 1996. 299p.

BAS, D.; BOYACI, I. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, Oxford, v.78, n.2, p.836-845, 2007.

BONATTO, P.S. Cromatografia gasosa. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATTO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora UNICAMP, 2006.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIC, I.; JOVIN, E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.55, n.19, p.7879-7885, 2007.

BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005. Aprova "Regulamento Técnico para especiarias, temperos e molhos". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 set. 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 05 ago. 2011.

CACACE, J.E.; MAZZA, G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. **Food Engineering and Physical Properties**, Chicago, v. 68, n.1, p.240-248, 2003.

CHIRINOS, R.; ROGEZ, H.; CAMPOS, D.; PEDRESCHI, R.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v.55, n.2, p.217-225, 2007.

CORTÉS-ROJAS, D.F.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Optimisation of the extraction of phenolic compounds and antioxidant activity from aerial parts of *Bidens pilosa* L. using response surface methodology. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.46, n.11, p.2420-2427, 2011.

ÇAM, M.; AABY, K. Optimization of extraction of apple pomace phenolics with water by response surface methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.58, n.16, p.9103-9111, 2010.

DEL BAÑO, M.J.; LORENTE, J.; CASTILLO, J.; BENAVENTE-GARCÍA, O.; DEL RÍO, J.A.; ORTUÑO, A.; QUIRIN, K.; GERARD, D. Phenolic diterpenes, flavones, and rosmarinic acid distribution during the development of leaves, flowers, stems, and roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant Activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.51, n.15, p.4247-4253, 2003.

DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Fe(III) reductive and free radical-scavenging properties of summer savory (*Satureja hortensis* L.) extract and subfractions. **Food Chemistry**, Barking, v.88, n.2, p.193-199, 2004.

DURLING, N.E.; CATCHPOLE, O.J.; GREY, J.B.; WEBBY, R.F.; MITCHELL, K.A.; FOO, L.Y.; PERRY, N.B. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. **Food Chemistry**, Barking, v.101, n.4, p.1417-1424, 2007.

GRAMZA-MICHALOWSKA, A.; SIDOR, A.; HES, M. Herb extract influence on the oxidative stability of selected lipids. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v.35, n.6, p.1723-1736, 2011.

GHAFOOR, K.; CHOI, Y.H.; JEON, J.Y.; JO, I.H. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.57, n.11, p.4988-4994, 2009.

HOSSAIN, M.B.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A.B.; BRUNTON, N.P. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. **Food Chemistry**, Barking, v.126, n.1, p.339-346, 2011.

HOSSAIN, M.B.; BRUNTON, N.P.; MARTIN-DIANA, A.B.; BARRY-RYAN, C. Application of response surface methodology to optimize pressurized liquid extraction of antioxidant compounds from sage (*Salvia officinalis* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.). **Food and Function**, Cambridge, v.1, n.3, p.269-277, 2010.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, n.6, p.1841-1856, 2005.

ISSA, A.Y.; VOLATE, S.R.; WARGOVICH, M.J. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. **Journal of Food composition and Analysis**, San Diego, v.19, n.5, p.405-419, 2006.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, EMMERICH; BAUER, F.; SIEBENHANDL, S. The application of response surface methodology to the production of phenolic extracts of lemon grass, galangal, holy basil and rosemary. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.41, n.2, p.121-133, 2006.

KAEFER, C.M.; MILNER, J.A. The role of herbs and spices in câncer prevention. The **Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v.19, n.6, p.347-361, 2008.

KIVILOMPOLO, M.; OBÛRKA, V.; HYÖTYLÄINEN, T. Comparison of GC/MS and LC/MS methods for the analysis of antioxidant phenolic acids in herbs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v.388, n.4, p.881-887, 2007.

MELO, P. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**. 2010. 100p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

MYERS, R.H., MONTGOMERY, D.C., ANDERSON-COOK, C.M. **Response Surface Methodology**: process and product optimization using designed experiments. 3rd Ed. New York: Wiley, 2009. 704p.

OKTAY, M.; GÜLÇİN, I.; KÜFREVIOĞLU, I. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v.36, n.2, p. 263-271, 2003.

PINELO, M.; RUIZ-RODRÍGUEZ, A.; SINEIRO, J.; SEÑORÁNS, F.J.; REGLERO, G.; NÚÑEZ, M.J. Supercritical fluid and solid–liquid extraction of phenolic antioxidants from grape pomace: a comparative study. **European Food Research and Technology**, Berlin, v.226, n.1-2, p.199-205, 2007.

POECKEL, D.; GREINER, C.; VERHOFF, M.; RAU, O.; TAUSCH, L.; HÖRNIG, C.; STEINHILBER, D.; SCHUBERT-ZSILAVECZ, M.; WERZ, O. Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. **Biochemical Pharmacology**, New York, v.76, n.1, p.91-97, 2008.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, n.10, p.4290-4302, 2005.

RABABAH, T.M.; BANAT, F.; RABABAH, A.; EREIFEJ, K.; YANG, W. Optimization of Extraction Conditions of Total Phenolics, Antioxidant activities, and anthocyanin of oregano, thyme, terebinth, and pomegranate. **Journal of Food Science**, Chicago, v.75, n.7, p.C626-C632, 2010.

RACANICCI, A.M.C.; DANIELSEN, B.; MENTEN, J.F.M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant effect of dittany (*Origanum dictamnus*) in pre-cooked chicken meat balls during chill-storage in comparison to rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **European Food Research and Technology**, Berlin, v.218, n.6, p.521-524, 2004.

RAZBORŠEK, M.I.; VONČINA, D.B.; DOLEČEK, V.; VONČINA, E. Determination of major phenolic acids, phenolic diterpenes and triterpenes in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by gas chromatography and mass spectrometry. **Acta Chimica Slovenica**, Ljubljana, v.54, p.60-67, 2007.

SHAN, B.; CAI, Y.Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.53, n.20, p.7749-7759, 2005.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzimology**, Orlando, v.299, p.152-178, 1999.

STATSOFT. **STATISTICA for Windows - Release 10.0 A**. Tulsa, OK, USA: StatSoft, Inc., 2010.

STÉVIGNY, C.; ROLLE, L.; VALENTINI, N.; ZEPPA, G. Optimization of extraction of phenolic content from hazelnut shell using response surface methodology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v.87, n.15, p.2817–2822, 2007.

STRATIL, P.; KLEJDUS, B.; KUBÁŇ, V. Determination of phenolic compounds and their antioxidant activity in fruits and cereals. **Talanta**, London, v.71, n.4, p.1741-1751, 2007.

ZHENG, W.; WANG, S. Antioxidant activity and phenolic composition in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.49, n.11, p.5165-5170, 2001.

4 USO DE EXTRATOS DE ESPECIARIAS E SUAS MISTURAS BINÁRIAS E TERNÁRIAS SOBRE A ESTABILIDADE OXIDATIVA DE ÓLEO DE SOJA

Resumo

A utilização de misturas de extratos de especiarias foi estudada a fim de avaliar seu efeito sobre a estabilidade oxidativa do óleo de soja refinado isento de antioxidantes. Para tal, planejamentos experimentais com mistura foram realizados, em que as especiarias alecrim, orégano e tomilho representaram os componentes. Os ensaios foram conduzidos em estufa a 60 °C, durante oito dias, com a determinação do Índice de Peróxido e Absortividade em 232 nm, e em Rancimat. Após oito dias em estufa, as diferenças entre os ensaios foram significativas, sendo possível aplicar um modelo matemático para o estudo do efeito das misturas. As misturas binárias com alecrim e a mistura ternária apresentaram melhor resposta sobre a formação de hidroperóxidos e de dienos conjugados, sendo que a melhor combinação das proporções obtida pela análise de superfície de resposta foi 15% de tomilho, 65% de alecrim e 20% de orégano, totalizando 100 mg de compostos fenólicos totais/g óleo. Em Rancimat, misturas com alecrim também foram efetivas em retardar a ocorrência do processo oxidativo. Misturas de extratos de especiarias com alecrim podem ser utilizadas para prevenir a oxidação lipídica.

Palavras-chave: Mistura de especiarias; *Shelf life*; Teste de estufa; Estabilidade do óleo

Abstract

The use of mixture of spice extracts was studied in order to access its effect on the oxidative stability of refined soybean oil without antioxidants. Therefore, experimental designs were conducted, in which the spices rosemary, oregano and thyme represented the components. The samples were conducted in oven test at 60°C for eight days with Peroxide Value and the UV Absorptivity at 232 determination and in Rancimat. After eight days, the results among the essays were significantly different, being possible to apply a mathematical model to study the effect of the mixtures. Binary mixtures with rosemary and the ternary one showed the best response on the hydroperoxide and conjugated dienes formation prevention. The best combination of the ratios obtained by analyzing the response surface was 0.15 thyme, 0.65 rosemary and 0.20 oregano, in a total of 100 mg phenolic compounds/g oil. In Rancimat, mixtures with rosemary were also effective in delay the oxidative process. Mixtures of spices extracts with rosemary can be used to avoid lipid oxidation.

Keywords: Spices mixture; Shelf life; Schaal oven test; Oil stability

4.1 Introdução

A oxidação, maior causa de degradação de alimentos contendo lipídeos, leva à formação de compostos de odor e sabor desagradáveis (ranço), à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, além da geração de compostos secundários potencialmente tóxicos (WAGNER; ELMADFA, 2000; RAMALHO; JORGE, 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

A presença de oxigênio, a composição em ácidos graxos, a ação de íons metálicos, a temperatura e a luz são fatores importantes que afetam a estabilidade oxidativa de alimentos lipídicos e devem ser considerados no processamento a fim de garantir a qualidade desses produtos (MADSEN; BERTELSEN, 1995; WAGNER; ELMADFA, 2000). Uma das práticas adotadas para evitar as reações de oxidação e prolongar o *shelf-life* dos alimentos lipídicos é o uso de substâncias antioxidantes (WAGNER; ELMADFA, 2000).

Produtos de origem natural, como ervas e especiarias, representam um potencial de pesquisa por serem bastante utilizadas na culinária e devido ao interesse dos consumidores por alimentos com apelo funcional e aos possíveis efeitos tóxicos de compostos sintéticos.

Diversas especiarias tem sido estudadas por suas propriedades bioativas, especialmente como antioxidantes (YANISHLIEVA; MARINOVA; 2001). Extratos de alecrim, manjeriço, orégano, sálvia, tomilho, entre outros, tem demonstrado efeito protetor sobre a oxidação de diversos produtos lipídicos com óleos vegetais e produtos cárneos (BABOVIĆ et al., 2010; DEL RÉ; JORGE, 2011; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2009; RAVELLI, 2011).

O efeito antioxidante de compostos isolados, extratos ou de ervas inteiras em alimentos de composição lipídica tem sido bem estudado. No entanto, a predominância de qualquer um desses compostos em um determinado alimento não implica necessariamente um forte efeito antioxidante, uma vez que as interações de diferentes antioxidantes pode render uma atividade imprevisível. Dessa forma, além do uso isolado de substâncias antioxidantes ou de extratos isolados, é possível utilizar misturas (ALLAM; MOHAMED, 2002; ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000).

A aplicação de misturas na formulação de produtos alimentícios é bastante utilizada a fim de obter um resultado desejado a partir da combinação de diversos componentes. Portanto, os planejamentos experimentais com mistura são um tipo

especial de experimento de superfície de resposta em que os fatores são os ingredientes ou componentes de uma mistura, e a resposta é dependente das proporções de cada componente (BARROS NETO et al., 1996; MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009).

O objetivo desse estudo foi aplicar a modelagem de misturas para avaliar o efeito protetor de extratos de especiarias e suas misturas, bem como possíveis efeitos sinérgicos e antagônicos, sobre a estabilidade oxidativa do óleo de soja refinado isento de antioxidantes.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Óleo de soja

O óleo de soja refinado isento de antioxidantes foi fornecido gentilmente pela empresa Cargill e armazenado sob congelamento até o momento do uso.

4.2.2 Preparo das especiarias

As especiarias desidratadas alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.), regulamentadas pela Anvisa (2005), foram adquiridas no Mercado Municipal de Piracicaba, trituradas e armazenadas sob refrigeração até o momento de sua utilização.

4.2.3 Processo de extração e determinação do teor de compostos fenólicos totais

Foram pesados 3,0 g de cada especiaria em erlenmeyers e adicionaram-se 30 mL da mistura de solvente etanol:água (v/v). Posteriormente, foram submetidos a um banho termostático com agitação. As especiarias, a relação etanol:água e as temperaturas foram estabelecidas de acordo com os resultados obtidos do planejamento experimental para obtenção de extratos com maior teor de compostos fenólicos e da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Tabela 5.1). O tempo de extração foi estabelecido em 50 minutos, baseado em ensaios preliminares. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 2057 g por 20 minutos e filtrados em papel de filtro tipo Whatman n. 2. Os extratos obtidos foram armazenados sob refrigeração a 7°C em frascos âmbar por até 5 dias.

Tabela 4.1 – Condições de preparo dos extratos de especiarias para aplicação em óleo de soja

Especiaria	Mistura etanol:água (%etanol)	Temperatura (°C)
Alecrim	85	45
Orégano	80	30
Tomilho	85	45

Para determinação do teor de fenólicos totais, foi utilizado o método espectrofotométrico com emprego do reagente de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999). Os extratos foram diluídos e uma alíquota de 0,5 mL de cada amostra diluída foi transferida para tubos com tampa de rosca e adicionados 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu:água 1:10 (v/v). Os tubos foram agitados em vórtex e as misturas permaneceram em repouso por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio 4% (m/v), submetidos à agitação em vórtex e os tubos deixados em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-1203 (Shimadzu) a 740 nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e o teor de compostos fenólicos totais foi determinado a partir da construção de uma curva padrão com concentrações conhecidas (2,5 a 50 µg/mL) de ácido gálico. Os resultados foram expressos como equivalentes de ácido gálico por grama de amostra em base seca (mg ácido gálico/g amostra).

4.2.4 Teste acelerado em estufa

O teste acelerado foi conduzido em estufa com circulação de ar, à temperatura de 60°C ± 1°C, por oito dias. Amostras de 1,0 mL foram acondicionadas em frascos transparentes, sem tampa, de 1,5 mL. As condições dos ensaios (concentração de fenólicos totais dos extratos a serem adicionados ao óleo de soja isento de antioxidantes) foram determinadas segundo o delineamento experimental. Um controle negativo foi conduzido nas mesmas condições. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. Nos tempos de 0, 4, 6 e 8 dias, amostras foram analisadas quanto ao índice de peróxido e absortividade em 232 e 270 nm.

4.2.4.1 Índice de peróxido

A concentração de hidroperóxidos foi determinada segundo Branco e Castro (2011). Em tubos de ensaio, 50 µL das amostras de óleo de soja foram adicionados

em 1,75 mL de uma solução isooctano/2-propanol (3:1, v/v). Os tubos foram fechados e agitados em vórtex três vezes por 10s, e 20 µL da mistura foi adicionada a 2,98 mL de uma solução de metanol/1-butanol (2:1, v/v). O volume final da amostra foi de 3,0 mL. Separadamente, uma solução de tiocianato ferroso foi preparada através da mistura de 500 µL de uma solução de tiocianato de amônio (3,94 M) com 500 µL de uma solução Fe^{2+} (0,072 M). A solução Fe^{2+} (0,072 M) foi obtida através do sobrenadante da mistura de 1,5 mL de sulfato ferroso (0,144 M) e 1,5 mL de cloreto de bário (0,132 M) em ácido clorídrico (0,4 M). A solução de tiocianato ferroso (30 µL) foi adicionada à mistura metanol/1-butanol (3,0 mL), agitada em vórtex e deixada em repouso a temperatura ambiente por 20 min. Após esse período, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-1203 (Shimadzu) a 510 nm. A concentração de hidroperóxidos foi determinada a partir da construção de uma curva padrão com concentrações conhecidas de hidroperóxido de cumeno. Os resultados foram expressos em mmol/L.

4.2.4.2 Absortividade na faixa do ultravioleta (UV)

As absorbâncias específicas nos comprimentos de onda 232 nm e 270 nm na faixa do ultravioleta foram determinados segundo método II.d.23 (IUPAC, 1979). Amostras de óleo foram pesadas (0,02 a 0,03 g) em balão volumétrico de 25 mL. O volume foi completado com isooctano e os valores de absorbância foram medidos em espectrofotômetro UV-1203 (Shimadzu). Os resultados foram expressos em coeficiente de extinção $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ e calculados através da seguinte fórmula:

$$E_{1\text{cm}}^{1\%} = \frac{A}{C} \quad (4.1)$$

Em que:

A = absorbância no comprimento de onda de 232 e 270 nm

C = concentração da solução (g/100 mL)

4.2.5 Estabilidade oxidativa em Rancimat

A estabilidade oxidativa foi avaliada através do método Cd12b-92 (AOCS, 2003). Foram utilizados 5 g de amostra, submetidos à oxidação acelerada, à temperatura de 110°C e taxa de fluxo de ar seco de 9 L/h, em equipamento Rancimat 743 (Metrohm AG, CH-9100 Herisau Switzerland). Os valores foram

expressos em Período de Indução (PI). As condições dos ensaios foram determinadas de acordo com o delineamento experimental e as amostras foram preparadas em duplicata.

4.2.6 Delineamento experimental e análise estatística

Foi realizada a análise da variância (ANOVA) e o teste de Tukey foi aplicado para comparação das médias, ao nível de 5 % de significância com auxílio do programa Statistica 10.0 (StatSoft, Inc. 2010).

Para o planejamento de misturas, foi aplicado um delineamento experimental Centroid Simplex (Tabela 4.3). O estudo do efeito das misturas dos extratos foi realizado pelo método de superfície de resposta e análise de regressão múltipla, através do ajuste do modelo cúbico especial, incluindo termos lineares, quadráticos e cúbico. O modelo obtido foi avaliado com base no coeficiente de determinação (R^2) e o teste F, realizado por meio da análise de variância com auxílio do programa Statistica 10.0 (StatSoft, Inc. 2010). A fórmula geral do modelo é representada pela equação:

$$Y = b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3 \quad (4.2)$$

Em que:

Y = resposta (variável dependente), x_1, x_2, x_3 = níveis codificados das proporções dos componentes, b'_s = coeficientes estimados pelo método dos mínimos quadrados.

Tabela 4.2 – Delineamento experimental Centroid Simplex para atividade antioxidante de extratos de especiarias e suas misturas

Ensaio	Mistura (x_1, x_2, x_3)	Doses (mg fenólicos totais/kg)
Tomilho (x_1)	(1,0,0)	(100,0,0)
Orégano (x_2)	(0,1,0)	(0,100,0)
Alecrim (x_3)	(0,0,1)	(0,0,100)
Tomilho + Orégano	(1/2, 1/2, 0)	(50,50,0)
Tomilho+ Alecrim	(1/2, 0, 1/2)	(50,0,50)
Orégano+ Alecrim	(0,1/2,1/2)	(0,50,50)
Tomilho+ Orégano+ Alecrim	(1/3, 1/3, 1/3)	(33,33,33)

4.3 Resultados e discussão

Os extratos de alecrim, orégano e tomilho apresentaram valores médios de compostos fenólicos totais de 21,18; 66,11 e 39,25 mg AG/g amostra, respectivamente. Com base nesses resultados, foram preparadas amostras de óleo de soja refinado com adição dos extratos e suas misturas, com adição da quantidade de extrato prevista na tabela 4.2.

Para determinação do período em estufa das amostras de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias e suas misturas, foi feito um estudo da oxidação do óleo de soja isento de antioxidantes, durante oito dias. As amostras foram analisadas a cada dois dias, e os resultados estão expressos na tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Índice de peróxido (IP) e absortividade ($E^{1\%}_{1cm}$) do óleo de soja isento de antioxidantes em teste acelerado de estufa a 60 °C

Tempo em estufa (dias)	IP (mmol/L)*	Absortividade em 232 nm ($E^{1\%}_{1cm}$)*	Absortividade em 270 nm ($E^{1\%}_{1cm}$)*
0	0,4526 ^c	5,4217 ^c	2,3268 ^a
2	0,9853 ^c	5,5265 ^c	2,3333 ^a
4	2,3598 ^c	5,7322 ^c	2,3040 ^a
6	20,6835 ^b	8,1703 ^b	2,3335 ^a
8	46,6555 ^a	11,9394 ^a	2,3318 ^a

*valores expressos como média das triplicatas. Letras diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Apenas os resultados de absortividade no UV em 270 nm não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre si. Os valores de IP e absortividade no UV em 232 nm nos tempos zero, dois e quatro dias não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), e foram significativamente diferentes dos observados em seis e oito dias. Com base nesses resultados, foram escolhidos os tempos de 0,4, 6 e 8 dias para realização do experimento com misturas.

A escolha das especiarias, bem como das condições de extração das especiarias foi baseada nas superfícies de resposta, nos cromatogramas (estudos realizados anteriormente) e na solubilidade desses extratos em óleo de soja. Alecrim, orégano e tomilho apresentaram os maiores teores de fenólicos totais, sendo escolhidos para a realização do delineamento com misturas. Apesar dos extratos dessas especiarias obtidos com solução hidroalcoólica em torno de 50% de etanol apresentarem os melhores resultados em fenólicos totais, extratos com maior

teor de etanol são mais solúveis em óleo de soja; dessa forma, foram escolhidos os valores 85% para alecrim e tomilho e 80% para o orégano. Através da superfície de resposta, a temperatura de 45 °C em alecrim e tomilho foi a mais eficiente na extração de compostos fenólicos, sendo, portanto, selecionada. O preparo do extrato de orégano, no entanto, não sofreu influência da temperatura, dessa forma, foi escolhida a menor temperatura estudada (30°C).

A atividade antioxidante de extratos de especiarias e suas misturas medida por inibição da oxidação lipídica (índice de peróxido e absortividade no UV) em teste acelerado em estufa está descrita nas tabelas 4.4, 4.5 e 4.6.

Tabela 4.4 – Índice de Peróxido de óleo de soja isento de antioxidantes e adicionado de extratos de especiarias e suas misturas em estufa a 60 °C por diferentes períodos

Ensaio	IP (mmol/L)*			
	0 dias	4 dias	6 dias	8 dias
Tomilho (x_1)	0,7659 ^a	2,4421 ^a	6,5893 ^b	17,4801 ^{a,b}
Orégano (x_2)	1,0087 ^a	4,7056 ^a	19,7671 ^a	29,0210 ^a
Alecrim (x_3)	0,8717 ^a	2,4264 ^a	3,9341 ^b	5,1207 ^b
Tomilho + Orégano	0,5474 ^a	2,7005 ^a	14,2375 ^{a,b}	20,6757 ^{a,b}
Tomilho+ Alecrim	0,3712 ^a	2,9277 ^a	4,9249 ^b	6,3700 ^b
Orégano+ Alecrim	0,9187 ^a	2,9747 ^a	5,0620 ^b	6,3817 ^b
Tomilho+ Orégano+ Alecrim	0,4965 ^a	2,8807 ^a	4,5646 ^b	5,6925 ^b
Controle	0,4526 ^a	2,4115 ^a	21,0555 ^a	32,6552 ^a

*valores expressos como média das triplicatas. Letras diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 4.5 – Absortividade no UV em 232 nm de óleo de soja isento de antioxidantes e adicionado de extratos de especiarias e suas misturas em estufa a 60 °C por diferentes tempos

Ensaio	Absortividade no UV a 232 nm ($E^{1\%}_{1cm}$)*			
	0 dias	4 dias	6 dias	8 dias
Tomilho (x_1)	5,3998 ^a	5,5188 ^a	6,0796 ^a	8,2604 ^{b,c,d}
Orégano (x_2)	5,4072 ^a	5,7525 ^a	7,1966 ^a	10,2340 ^{a,b}
Alecrim (x_3)	5,3359 ^a	5,4949 ^a	5,7132 ^a	6,2082 ^d
Tomilho + Orégano	5,3681 ^a	5,6443 ^a	7,3477 ^a	8,7736 ^{a,b,c}
Tomilho+ Alecrim	5,3958 ^a	5,6888 ^a	5,8563 ^a	6,4806 ^{c,d}
Orégano+ Alecrim	5,4101 ^a	6,1500 ^a	5,9510 ^a	6,6089 ^{c,d}
Tomilho+ Orégano+ Alecrim	5,2090 ^a	5,5094 ^a	5,5858 ^a	6,0774 ^d
Controle	5,4217 ^a	5,7775 ^a	7,3342 ^a	10,8020 ^a

*valores expressos como média das triplicatas. Letras diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Tabela 4.6 – Absortividade no UV em 270 nm de óleo de soja isento de antioxidantes e adicionado de extratos de especiarias e suas misturas em estufa a 60 °C por diferentes tempos

Ensaio	Absortividade no UV a 270 nm ($E^{1\%}_{1cm}$)*			
	0 dias	4 dias	6 dias	8 dias
Tomilho (x_1)	2,4981 ^a	2,2978 ^a	2,6342 ^a	2,3315 ^a
Orégano (x_2)	2,4867 ^a	2,3948 ^a	2,5764 ^a	2,2756 ^a
Alecrim (x_3)	2,4944 ^a	2,2710 ^a	2,6426 ^a	2,4044 ^a
Tomilho + Orégano	2,5126 ^a	2,2334 ^a	2,6040 ^a	2,4285 ^a
Tomilho+ Alecrim	2,4760 ^a	2,2873 ^a	2,5115 ^a	2,4023 ^a
Orégano+ Alecrim	2,4667 ^a	2,3321 ^a	2,6215 ^a	2,4227 ^a
Tomilho+ Orégano+ Alecrim	2,4664 ^a	2,4140 ^a	2,3920 ^a	2,4181 ^a
Controle	2,3269 ^a	2,4714 ^a	2,5278 ^a	2,3015 ^a

*valores expressos como média das triplicatas. Letras diferentes, na mesma coluna, diferem significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Observa-se nas figuras 4.1 e 4.2 que a formação de hidroperóxidos e de dienos conjugados, medidos pelo IP e a pela Absortividade em 232 nm, respectivamente, seguiram a mesma tendência de aumento em relação ao tempo em estufa. Através da análise de regressão, foi observada forte correlação entre eles (Figura 4.3). A equação linear e o coeficiente de correlação linear obtidos foram:

$$IP = -30,6044 + 5,9435 \times \text{absortividade a 232 nm} \quad (4.3)$$

$$R^2 = 0,9436$$

Figura 4.1 – Índice de Peróxido (IP) do óleo de soja isento de antioxidantes (Controle) e adicionado de extratos hidroalcoólicos de especiarias isoladas ou em misturas, em função do tempo em estufa

Figura 4.2 – Absorptividade no UV em 232 nm do óleo de soja isento de antioxidantes (Controle) e adicionado de extratos hidroalcoólicos de especiarias isoladas ou em misturas, em função do tempo em estufa

Figura 4.3 – Correlação entre o IP e a absorptividade em UV a 232 nm

Essa mesma tendência também foi verificada por Vieira e Regitano-d'Arce (2001) com óleo de canola. Almeida-Doria e Regitano-d'Arce (2000) e Ravelli (2011) também observaram comportamentos semelhantes ao utilizar extratos de especiarias em óleo de soja isento de antioxidantes submetido ao teste de estufa.

A metodologia de superfície de resposta é uma técnica estatística que representa todas as respostas obtidas para cada combinação de variáveis em um gráfico de superfície. Por esta razão, o requisito mínimo para modelar uma superfície como uma função da variação de variáveis é que os resultados observados por uma combinação de ensaios sejam estatisticamente diferentes, ou seja, o valor de p da ANOVA deve ser inferior a 0,05, e uma vez que a variação nos ensaios foi confirmada, é possível ajustar o modelo matemático para explicar esta variação (CAPITANI et al., 2009).

A análise de trienos conjugados não mostrou diferenças significativas entre os ensaios, em nenhum período de tempo avaliado. Em relação às análises de formação de hidroperóxidos e de dienos conjugados, nos tempos de zero e quatro dias, as diferenças não foram significativas estatisticamente. Somente em seis dias em estufa os ensaios apresentaram diferenças significativas no IP, mas não na Absortividade no UV em 232 nm. Com oito dias em estufa, ambas as análises mostraram diferenças significativas entre as combinações de ensaios. Dessa forma, o ajuste do modelo matemático foi obtido com os resultados de oito dias em estufa. As figuras 4.4 e 4.5 representam as superfícies de resposta das duas análises.

Os modelos obtidos podem ser avaliados quanto à significância estatística por meio de análise de variância dos resultados (ANOVA). Um modelo ideal deve ter boa significância ($p < 0,05$), alta confiabilidade (dados dentro do intervalo de confiança de 95%) e baixa variabilidade ($R^2 > 70\%$) (BARROS NETO et al., 1996). Através da ANOVA (Tabela 7), demonstrou-se que os modelos propostos são válidos, pois as regressões são estatisticamente significativas ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$), e os valores de coeficiente de determinação (R^2) foram maiores que 0,70.

Figura 4.4 – Contornos dos efeitos das proporções dos extratos hidroalcoólicos de alecrim, orégano e tomilho sobre a estabilidade oxidativa de óleo de soja isento de antioxidante em teste acelerado em estufa (60 °C) por oito dias, expresso em IP (mmol/L)

Tabela 4.7 – Análise da variância para o ajuste do modelo aos valores de IP em oito dias em estufa

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	P
Regressão	1617,548	6	269,5913	26,15872	<0,05
Resíduo	144,284	14	10,3060		
Total	1761,832	20			

$$R^2 = 0,9181; F_{0,95;6;14} = 2,85$$

Figura 4.5 – Contornos dos efeitos das proporções dos extratos hidroalcoólicos de alecrim, orégano e tomilho sobre a estabilidade oxidativa de óleo de soja isento de antioxidante em teste acelerado em estufa (60 °C) por oito dias, expresso em Absortividade no UV em 232 nm ($E^{1\%}_{1cm}$)

Tabela 4.8 – Análise da variância para o ajuste do modelo aos valores de absorvidade no UV em 232 nm em oito dias em estufa

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	p
Regressão	45,59242	6	7,598736	24,13484	<0,05
Resíduo	4,40783	14	0,314845		
Total	50,00025	20			

$$R^2 = 0,9118; F_{0,95;6;14} = 2,85$$

Experimentos com mistura são restringidos pela condição de que a soma das proporções dos componentes seja sempre igual a 1 (o que impede a escolha das proporções de modo independente), pois as proporções dos componentes são os determinantes das propriedades de uma mistura, e não a quantidade total deles. A região experimental para uma mistura com q componentes é um *simplex*, uma figura com q vértices em $q - 1$ dimensões. Misturas com três componentes obedecem à seguinte equação: $x_1 + x_2 + x_3 = 1$, o que equivale geometricamente a um triângulo equilátero inscrito em um cubo. Os vértices correspondem aos componentes puros

e os lados às misturas binárias, enquanto os pontos situados no interior do triângulo representam as possíveis misturas de três componentes. Um planejamento *simplex-centroid* consiste em $2^q - 1$ pontos (BARROS NETO et al., 1996; MYERS; MONTGOMERY; ANDERSON-COOK, 2009).

Com relação ao IP, os melhores resultados foram obtidos pela mistura ternária e pelo alecrim isolado. O mesmo pode ser observado na absortividade em 232 nm. Em ambas as superfícies de resposta, pode-se observar que o extrato de orégano isolado apresentou o pior desempenho, e o melhor extrato isolado foi o de alecrim, com resultados melhores que todas as misturas binárias com proporções iguais. Em misturas com dois componentes, à medida que a proporção do extrato de orégano é reduzida e a dos extratos de alecrim ou tomilho é elevada, uma maior proteção oxidativa é verificada. A mistura binária de orégano e tomilho não se mostrou tão eficiente quanto as misturas de cada especiaria com o alecrim, em proporções iguais. Nas misturas binárias com alecrim, à medida que sua proporção aumenta, maior é a proteção oxidativa. Combinações com alecrim apresentaram melhores efeitos protetores que as demais. A região em que a melhor proteção é oferecida situa-se de 0,50 a 0,80 de alecrim, 0,10 a 0,30 de orégano e 0,05 a 0,30 de tomilho, sendo que o melhor ponto é 0,15 tomilho, 0,65 alecrim e 0,2 orégano.

Pelo método Rancimat, são detectados os ácidos orgânicos voláteis, que são formados durante a oxidação das amostras de óleo, os quais mudam a condutividade da água; e o período de indução é determinado no ponto de inflexão em que a condutividade aumenta exponencialmente (KRISTOTT, 2000). Os valores de período de indução estão apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Período de indução determinado pelo método Rancimat de óleo de soja sem adição de antioxidantes e adicionados de extratos de especiarias e suas misturas

Ensaio	Período de Indução (h)*
Tomilho (x_1)	8,26 ^c
Orégano (x_2)	8,03 ^{c,d}
Alecrim (x_3)	10,75 ^a
Tomilho + Orégano	8,37 ^c
Tomilho+ Alecrim	9,27 ^b
Orégano+ Alecrim	9,03 ^b
Tomilho+ Orégano+ Alecrim	8,94 ^b
Controle	7,82 ^d

*valores expressos como média das duplicatas. Letras diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Quanto maior é o período de indução, maior é a proteção oxidativa. Neste método, o óleo é exposto a altas temperaturas, e muitos antioxidantes são termolábeis e não resistem a condições drásticas de oxidação acelerada.

Os extratos de antioxidantes tem compostos fenólicos que aparentam não conseguir manter o mesmo desempenho antioxidante que sob condições mais amenas como o teste de estufa. Mesmo assim, os extratos apresentaram períodos de indução maiores que o controle e o alecrim desponta como o extrato mais vigoroso atribuindo ao óleo de soja o maior tempo de resistência à instalação do ranço. As misturas com alecrim, tanto as binárias quanto a ternária, não diferiram significativamente, enquanto o seu extrato isolado foi capaz de manter o óleo estável por mais horas, com período de indução próximo a 11 h. Em trabalho desenvolvido por Ravelli (2011), o TBHQ (100 mg/kg) conferiu ao óleo de soja período de indução de 14,27 h.

Foram observadas diferenças estatísticas entre as combinações de extratos, sendo possível ajustar um modelo matemático para explicar as variações (Figura 4.6 e Tabela 4.10).

Figura 4.6 – Contornos dos efeitos das proporções dos extratos hidroalcoólicos de alecrim, orégano e tomilho sobre a estabilidade oxidativa de óleo de soja isento de antioxidante em Rancimat. Valores expressos em Período de Indução (h)

Tabela 4.10 – Análise da variância para o ajuste do modelo aos valores de absorvidade no UV em 232 nm em oito dias em estufa

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F	p
Regressão	9,98347	6	1,663912	151,1666	<0,05
Resíduo	0,07705	7	0,011007		
Total	10.06052	13			

$$R^2 = 0,9923; F_{0,95;6;7} = 3,87$$

O modelo obtido é válido, pois a regressão é estatisticamente significativa ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$), e o valor de coeficiente de determinação (R^2) foi maior que 0,70.

Pela superfície de resposta em Rancimat, o pior desempenho foi obtido pela adição apenas de extrato de orégano, o que foi observado também no teste acelerado em estufa. O comportamento dos ensaios com tomilho e das misturas binárias também foi similar ao do teste em estufa, em que combinações com alecrim apresentaram melhores efeitos protetores que as demais. Já em relação ao melhor efeito protetor, diferentemente do teste em estufa, o efeito da adição apenas do extrato de alecrim ofereceu maior proteção oxidativa do que qualquer outra combinação de extratos. Devido às condições de oxidação acelerada no Rancimat, em que são utilizadas temperaturas elevadas e oxigenação intensa, os extratos podem ter perdido parcialmente sua eficiência antioxidante devido à degradação de compostos fenólicos sensíveis a essas condições. Todavia, o alecrim foi a especiaria que apresentou os melhores resultados, em ambos os testes de oxidação acelerada.

O teste acelerado em estufa e o Rancimat também foram utilizados por Ravelli (2011) para avaliar a estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos hidroalcoólicos (80% etanol, v/v) de alecrim, orégano, sálvia e tomilho. Foi observado que esses extratos foram capazes de retardar a formação de compostos resultantes da oxidação lipídica. Através do teste em estufa, Ravelli (2011) também avaliou que as diferentes concentrações de fenólicos (100, 250 e 500 mg/kg) proporcionaram a mesma proteção antioxidante em óleo de soja.

Zandi e Ahmadi (2000) avaliaram o efeito das concentrações de extratos metanólicos de diferentes espécies da família *Labiatae*, bem como o efeito da combinação desses extratos com ácido cítrico ou α -tocoferol. Alecrim e tomilho, adicionados ao óleo de soja refinado na concentração de 0,2 %, submetidos ao teste

acelerado em estufa a 63 °C e em Rancimat, mostraram efeito protetor. A combinação com α -tocoferol apresentou efeito sinérgico negativo em ambas as especiarias, enquanto que, com ácido cítrico, o efeito foi positivo com o tomilho, e negativo com o alecrim. Já em óleo de girassol, misturas binárias de extrato de alecrim com palmitato de ascorbila, ácido cítrico ou α -tocoferol foram capazes de retardar a oxidação durante teste acelerado a 60 °C, sendo que a melhor combinação encontrada foi alecrim (0,02%) e palmitato de ascorbila (0,01%) (HRAŠ et al., 2000).

Almeida-Doria e Regitano d'Arce (2000) verificaram que uma mistura de extratos etanólicos de alecrim (500mg/kg) e de orégano (1000mg/kg) foi tão eficiente quanto uma mistura dos antioxidantes sintéticos BHA + BHT (200mg/kg) quando adicionados em óleo de soja submetido à oxidação acelerada em estufa a 63 °C.

Piedade (2007) avaliou o efeito da adição de alecrim, orégano e salsa em combinação, e constatou que as ervas foram eficientes em retardar o processo oxidativo em filés de sardinha. Combinações binárias e ternárias são mais eficientes conforme o aumento da concentração. Além disso, foi observado que a presença do alecrim foi fundamental em retardar a oxidação quando utilizado em combinação com as outras ervas.

Em estudo conduzido por Szabo et al. (2010), amostras de óleo de girassol e de banha adicionadas de extrato obtido de uma mistura de sete ervas em quantidades iguais foram submetidas a condições aceleradas de oxidação (110 °C). Entre essas ervas estavam o alecrim, o orégano e o tomilho. Essa mistura foi capaz de retardar a formação de peróxidos nas primeiras horas de oxidação em óleo de girassol. Em estágios avançados de oxidação, a mistura foi eficiente em banha.

4.4 Conclusão

O delineamento experimental com misturas e a aplicação de metodologia de superfícies de resposta foram úteis para avaliar o efeito protetor de combinações de extratos hidroalcoólicos de alecrim, orégano e tomilho em óleo de soja refinado isento de antioxidantes submetidos a condições aceleradas de oxidação. Temperaturas brandas no processo de extração são suficientes para produzir extratos com eficiência antioxidante. As misturas de extratos de especiarias foram capazes de retardar a formação de compostos resultantes da oxidação lipídica, e dentre os extratos, o de alecrim apresentou a melhor proteção antioxidante, e parece

exercer papel fundamental na estabilização do processo oxidativo, quando utilizado em combinação com outros extratos de especiarias. Apesar de demais estudos em outros sistemas modelo serem necessários, a utilização de misturas de extratos com alecrim apresenta potencial para aplicação em óleos e alimentos de base lipídica.

Referências

- ALMEIDA-DORIA, R.F.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 197-203, 2000.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices**. Champaign, 2003. 1v.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Planejamento e Otimização de Experimentos**. 2. ed. Campinas: UNICAMP, 1996. 299p.
- BRANCO, G.; CASTRO, I. Optimization of oil oxidation by response surface methodology and the application of this model to evaluate antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.88, n.11, p.1747-1758, 2011.
- BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005. Aprova "Regulamento Técnico para especiarias, temperos e molhos". **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 set. 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 05 ago. 2011.
- HRAŠ, A.R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Ž.; BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. **Food Chemistry**, Barking, v.71, n.2, p.229-233, 2000.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 6th ed. Oxford, 1979.
- KRISTOTT, J. Fats and oils. In: KILCAST, D.; SUBRAMANIAM, P. (Ed.). **The stability and shelf-life of food**. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd, 2000. chap.12, p.279-310.

MADSEN, H.L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v.6, n.8, p.271-277, 1995.

MYERS, R.H., MONTGOMERY, D.C., ANDERSON-COOK, C.M. **Response Surface Methodology**: process and product optimization using designed experiments. 3rd Ed. New York: Wiley, 2009. 704p.

PIECADE, K.R. **Uso de ervas aromáticas na estabilidade oxidativa de filés de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) processados**. 2007. 160p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2007.

RAVELLI, D. **Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias**: correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial. 2011. 113p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzimology**, Orlando, v.299, p.152-178, 1999.

STATSOFT. **STATISTICA for Windows - Release 10.0 A**. Tulsa, OK, USA: StatSoft, Inc., 2010.

SZABO, M.R.; RADU, D.; GAVRILAS, S.; CHAMBRE, D.; IDITOIU, C. Antioxidant and antimicrobial properties of selected spices extracts. **International Journal of Food Properties**, London, v. 13, n. 3, p. 535-545, 2010.

VIEIRA, T.M.F.S.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Canola oil thermal oxidation during oven test and microwave heating. **Food Science and Technology**, London, v.34, n.2, p.215-221, 2001.

WAGNER, K.H.; ELMADFA, I. Effects of tocopherols and their mixtures on the oxidative stability of olive oil and linseed oil under heating. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Frankfurt, v.102, n.10, p.624-629, 2000.

ZANDI, P.; AHMADI, L. Antioxidant effect of plant extracts of Labiatae family. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v.37, p.436–439, 2000.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É de extrema importância evitar e/ou reduzir a formação de hidroperóxidos e dienos conjugados, compostos resultantes da oxidação lipídica que afetam a qualidade em óleos, sendo essencial o uso de substâncias antioxidantes. Produtos naturais, em forma de extratos, são uma alternativa promissora aos antioxidantes sintéticos.

Nas condições deste trabalho, por meio do estudo das variáveis que afetam a extração de compostos fenólicos visando a possibilidade de produção escala industrial, o processo de extração das especiarias alecrim, orégano, sálvia e tomilho foi otimizado. Extratos de alecrim, tomilho e orégano com atividade antioxidante foram obtidos em condições brandas de temperatura, com uso de etanol hidratado, em um processo simples de extração sob agitação mecânica, e o teor de etanol utilizado na produção de extratos parece ter mais influência sobre o perfil de compostos fenólicos do que a temperatura.

Misturas de extratos hidroalcoólicos de alecrim, orégano e tomilho representam um potencial de aplicação como antioxidante em óleos vegetais e alimentos de base lipídica. Para uma melhor compreensão do efeito da mistura desses extratos, demais estudos devem ser conduzidos em outros sistemas modelo, como aplicação em emulsões.

Ferramentas estatísticas como a metodologia de superfície de resposta no estudo do processo extrativo e em misturas foram úteis no desenvolvimento deste trabalho, e são importantes para a determinação das condições de obtenção dos extratos e de sua aplicação.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Figura - Curva de calibração do ácido gálico

APÊNDICE B

Figura – Curva de calibração do hidropéroxido de cumeno (CHP)