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

**Avaliação da atividade antioxidante de extrato hidroalcoólico de *murtilla*
(*Ugni molinae* Turcz.)**

Thalita Riquelme Augusto

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

**Piracicaba
2013**

Thalita Riquelme Augusto
Tecnóloga em Alimentos

**Avaliação da atividade antioxidante de extrato hidroalcoólico de *murtilla*
(*Ugni molinae* Turcz.)**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

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

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

**Piracicaba
2013**

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

Augusto, Thalita Riquelme

Avaliação da atividade antioxidante de extrato hidroalcoólico de *murtilla* (*Ugni molinae* Turcz.) / Thalita Riquelme Augusto.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013.
123 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Óleo de soja 2. Superfície de resposta 3. Compostos antioxidantes 4. Análise sensorial I. Título

CDD 664.84
A923a

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

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por todas as oportunidades e bênçãos recebidas.

Aos meus pais Silvana e Valdemar, a minha querida irmã Narjara, ao meu cunhado Angelo e ao meu sobrinho Miguel que amo tanto, sempre me ampararam em todos os momentos e que apesar da distância estavam presentes nas ocasiões mais importantes.

Ao meu amado namorado Flávio Eduardo Botelhos Obara, companheiro em todas as horas, amigo, conselheiro, amoroso e que com muita calma, paciência, carinho e incentivo me ajudou nesta etapa importante da minha carreira e da minha vida.

A família Obara por sempre me apoiarem, pelas palavras acolhedoras, pelo incentivo e por poder sempre contar com a atenção e carinho de todos.

A professora Marisa Aparecida Bismara Regitano d'Arce por ter aberto as portas do laboratório e me acolher em um difícil momento de decisão, tornando possível o término desta jornada.

A querida professora Thais Maria Ferreira de Souza Vieira sempre muito atenciosa, me guiando pelo melhor caminho, pelo reconhecimento do meu trabalho e pelas oportunidades oferecidas com as quais pude aprender.

Ao professor Erick Sigisfredo Scheuermann Salinas da Universidad de la Frontera, Temuco, Chile; que juntamente com a professora Thais me confiou este projeto, pelo amparo científico e disponibilidade para sanar todas as dúvidas que surgiram durante a realização deste trabalho.

As minhas queridas amigas Juliana Nogueira Ruiz, Anna Cristina Zari Nazari e Roberta Rizzo pelo companheirismo, palavras de ajuda, momentos de alegria e por me acolherem calorosamente em suas vidas.

A minha amiga, companheira e estagiária Chou Yu Hung que muito me ajudou e sempre esteve presente nos momentos importantes, muito gentil e alegre.

Ao meu querido amigo Adriano Costa de Camargo (Kovalent) pela ajuda, apoio, incentivo, palavras de sabedoria que me ajudaram nos momentos cruciais nesta jornada.

Aos meus queridos amigos Mariana Damiamas Baccarin, Richtier Gonçalves da Cruz, Adriana Figueiredo da Silva e Larissa Braga Bueno Reis pelo companheirismo, amizade, momentos de alegria, por serem tão fiéis e prestativos.

A todos os companheiros do Laboratório de Óleos e Gorduras, Marilis Y. H. Shimano, Gabriela B. Raser, Grasiela C. P. dos Santos, Samuel S. Groppo, Lucas H. Ribeiro, Ana P. M. P. Sichieri, Marcela M. Ribas, Joseanne R. Rodrigues e Taís Zucolo, que contribuíram de alguma maneira neste projeto.

A Profa. Dra. Taciana V. Savian do Departamento de Ciências Exatas e a todos os professores do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN), em especial Prof. Severino M. de Alencar, Silene B. S. Sarmiento, Solange G. C. Brazaca, Carmen J. C. Castillo e Marta H. F. Spoto pela atenção e por disponibilizarem os laboratórios e os equipamentos.

Aos funcionários do LAN em especial ao Fábio B. Rodrigues, Regina C. C. Marafon e Ana Paula Menegheti, por serem sempre tão prestativos e um auxiliarem em todas as dúvidas.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
Referências	16
2 FRUTAS UTILIZADAS COMO FONTE DE ANTIOXIDANTES	17
Resumo	17
Abstract	17
2.1 Introdução	17
2.2 Óleo de soja e seu processo oxidativo	19
2.3 Antioxidantes	23
2.3.1 Compostos fenólicos	26
2.4 Frutas como fonte de antioxidantes	28
2.5 Murtilla (<i>Ugni molinae</i> Turcz.)	29
2.6 Métodos de extração e avaliação da atividade antioxidante.....	31
2.7 Metodologias para avaliação da atividade antioxidante	35
2.7.1 Métodos de sequestro de espécies reativas geradas em meio reacional.....	35
2.7.1.1 DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)	35
2.7.1.2 ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)	36
2.7.2 Métodos de determinação da inibição da oxidação lipídica	37
2.7.2.1 Estabilidade oxidativa em Rancimat	39
2.7.2.2 Teste de estufa ou <i>Schaal Oven Test</i>.....	40
2.7.2.2.1 Índice de Peróxido (IP)	41
2.7.2.2.2 Ácidos Graxos Livres (AGL)	42
2.7.2.2.3 Espectrofotometria na região do ultravioleta	43
2.8 Considerações finais	43
Referências	44
3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE FRUTOS DE MURTILLA (<i>Ugni molinae</i> Turcz.) PELA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	61
Resumo	61
Abstract	61
3.1 Introdução	62
3.2 Material e métodos	63

3.2.1 Amostras e preparo dos extratos	63
3.2.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais (<i>Folin-ciocalteu</i>).....	64
3.2.3 Remoção de interferentes das amostras através da técnica de SPE (<i>Solid Phase Extraction</i>).....	64
3.2.4 Derivatização	65
3.2.5 Identificação química dos extratos por cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massas (CG-EM).....	65
3.2.6 Otimização da extração de fenólicos e análise estatística	66
3.3 Resultados e discussão	67
3.4 Conclusões.....	75
Referências.....	76
4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FRUTOS DE MURTILLA (<i>Ugni molinae</i> Turcz.).....	79
Resumo	79
Abstract.....	79
4.1 Introdução.....	80
4.2 Material e métodos.....	81
4.2.1 <i>Murtilla</i> e óleo de soja	81
4.2.2 Processo de extração	81
4.2.3 Correlação da atividade antioxidante	82
4.2.3.1 Determinação de compostos fenólicos totais.....	82
4.2.3.2 Atividade antioxidante (DPPH)	82
4.2.3.3 Atividade ABTS.....	83
4.2.4 Testes acelerados de oxidação	83
4.2.4.1 Estabilidade oxidativa em Rancimat.....	83
4.2.4.2 Teste de estufa ou <i>Schaal Oven Test</i>	84
4.2.4.2.1 Índice de peróxido (IP)	84
4.2.4.2.2 Ácidos graxos livres (AGL)	84
4.2.4.2.3 Absortividade no ultravioleta (UV)	85
4.2.5 Delineamento experimental e análise estatística	85
4.2.6 Resultados e discussão	85
4.2.6.1 Correlação dos compostos fenólicos totais com a atividade antioxidante	85
4.2.6.2 Estabilidade oxidativa em Rancimat.....	90
4.2.6.3 Teste de estufa	93

4.3 Conclusões	100
Referências	100
5 ANÁLISE SENSORIAL DE ÓLEO DE SOJA ADICIONADO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE FRUTOS DE <i>MURTILLA</i> (<i>Ugni molinae</i> Turcz.)	107
Resumo	107
Abstract	107
5.1 Introdução	108
5.2 Material e métodos	109
5.2.1 Amostras de <i>murtilla</i> e óleo de soja	109
5.2.2 Preparo dos extratos.....	110
5.2.3 Determinação de compostos fenólicos totais	110
5.2.4 Adição dos extratos hidroalcoólicos em óleo de soja	110
5.2.5 Análise sensorial	111
5.2.6 Delineamento experimental e análise estatística.....	112
5.3 Resultados e discussão.....	112
5.4 Conclusões	115
Referências	115
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	117
APÊNDICES	119

RESUMO

Avaliação da atividade antioxidante de extrato hidroalcoólico de *murtilla* (*Ugni molinae* Turcz.)

A oxidação lipídica é uma das causas mais importantes que levam à perda das qualidades nutricionais e sensoriais dos alimentos que possuem lipídios em sua composição, diminuindo assim sua vida de útil e provocando rejeição por parte dos consumidores. Considerando estes aspectos, a indústria de alimentos faz o uso de compostos antioxidantes, capazes de retardar a oxidação. A maioria dos antioxidantes utilizados atualmente é de origem sintética, que apresentam restrições quanto ao seu uso em alimentos que variam de país para país. Tais restrições fundamentam-se em aspectos relacionados ao impacto dos antioxidantes sintéticos sobre a saúde do consumidor. Em consequência, na última década ocorreu um aumento considerável no número de pesquisas que abordam uso de antioxidantes obtidos de fontes naturais em alimentos, a fim de identificar fontes promissoras desses compostos. Com esse objetivo, o presente trabalho avaliou a atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos de duas amostras de frutos de *murtilla* (*Ugni molinae* Turcz.), silvestre e a cultivar melhorada 14-4, por meio da aplicação de testes *in vitro* e em sistema modelo a base de óleo de soja. A aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta permitiu a seleção da melhor condição operacional para a produção de extratos hidroalcoólicos a partir dos frutos desidratados. A condição que apresentou maior eficiência para recuperação dos compostos fenólicos foi o emprego de etanol 49,5% (v/v) a temperatura de 30°C, sendo que para a *murtilla* silvestre o teor foi de 18,39 mg GAE/ g matéria seca e 26,14 mg GAE/ g matéria seca para a cultivar 14-4. As análises de ABTS e DDPH foram realizadas nos extratos produzidos nas condições otimizadas e os resultados obtidos foram 471 µmol TEAC/g matéria seca de *murtilla* silvestre e 881,84 µmol TEAC/g matéria seca de *murtilla* 14-4 para o ABTS e 229,59 µmol TEAC/g matéria seca de *murtilla* silvestre e 403 µmol TEAC/g matéria seca de *murtilla* 14-4 para o DPPH. Análise cromatográfica em fase gasosa acoplada a detector de massas foi realizada visando a identificação dos compostos presentes nos extratos, após derivatização das amostras. Foram identificados componentes como quercetina, epicatequina, ácido gálico, ácido benzoico e ácido hidrocafeico, que possuem atividade antioxidante comprovada. Os extratos potencialmente antioxidantes foram aplicados em sistema modelo (50, 100, 150 e 200 mg kg⁻¹) com óleo insaturado (óleo refinado de soja, sem adição de antioxidantes sintéticos) em condições aceleradas: Teste de estufa (*Schaal Oven Test*) e Rancimat. No teste de Estufa e no Rancimat as concentrações que apresentaram melhor poder antioxidante foram a de 150 e 200 mg kg⁻¹ para as duas amostras de extratos de frutos de *murtilla* analisadas. Os resultados de análise sensorial com provadores treinados demonstraram que não houve diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações dos extratos adicionados ao óleo de soja submetido à oxidação em estufa, sendo que o TBHQ demonstrou a melhor aceitação. Contudo, considerando as observações feitas pelos provadores é possível afirmar que após as 96 horas de estufa, o odor de ranço foi mascarado pelo odor agradável do extrato dos frutos.

Palavras-chave: Óleo de soja; Superfície de resposta; Compostos antioxidantes, Análise sensorial

ABSTRACT

Evaluation of antioxidant activity of hydroalcoholic *murtilla* (*Ugni molinae* Turcz.)

Lipid oxidation is one of the most important causes that promote the loss of nutritional and sensory qualities of foods containing lipids in their composition, thus decreasing their shelf life and causing rejection by consumers. Considering these aspects, the food industry uses antioxidant compounds that are able to inhibit or retard oxidation. However most of antioxidants currently used are synthetic, with restrictions as to its use in lipid-based foods that vary from country to country. Such restrictions are based on aspects related to the impact of synthetic antioxidants on consumer's health. Due to this, in the last decade there was an increase in the number of researches that focuses on using natural sources of antioxidants, such as vegetables, fruits, among others, in food, in order to identify potential sources of antioxidants. With this objective, the present study evaluated the antioxidant activity of hydroalcoholic extracts of two varieties of *murtilla*'s fruits (*Ugni molinae* Turcz.), wild and 14-4, through the application of in vitro assays and in a model system based on soybean oil. The application of response surfaces methodology allowed the selection of the optimal operating condition for the production of hydroethanolic extracts from dried fruit. The total phenolic compounds were determined for evaluation of extracts' antioxidant activity and adjustment of mathematical models. The condition with the highest phenolic content was extracted using ethanol 49,5% (v/v) and temperature at 30°C, the content for the wild *murtilla* was 18,39 mg GAE/g dry matter and 26,14 mg GAE/g dry sample for 14-4. The ABTS and DDPH analyses were proceeded with selected optimization extracts and the results were 471 µmol TEAC/g dry sample of wild *murtilla* and 881,84 µmol TEAC/g dry sample of 14-4 *murtilla* for ABTS and 229,59 µmol TEAC/g dry sample of wild *murtilla* and 403 µmol TEAC/g dry sample of 14-4 *murtilla* for DDPH. The analysis by gas chromatography-mass detector was performed for the identification of compounds presents in the extracts after derivatization of the samples. Were identified compounds as quercetin, epicatechin, gallic acid, benzoic acid and hidrocafeico that have proven antioxidant activity. The extracts potentially antioxidants were applied to the model system in increasing doses (50, 100, 150 and 200 mg kg⁻¹) with unsaturated oil (refined soybean oil without addition of synthetic antioxidants) under accelerated conditions: Oven Test (Schaal Oven Test) and Rancimat. Concentrations that better presented antioxidant power were 150 and 200 mg kg⁻¹ for both of *murtilla* samples. Sensory results showed that there was no statistically significant difference among the concentrations of the extracts, and TBHQ showed a better acceptance by the trained panel. However, considering the comments made by the tasters is possible to affirm that after 96 hours of oven, the rancid odor is masked by the pleasant odor of the fruit

Keywords: Soybean oil; Response surface; Antioxidant compounds; Sensory analysis

1 INTRODUÇÃO

Uma das maiores causas da deterioração e perda de qualidade nos alimentos é a oxidação lipídica, responsável pela destruição de compostos nutricionais e pela alteração do aroma e o sabor dos produtos, tornando-os desagradáveis ao consumidor. Esta reação pode ser iniciada por vários fatores como, alta temperatura, luz, presença de íons metálicos, oxigênio entre outros.

Para a indústria de alimentos, estas alterações provocam grandes danos comerciais, justificando a busca por novas tecnologias que auxiliam no aumento da vida útil dos alimentos. Estas, podem estar relacionadas à alteração de constituintes das embalagens, à redução do contato do oxigênio com o alimento, aos cuidados durante a produção dos alimentos e à adição de antioxidantes.

Os antioxidantes são compostos ativos capazes de retardar ou reduzir as reações de oxidação de compostos lipídicos (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002) e que podem ser obtidos tanto de fontes sintéticas quanto naturais. Seu uso em alimentos, no que se refere aos sintéticos, é restrito pelo fato de que em altas dosagens, podem provocar efeitos maléficos à saúde humana (HUDSON, 1990). Devido a este fato, nos últimos anos houve um aumento no número de estudos que objetivam a obtenção de antioxidantes de fontes naturais e sua avaliação quanto à capacidade de combater e sequestrar os radicais livres, além da possibilidade de sua aplicação nos alimentos.

Dentre as fontes mais estudadas estão as frutas, ervas e especiarias que possuem em sua composição compostos fenólicos que exibem, além do poder antioxidante, atividade antimicrobiana, antialérgica, antitumoral, anti-inflamatória, anti-trombótica e efeitos cardioprotetores e vasodilatadores (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2001; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Apesar de todos os benefícios oferecidos pelos antioxidantes naturais, ainda há a necessidade de maiores estudos sobre sua ação e aplicação nos alimentos, uma vez que, apesar da sua ação antioxidante comprovada, sua atividade em cada tipo de alimento pode ser diferente e sua aplicação pode provocar alterações organolépticas nos produtos. Portanto, o maior desafio é encontrar a melhor maneira de obter os compostos antioxidantes a partir de fontes naturais e utilizá-los em alimentos sem comprometer as características dos mesmos.

Dessa forma, esse trabalho foi conduzido utilizando planejamentos experimentais e análise superficial de resposta para avaliar o efeito do solvente e da temperatura na extração de compostos fenólicos de frutos desidratados de *murtilla* (*Ugni molinae* Turcz.), quantificados por meio da metodologia de *Folin-ciocalteu*. Posteriormente, após a definição da melhor

condição de extração, os compostos extraídos foram identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e em seguida foi avaliado o efeito antioxidante da adição destes extratos em sistema modelo a base de óleo de soja e seu impacto sobre a percepção sensorial.

Referências

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**, New York, v. 22, n. 9, p. 1041-1047, 2002.

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, p. 191-203, 2006.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F.R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J.A. Uses and properties of Citrus flavonoids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Barking, v. 45, p. 4505–4515, 1997.

HUDSON, B.J.F. (Ed.). **Food antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990. 430 p.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K.M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 4, p. 494-507, 2001.

2 FRUTAS UTILIZADAS COMO FONTE DE ANTIOXIDANTES

Resumo

A oxidação lipídica é considerada uma reação química deletéria em alimentos devido à produção de radicais livres e formação de compostos indesejáveis que alteram a qualidade nutricional e sensorial dos alimentos. A fim de retardar este tipo de reação, a utilização de substâncias com poder antioxidante se faz necessária. Estas substâncias podem ser tanto de origem sintética quanto natural, porém uma crescente preocupação com a saúde gerou uma tendência mundial relativa à utilização de produtos naturais. Esta revisão tem por objetivo destacar a importância de compostos com ação antioxidante oriundos de fontes naturais utilizados na conservação de alimentos, de maneira especial as frutas, além de elucidar quais são estes compostos, os procedimentos analíticos para sua extração e avaliação da sua ação antioxidante em alimentos.

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

Abstract

Lipid oxidation is considered as one of the most common reactions and important, because is through it that free radicals are produced generating undesirable compounds that alter the nutritional and sensory quality of food. In order to retard this reaction, the use of substances with antioxidant properties is required. These substances can be either synthetic as natural, but a growing health concern generated a global trend that tends to use natural products. This review aims to highlight the importance of antioxidant compounds derived from natural sources used in food preservation, especially fruits, besides elucidating what are these compounds, the analytical procedures for the extraction and evaluation of their antioxidant action in food.

Keywords: Oxidative stability; Natural antioxidants; Fruits; Extraction of phenolic compounds; Antioxidant capacity

2.1 Introdução

A deterioração oxidativa em alimentos que possuem lipídios em sua composição é considerada a responsável pela formação de odores e sabores indesejáveis que aparecem durante o processamento e armazenamento dos alimentos. Eles são responsáveis pela perda da qualidade, tanto sensorial quanto nutricional sendo que alguns compostos formados podem ser potencialmente tóxicos à saúde de quem os consome (ZAINOL et al., 2003).

Estudos evidenciam que os produtos da oxidação lipídica podem danificar as células do organismo humano e assim contribuir com processos degenerativos que estão associados ao envelhecimento e a doenças como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas entre outras (MURAMATSU et al., 1995; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

A fim de controlar a oxidação lipídica, para manter a qualidade e aumentar a vida de prateleira dos alimentos, vários métodos podem ser utilizados como, por exemplo, condições controladas durante o processamento e armazenamento, redução do contato do alimento com metais, oxigênio e luz, além da adição de compostos antioxidantes. Segundo Gutteridge (1994) o antioxidante é “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações em relação à de um substrato oxidável retarda significativamente ou impede a oxidação do referido substrato”, que pode ser tanto uma molécula presente em alimentos ou em materiais biológicos, incluindo hidratos de carbono, DNA, lipídios e proteínas (WANASUNDARA; SAHIDI, 2005).

Os antioxidantes podem ser tanto de origem sintética quanto natural, os sintéticos mais utilizados em alimentos são o butilhidroxitolueno (BHT), butilhidroxianisol (BHA), propil galato (PG) e o terc-butil-hidroquinona (TBHQ), porém é sabido que em elevadas concentrações, estes podem promover efeitos negativos à saúde (POKORNY, 1991). Por esta razão, tem aumentado o interesse no estudo e uso de antioxidantes naturais, devido à tendência mundial em evitar ou minimizar o uso de aditivos alimentares sintéticos (FRANKEL, 1996). Como potenciais fontes de compostos antioxidantes, podem-se citar os grãos e sementes oleaginosas, sementes de frutas cítricas, frutas, especiarias, entre outras (NAGEM; ALBUQUERQUE; MIRANDA, 1992; PEREIRA, 1996; SUWALSKY et al., 2006; KULISIC et al., 2004).

As frutas, além de representarem importante fonte de vitaminas, minerais e fibras, possuem compostos com atividade antioxidante (MELO et al., 2008), dentre os quais se destacam os compostos fenólicos. Estes englobam um vasto grupo de fitoquímicos, que apresentam em sua estrutura um anel aromático com pelo menos uma hidroxila (RICE-EVANS, 1996; WANG; CAO; PRIOR, 1996) e que, por possuírem esta configuração, atuam como agentes redutores capazes de interromper a reação de oxidação por duas maneiras: ou pela doação de elétrons ou átomos de hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis, ou pela sua complexação com metais presentes no meio (SAUTÉ-GARCIA et al., 1997; HOPIA; HEINOMEN, 1999; VILLANO et al., 2007).

Paralelamente, a extração e a purificação de antioxidantes oriundos de fontes naturais, tem se tornado essencial para a utilização dessas substâncias como aditivos em alimentos, fármacos e cosméticos (RAMIREZ, 2008). Está evidenciado que a seleção de um processo adequado de extração pode além aumentar a concentração de compostos antioxidantes no extrato, remover componentes indesejáveis antes da adição do composto no alimento (SCHWARZ et al., 2001). Diversas técnicas de extração utilizam solventes com polaridade

diferentes, como por exemplo, metanol (CHANWITHEESUK; TEERAWUTGULRAG; RAKARIYATHAM, 2005), água (ANGELO; JORGE, 2008), etanol (MATA et al., 2007) entre outros, entretanto deve-se considerar que extratos produzidos a partir da mesma fonte, porém por meio de técnicas diferentes, resultam em um conteúdo de compostos fenólicos final variado.

Após o processo de extração são necessários testes com o objetivo de expressar a capacidade antioxidante. Estes podem ser classificados em dois grupos: os métodos de sequestro de espécie reativa gerada em meio reacional e os métodos de inibição da oxidação lipídica. Alguns autores afirmam que a atividade antioxidante não pode ser medida diretamente, mas sim pelos efeitos combinados do antioxidante em controlar o grau de oxidação (ANTOLOVICH et al., 2001), porque para esta análise o uso de um substrato é essencial e ensaios que se baseiam no sequestro de radicais livres, utilizam um substrato artificial que não reflete de forma adequada os processos em sistemas alimentares ou biológicos.

Portanto, o objetivo desta revisão é destacar o potencial uso de frutas, em especial a *murtilla* (*Ugni molinae* Turcz.), como fonte de compostos antioxidantes, identificar quais são as substâncias com ação antioxidante presentes em sua composição, quais os procedimentos analíticos que podem ser adotados para sua extração e também avaliar sua ação antioxidante em alimentos.

2.2 Óleo de soja e seu processo oxidativo

A soja (*Glycine max*) é um produto agrícola de grande interesse mundial pela versatilidade da aplicação de seus produtos tanto na alimentação humana quanto animal, além do seu grande valor econômico. Seu óleo é um dos mais produzidos e consumidos no Brasil, em 2012 foram produzidas aproximadamente 29.469 mil toneladas de óleo de soja (ABIOVE, 2012), sendo que os maiores produtores mundiais são os Estados Unidos, Brasil, Argentina e China.

Sua principal utilização é na alimentação humana, como óleo de cozinha e como matéria-prima na preparação de vários produtos como temperos e margarinas. Também é muito utilizado na fabricação de cosméticos, fármacos, ração animal, vernizes, tintas, plásticos e lubrificantes, entre outros (AMARAL; JAIGOBIND; JAIGOBIND, 2006). A maior vantagem do óleo de soja em relação ao outras oleaginosas reside em seu baixo custo, aliado à comercialização de vários componentes minoritários que podem ser recuperados durante o processo de refino. Estes incluem os fosfolipídios recuperados como lecitina,

esteróis mistos, que servem como material para a produção de produtos farmacêuticos valiosos, e tocoferóis (vitamina E) (CLARK, 1996).

Segundo a Portaria n. 795, de 15 de dezembro de 1993 do Ministério da Agricultura, do Abastecimento e Reforma Agrária, o óleo de soja é um produto obtido por prensagem mecânica e/ou extração por solvente, dos grãos de soja (*Glycine max*), isento de misturas de outros óleos, gorduras e outras matérias estranhas ao produto (BRASIL, 1993).

Em sua composição, estão presentes o ácido palmítico ($\approx 11\%$), ácido oleico ($\approx 23\%$), ácido linoleico ($\approx 53\%$) e ácido linolênico ($\approx 7\%$), porém esta pode ser alterada por vários fatores como maturidade da planta, quantidade de óleo e desenvolvimento microbiológico nas sementes, além de fatores ambientais diversos (GRAEF et al., 1985; FEHR et al., 1971; ISHIKAWA et al., 2001). Os ácidos linoleico e linolênico estão diretamente ligados à perda de qualidade do óleo devido às insaturações presentes em sua molécula, tornando-o mais susceptível as reações de oxidação, além de servirem como substrato para as enzimas lipoxigenases que liberam compostos também responsáveis pelo ranço (HAMMOND, 1992).

A Tabela 1 ilustra de uma maneira mais completa a composição, em ácidos graxos, do óleo de soja.

Tabela 1 - Composição percentual em ácidos graxos do óleo de soja

Saturados		
Ácido Graxo		Composição %
14:0	Mirístico	Traços
16:0	Palmítico	9,0 a 14,5
18:0	Esteárico	2,5 a 5,0
20:0	Araquídico	Traços
22:0	Behêmico	Traços
Mono-insaturados		
Ácido Graxo		Composição %
16:1	Palmitoleico	Traços
18:1	Oleico	18,0 a 34,0
Poli-insaturados		
Ácido Graxo		Composição %
18:2	Linoleico	45,0 a 60,0
18:3	Linolênico	3,5 a 8,0

Fonte: Adaptado de Amaral, Jaigobind e Jaigobind (2006)

A reação de oxidação do óleo é considerada uma das principais causas da deterioração em alimentos (ALLEN; HAMILTON, 1994). Quando a porção lipídica dos alimentos é exposta à fatores como luz, íons metálicos, elevadas temperaturas, oxigênio (VELASCO; DOBARGANES, 2002), entre outros, a reação de oxidação se desenvolve, produzindo compostos indesejáveis (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992; SIMIC; JOVANOVIC; NIKI,

1992) que alteram o odor (*off flavour*), o sabor, contribuem para a descoloração e redução da qualidade nutricional, reuzindo a vida útil dos produtos e provocando repulsa por parte dos consumidores (HRAS et al., 2000).

A oxidação ocorre no grupo metileno adjacente à dupla ligação carbono-carbono. Seu desenvolvimento acontece pela formação de radicais livres de ácidos graxos, no qual o átomo de carbono ativado adjacente a uma dupla ligação reage com o oxigênio formando um hidroperóxido, que por sua vez se decompõe em compostos orgânicos de baixo peso molecular como aldeídos, alcoóis, cetonas e ácidos responsáveis pelo sabor e odor de ranço (BUCK, 1991).

A oxidação pode ocorrer nos alimentos de várias maneiras, a exemplo da oxidação enzimática, onde ocorre a ação de enzimas lipoxigenases sobre os ácidos graxos polinsaturados (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; HALLIWELL et al., 1995), a fotoxidação promovida pela radiação UV na presença de agentes fotossensibilizadores (clorofila, mioglobina, riboflavina) que absorvem a energia luminosa e a transferem para o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) gerando o estado singlete ($^1\text{O}_2$) que é altamente reativo (BERGER; HAMILTON, 1995) e a auto-oxidação, considerada o principal mecanismo de oxidação de óleos e gorduras.

A reação de auto-oxidação ocorre em três etapas :

- Iniciação – formação de radicais livres do ácido graxo pela retirada de um hidrogênio do carbono alílico da molécula do ácido graxo, em condições favorecidas por luz e calor (TOLEDO; ESTEVES; HARTMANN, 1985).
- Propagação – os radicais livres susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico são convertidos em outros radicais, gerando os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes. Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico (TOLEDO; ESTEVES; HARTMANN, 1985).
- Término – dois radicais combinam-se, com a formação de produtos estáveis (produtos secundários de oxidação) obtidos por cisão e/ou rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis) (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; BERGER; HAMILTON, 1995). A Figura 1 demonstra o esquema geral da oxidação lipídica.

Figura 1 - Mecanismo da oxidação lipídica
 Fonte: Adaptado de Ramalho e Jorge (2006)

A fim de reduzir e mesmo retardar a autooxidação de óleos e gorduras uma série de medidas mostra-se necessária para a diminuição da incidência de todos os fatores que favorecem esta reação, como redução da temperatura e da incidência de luz, evitar a presença de metais no óleo, reduzir o contato com o oxigênio e bloquear a formação de radicais livres pelo uso de antioxidantes (JORGE; GONÇALVES, 1998).

Em seres humanos, a oxidação de compostos lipídicos é considerada muito importante pelo fato de promover o desenvolvimento de diversas doenças degenerativas como, por exemplo, câncer, aterosclerose, processo de envelhecimento precoce, entre outros (ATOUI et al., 2005; FUKUMOTO et al., 2000; GÓMEZ, 2003; IBÁÑEZ et al., 2000).

Em organismos vivos, a produção de energia utilizada nas atividades essenciais das células gera radicais livres em condições normais, como ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($\text{HO}^{\bullet}$), o radical peroxila ($\text{ROO}^{\bullet}$) e espécies não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), conhecidos por “espécies reativas de oxigênio” (EROs) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). As EROs quando reagem com lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, podem provocar uma grande desordem celular. Elas estão envolvidas em processos de envelhecimento e também em complicações biológicas como inflamações crônicas, problemas respiratórios, doenças neurodegenerativas, carcinogênese e mutagênese (GYANFI; YONAMINE; ANIYA, 1999; GÜLCIN et al., 2003; CHANWITHEESUK; TEERAWUTGULRAG; RAKARIYATHAM, 2005). Portanto, a presença de sistemas ou o uso de compostos que previnam ou retardem a oxidação, tanto nos alimentos quanto no organismo, é fundamental.

Para a indústria de alimentos uma das medidas mais aplicadas a fim de proteger os alimentos contra esse tipo de deterioração, é o uso de compostos antioxidantes.

2.3 Antioxidantes

O termo “antioxidante” refere-se a um composto capaz de inibir ou retardar a oxidação de lípidos ou de moléculas através da inibição da iniciação ou propagação da reação oxidativa em cadeia (VELIOGLU et al., 1998). De acordo com Campbell (2000), o antioxidante é um composto redutor, facilmente oxidado, que evita que outras substâncias se oxidem. Eles podem atuar de diferentes maneiras como, por exemplo, impedindo a formação de radicais livres, inibindo as reações em cadeia com o ferro e o cobre, evitando danos oxidativos por meio da interceptação de radicais livres impedindo assim que os mesmos reajam com lipídios, aminoácidos, duplas ligações de ácidos graxos poliinsaturados e com as bases de DNA (MELO, 2010). Por apresentarem diversos mecanismos de ação estes compostos são amplamente utilizados na indústria alimentícia (SCHERER; GODOY, 2009).

Seu uso e atividade são muito estudados, uma vez que, para serem adicionados aos alimentos, devem apresentar características como atoxicidade, alta atividade em baixas concentrações (0,001 a 0,01%) (BAILEY, 1996), se concentrar na porção lipídica do alimento, resistir às condições de processamento e ainda contribuir com a estabilidade do produto final (HRAS et al., 2000). Podem ser tanto de origem sintética como natural. Os sintéticos são mais utilizados em alimentos lipídicos por fatores ligados a sua eficácia, energia de ativação, constantes de velocidade, potencial de óxido-redução, custo e solubilidade já conhecida (CONEGLIAN et al., 2011). Podem atuar como agentes redutores, captadores de radicais livres, complexantes potenciais de metais pró-oxidantes e supressores de oxigênio singlete (HUDSON, 1990).

Os antioxidantes sintéticos são classificados em primários, sinérgicos, removedores de oxigênio singlete, agentes quelantes e antioxidantes mistos (BAILEY, 1996). Os primários são compostos por substâncias fenólicas capazes de remover ou inativar os radicais livres formados na fase inicial ou de propagação da reação de oxidação, pela doação de um próton ao radical livre, regenerando a molécula do acilglicerol, interrompendo, assim a reação em cadeia (SIMIC; JAVANOVIC, 1994) (Figura 2), entretanto não são capazes de inibir a fotoxidação e sequestrar o oxigênio singlete.

Figura 2 - Possíveis interações de antioxidantes primários e secundários na reação de oxidação lipídica em alimentos

Fonte: Adaptado de Wanasundara e Shahidi (2005)

O antioxidante primário (AH) reage com os radicais lipídicos e peroxi ($\text{ROO}\cdot$) convertendo-os em produtos estáveis, não radicais. Este antioxidante é capaz de doar um átomo de hidrogênio para produzir radicais ($\text{A}\cdot$) mais estáveis e menos prontamente disponíveis para participarem da etapa de propagação. A propagação é a etapa mais lenta da reação de oxidação, assim os radicais peróxidos estão presentes em maiores quantidade que os outros radicais no meio, além disso estes possuem energia mais baixa que os alcoxi, deste modo reagem mais rapidamente com o antioxidante primário do que com os ácidos graxos insaturados (BUETTNER, 1993; DECKER, 2002).

O radical antioxidante produzido à partir da doação de um átomo de hidrogênio apresenta baixa reatividade, é relativamente estável quando comparado à outros radicais formados, reage com os interceptores dos radicais peroxi ($\cdot\text{ROO}$) a fim de deter a propagação da oxidação e também pode reagir com os radicais alcoxi ($\text{RO}\cdot$) reduzindo a decomposição dos hidroperóxidos (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005). A eficácia do antioxidante está intimamente relacionada as propriedades químicas do composto, o que inclui a energia de ligação do hidrogênio e susceptibilidade a auto-oxidação, sendo que a capacidade de doação do átomo de hidrogênio da molécula antioxidante para o radical livre é considerado principal requisito (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

Os antioxidantes primários mais conhecidos e utilizados pela indústria são o butil hidroxianisol (BHA), o butil hidroxitolueno (BHT) e o terc-butil-hidroquinona (TBHQ).

O TBHQ é considerado o mais eficiente para óleos vegetais, pois é resistente a altas temperaturas, menos volátil quando comparado ao BHA e ao BHT e seu poder *carry through* é considerado razoável em produtos assados e em frituras, quando comparado ao do BHA (NAWAR, 1985; COPPEN, 1994; VALENZUELA; NIETO, 1996; REISCHE, 1998). No Brasil, a concentração de TBHQ permitida em óleos e gorduras é de 200mg/kg (sobre o teor lipídico) (BRASIL, 2005); porém, em alguns países seu uso é proibido, como no Canadá e em países da União Européia (REISCHE; LILLARD; EITENNMILLER, 2008).

Apesar dos antioxidantes sintéticos possuírem sua atividade comprovada e alta estabilidade, seu uso é restrito em muitos países devido à potencial toxicidade e/ou mutagênese em certas concentrações (MATTEA et al., 2004; NAKATANI, 1996), sendo assim a maior vantagem do uso dos antioxidantes naturais, além da aceitação imediata do consumidor, a ausência de limites pela legislação.

Como resultado verifica-se aumento no interesse por antioxidantes naturais, com pesquisas que comprovam que legumes, frutas, sementes, madeiras, cascas, raízes, folhas, temperos e ervas constituem potenciais fontes de compostos antioxidantes (VELIOGLU et al., 1998; RUBILAR et al., 2006). Porém, é necessária a identificação dos seus compostos ativos e realização de estudos toxicológicos para viabilizar sua utilização. Para a aplicação eficiente de um antioxidantes de origem natural é necessário considerar uma série de fatores importantes, como estabilidade, solubilidade, elaboração e custo (GÓMEZ, 2003).

Em geral, os antioxidantes naturais podem ser representados por compostos fenólicos (tocoferóis, flavonoides, antocianinas, taninos, lignanas, cumarinas e ácidos fenólicos), compostos de azoto (alcaloides e derivados de clorofila, aminoácidos e amins), ou carotenoides, bem como o ácido ascórbico (LARSON, 1988; HUDSON, 1990; HALL; CUPPETT, 1997). Em particular, os flavonoides, além de atuarem como agentes redutores, inibidores de radicais livres, quelantes ou sequestrantes de oxigênio e desativadores de metais pró-oxidantes (KÄHKÖNEN et al., 1999; RICE-EVANS et al., 1995), exibem efeitos biológicos, como antibacteriano, antiviral, anti-inflamatório, antialérgico, antitrombótico e vasodilatador (COOK; SAMMON, 1996).

Sabe-se que alimentos que possuem em sua composição um alto teor de compostos antioxidantes são importantes aliados na prevenção de doenças como cardiovasculares, câncer e doenças neurodegenerativas causadas pelo envelhecimento das células (BANDONIENE et al., 2002; DEMO et al., 1998; GÓMEZ, 2003; KAUR et al., 2001). Entre os que mais se destacam e são mais utilizados estão a vitamina E, o ácido ascórbico, os carotenóides e

principalmente, os compostos fenólicos, mais abundantes na dieta humana (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

2.3.1 Compostos fenólicos

São inúmeros os compostos naturais encontrados em frutas, cereais e outros vegetais que apresentam atividade antioxidante dentre os mais importantes estão os compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos e taninos), os nitrogenados (alcaloides, aminoácidos, fosfolipídios, peptídeos, aminas e derivados da clorofila), os pigmentos carotenoides, os tocoferóis, o ácido ascórbico, o ácido fítico e os esteróis (AMAROWICZ et al., 2004).

Segundo Soares (2002) os compostos fenólicos são substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos de hidroxilas, muito estudados devido sua atividade antioxidante, sendo divididos em flavonoides e os não-flavonóides, ambos metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais (BURNS et al., 2001). Dos flavonoides fazem parte os flavanóis (taninos, catequina, epicatequina e epigallocatequina), os flavonóis (campferol, quercetina, miricetina e rutina), as flavonas (isoflavonas), as antocianinas e as antoxantinas; e dos não-flavonóides estão os ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxibenzóico (ácido vanílico, sirínico, gentísico, salicílico, elágico e gálico) e os ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico, tais como os ácidos p-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico (TSANG et al., 2005).

Sua estrutura é formada por $C_6-C_3-C_6$, o difenil propano (Figura 3), sendo os compostos mais diversificados no reino vegetal (PRADO, 2009). O núcleo consiste em dois anéis fenólicos (A e B) e um anel (C) que pode ser um pirano heterocíclico, como nos flavanóis (catequinas) e antocianidinas, ou pirano como nos flavonóis, flavonas, isoflavonas e flavanonas (BRAVO, 1998).

Figura 3 - Estruturas gerais dos principais flavonoides
Fonte: Mateus (2009)

Os compostos fenólicos são essenciais para o crescimento e reprodução vegetal e são formados em resposta às reações de estresse da planta como, por exemplo, infecções, ferimentos, radiações, entre outras (FERGUSON; HARRIS, 1999).

Seu conteúdo nas suas fontes de origem pode ser influenciado por fatores como estação do ano, incidência de radiação ultravioleta, clima, composição do solo, preparo e processamento do alimento (EWALD et al., 1999; HERTOOG et al., 1992; McDONALD et al. 1998, TRICHOPOULOU et al., 2000). Na Tabela 2 estão descritas algumas fontes de flavonoides.

Tabela 2 - Algumas classes e fontes de flavonoides

Classes	Nome	Fonte
Flavanóis	Epicatequina	Chás verde e preto, uvas, vinho tinto.
	Catequina	
	Epigallocatequina	
	Epicatequina galato	
	Epigallocatequina galato	
Flavonóis	Canferol	Brócolis, chá preto, alho-poró, rabanete, cebola, alface, casca de maçã, cerejas.
	Quercetina	
	Miricetina	Vinho tinto, uvas, berries (bagas)
Flavona	Ácido cafeico	Uvas, vinho branco, azeitonas, azeite de oliva, espinafre, aspargo, café.

Fonte: Adaptado de Rice-Evans, Miller e Paganda (1996)

As propriedades biológicas de cada composto fenólico estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada grupamento fenol exerce sobre determinado meio, por isto podem atuar de diferentes formas, como sequestradores de radicais livres, quelantes de metais (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992), agindo tanto na etapa de iniciação quanto na propagação da reação de oxidação.

Diversos estudos sugerem que os flavonoides podem ser benéficos à saúde, auxiliando no combate de diversas doenças (PATIL et al., 2009). Estudos com antoxantinas e antocianinas demonstram sua capacidade em sequestrar radicais livres e seus efeitos na prevenção de doenças cardiovasculares e circulatórias (STOCLET et al., 2004), cancerígenas, no diabetes e no mal de Alzheimer (ABDILLE et al., 2005).

Para a identificação e isolamento destes compostos é essencial considerar diversos fatores como a fonte (raiz, folha, fruto, etc) (GÓMEZ, 2003; KAUR et al., 2001; RIBEIRO et al., 2001), o solvente a ser utilizado, a temperatura e o tempo da extração, entre outros.

2.4 Frutas como fonte de antioxidantes

Atualmente o consumo de frutas tem aumentado em virtude de seu valor nutritivo e de seus efeitos biológicos à saúde (KUSKOSKI et al., 2006; DELPORTE et al., 2007; HEINONEM, 2007; SZAJDEK; BOROWSKA, 2008). As frutas possuem compostos como vitamina C e E, carotenoides, clorofila e fitoquímicos, como compostos fenólicos, flavonoides, glicosídeos e taninos (WANG; CAO; PRIOR, 1996; PELLEGRINI et al., 2007), que possuem relação com a prevenção de certas doenças e enfermidades cardiovasculares e circulatórias (STOCLET et al., 2004) devido ao seu efeito antioxidante. Dietas ricas em frutas e vegetais estão associadas a um risco reduzido de doenças crônicas (HERTOG et al., 1997; HOLLMAN; HERTO; KATAN, 1996).

Segundo Lampe (1999), alguns componentes existentes nas frutas podem atuar como estimuladores do sistema imunológico, moduladores da síntese de colesterol e da redução da pressão sanguínea. Seeram (2008) afirma que a ingestão de frutos silvestres provoca um impacto positivo na saúde do coração, além de auxiliar no combate de certas doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, envelhecimento, obesidade e de certos tipos de câncer, tais como do esôfago e gastrointestinal.

É fundamental ter conhecimento que o teor dos compostos antioxidantes presentes nas frutas é influenciado por diversos fatores como cultivar, fatores genéticos, estágio de maturação, condições climáticas e pelo solo. Além disso, os compostos bioativos também são muito susceptíveis às reações de oxidação que ocorrem durante o processamento e estocagem de alimentos (MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990; ROBARDS, 1999).

Pela grande quantidade de compostos fenólicos presentes, o consumo de frutas, em especial bagas como mirtilo, uva, framboesa, morango e amora preta, tem sido associado à redução do risco de doenças cardiovasculares. Wu et al. (2004) realizaram um estudo com mais de 100 tipos de frutas, legumes, frutas secas, nozes, especiarias, cereais e outros alimentos e com os resultados obtidos estabeleceram um ranking dos 20 alimentos mais ricos em antioxidantes, em que seis deles são bagas como o mirtilo (*Vaccinium corymbosum* L.) e o mirtilo selvagem (*Vaccinium myrtillus*), o cranberry (*Vaccinium oxycoccos*), a amora preta (*Rubus* sp.), a framboesa (*Rubus idaeus*), o morango (*Fragaria ananassa*) e a cereja (*Prunus avium*) (SCHEUERMANN et al., 2008).

Os compostos polifenólicos presentes em bagas, frutos e vegetais são importantes, não apenas em termos de qualidade, uma vez que influenciam na aparência e no sabor, mas também sob o ponto de vista terapêutico (ARANCIBIA-AVILA et al., 2011; BOROWSKA; MAZUR, 2008).

As frutas de coloração vermelha/azul são consideradas as mais importantes fontes de compostos fenólicos em dietas alimentares, porque apresentam quantidades significativas de derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico como as antocianinas, os flavonóis, as catequinas e os taninos (hidrolisados ou condensados) sendo que muitos destes compostos demonstram efeitos biológicos como ação antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e vasodilatadora (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Atualmente, as bagas são intensamente estudadas (SCHRECKINGER et al., 2010) sendo comprovado que as mesmas possuem uma vasta gama de polifenóis como antocianinas, ácidos fenólicos e taninos, além de compostos nutritivos como os carotenóides e vitamina C (KÄHKÖNEN; HOPIA; HEINONEN, 2001; PINELI et al., 2011).

Desta maneira é possível afirmar que os frutos do tipo *berrie* (bagas) constituem uma importante fonte de compostos fenólicos para a alimentação humana, sendo os compostos derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico, antocianinas, flavonóis, catequinas e taninos hidrolisáveis e condensados os mais comumente encontrados (MACHEIX et al., 1990).

2.5 Murtilla (*Ugni molinae* Turcz.)

A *Ugni molinae* Turcz. é um arbusto silvestre encontrado no Chile, desde o sul de Talca, conhecida como VII região, até o rio Palena, XI Região. É conhecida como *murtilla*, murta ou uni e pertence à família *Myrtaceae*. Em seu habitat natural, se desenvolve como um arbusto cuja altura varia de 1 a 2 m, podendo chegar a 4 m. É uma cultura perene, arbustiva, com folhas lanceoladas de coloração verde escuro. Suas flores são hermafroditas, possuem forma de sino e podem apresentar uma coloração branca, rosa ou roxa dependendo da cultivar (MONTENEGRO, 2000). A floração ocorre no final de novembro e o fruto amadurece em meados do verão (entre dezembro e março) (NOVOA, 1983).

Seus frutos são globosos, pequenos, com sabor e aroma agradáveis e podem apresentar uma grande variabilidade quanto à cor e ao tamanho dependendo da região em que crescem. Segundo Scheuermann et al. (2008), seu tamanho pode variar de 0,9 a 1,3cm e podem pesar de 0,21 a 1,01g.

É uma planta que não necessita de umidade excessiva, nem sol constante, compatível com a maioria dos tipos de solos sendo muito resistente à seca e ao vento. É facilmente domesticável e seu cultivo possível em grande escala, gerando assim maior exportação de seus produtos e derivados (PASTENES et al., 2003). A colheita dos frutos depende da região de cultivo, sendo mais tardia quanto mais fria a região. Os frutos são muito utilizados na

produção de geléias, licores, xaropes, sucos, marmeladas, compotas, chocolates, entre outros produtos (MUÑOZ et al., 1986). Suas folhas também são de grande importância, pois são muito utilizadas pela medicina local (SCHEUERMANN et al., 2008) contra inflamações e dores, além de infecções urinárias e dores de garganta.

Estudos relatam que a composição química das folhas da *murtilla* pode variar em função das condições climáticas em que a planta está sujeita durante o seu crescimento (RUBILAR et al., 2006). Há evidências de que um clima extremo é considerado a condição ideal para um elevado teor de polifenóis em suas folhas (SHENE et al., 2009).

Inicialmente, estudos se concentraram nas folhas de *murtilla*, determinando seus principais compostos fenólicos, sua capacidade antioxidante e seu mecanismo de ação à nível celular (AVELLO; PASTENE, 2005; RUBILAR et al., 2006; SUWALSKY et al., 2007). Os extratos das folhas, segundo um estudo feito por Rubilar et al. (2006), além de apresentarem heterosídeos de flavonóis, como por exemplo miricetina, campferol e quercetina, epicatequina e derivados de ácido gálico, também possuem efeito inibitório sobre o crescimento de bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* entre outras (SHENE et al., 2009). Entretanto a avaliação da capacidade antioxidante dos frutos de *murtilla* também é interessante, pois este *berrie* pode representar uma nova cultura alternativa (SEGUEL; AVENDANO, 2001; SEGUEL; TORRALBO, 2004).

Peña (2005) fez um estudo preliminar com frutos de *murtilla* colhidos em Pumalal, na região de La Araucanía, Chile, e concluiu que tanto as frutas como suas infusões aquosas, demonstram a mesma atividade antioxidante. Recentemente Ruiz et al. (2010) demonstraram que os frutos possuem flavonóis, flavanóis e um teor em polifenol de aproximadamente 32 ± 4 mg de ácido gálico/100g de fruta. Penã-Neira e colaboradores (2007) determinaram compostos fenólicos de baixo peso molecular em frutos de *murtilla* de diferentes ecotipos, além de outros frutos nativos chilenos, utilizando o método de cromatografia líquida de alta precisão com detector *Diode Array* (HPLC-DAD). Os perfis cromatográficos obtidos variaram de acordo com os ecotipos analisados e os principais polifenóis identificados foram a quercetina e a quercetina (Tabela 3).

Tabela 3 - Principais polifenólicos descritos em Frutos Nativos Chilenos

Espécie	Parte da planta	Não Flavonóides	Flavonóides
Maqui	Fruto	-	Antocianidinas (delfinidina, cianidina)
Calafate	Fruto	-	Antocianidina (ni)
<i>Murtilla</i>	<i>Folha</i>	<i>Ácidos fenólicos</i>	<i>Flavonóis (epicatequina, miricetina e quercetina).</i>
	<i>Fruto</i>	-	<i>Flavonóis (quercetina)</i>
Fruta Chilena	Fruto	-	Flavonóis (quercetina), antocianidinas (cianidina, pelargonidina)
	Receptáculo	Ácido E-cinâmico	-
	Aquênios	Ácidos hidroxibenzóicos (ácido elágico)	Antocianidina (cianidina).

Fonte: Adaptado de Fredes (2009)

ni: Compostos químicos não identificados

2.6 Métodos de extração e avaliação da atividade antioxidante

Segundo Becker, Nissen e Skibsted (2004), o procedimento para aplicação de compostos antioxidantes de origem natural em alimentos pode seguir os passos indicados na Figura 4.

Figura 4 - Procedimento para aplicação de compostos antioxidantes em alimentos

Fonte: Adaptado de Becker, Nissen e Skibsted (2004)

Para a extração de compostos fenólicos de frutas, legumes e hortaliças entre outros, existem atualmente diversas metodologias. Pesquisas têm sido direcionadas para diferentes tipos de extração com o objetivo de comparar os resultados obtidos e assim desenvolver a melhor alternativa para sua aplicação em alimentos (ANDREO; JORGE, 2006). Diversos

fatores influenciam na eficiência da extração sólido-líquido, como por exemplo, a composição da solução extratora, polaridade do solvente, tempo de extração, temperatura, pH, relação sólido/líquido e tamanho das partículas (CACACE; MAZZA, 2002, 2003; CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009; POMPEU; SILVA; ROGEZ, 2009); devendo ser todos considerados no momento da seleção do método de extração de compostos fenólicos.

Dentre as metodologias mais tradicionais, se encontram os métodos que utilizam solventes orgânicos como água, etanol, metanol, acetona, éter e hexano (REHMAN; HABIB; SHAH, 2004). Porém, sob o ponto de vista químico, não é possível selecionar somente uma metodologia que seja a mais eficiente para a extração desses compostos, pelo fato de que o sucesso da extração sofre influência de diversos fatores, como a natureza do vegetal, o solvente empregado na extração, o tamanho das partículas, o tempo e a temperatura de extração (SHAHIDI; NACZK, 2003).

A escolha do solvente é importante, pois este deve ser capaz de arrastar maior quantidade dos compostos presentes na amostra. Os métodos mais utilizados baseiam-se na combinação de solventes orgânicos como água, etanol e metanol (LEAL et al., 2003; REHMAN; HABIB; SHAH, 2004), temperatura e tempo. A influência dos solventes utilizados na extração tem sido bastante estudada. Em pesquisas que comparavam a extração de compostos fenólicos com etanol e água, em relação ao metanol, foi evidenciado que o metanol promove maior extração de polifenóis em bagaço de uva e folhas de *murtilla* (PINELO et al., 2005; RUBILAR et al., 2006). Segundo SCHEUERMANN et al. (2008), a extração utilizando a combinação de água e metanol foi mais eficiente para maior extração de polifenóis totais de *murtilla*. Já Rubilar et al. (2011) obtiveram resultados com alto teor de compostos fenólicos obtidos por meio extratos utilizando água e etanol (50%, v/v) de frutos nativos chilenos (*maqui* e *murtilla*).

Vizzoto e Pereira (2011) avaliaram se a utilização de diferentes solventes e suas combinações influenciavam no teor de fenólicos totais extraídos de amora-preta (*Rubus* sp.) sendo que o uso de acetona e sua combinação com etanol e metanol apresentou melhor resultado. Spagolla et al. (2009) verificaram que as soluções hidroalcoólicas na proporção de 60:40 (v/v), bem como as soluções hidrometanólicas na proporção de 60:40 e 80:20 (v/v), foram capazes de extrair maior quantidade de fenólicos totais da polpa mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*).

Pompeu, Silva e Rogez (2009), verificaram que o etanol, em uma concentração de 70 a 80% (v/v), apresentou os melhores resultados na obtenção de compostos fenólicos de açaí. Soares et al. (2007) verificaram que uma solução de acetona a 75% (v/v) demonstrou melhor

resultado quanto ao teor de compostos fenólicos obtidos de casca de uvas das cultivares Niágara e Isabel. Já Takikawa, Rampazzo e Haminiuk (2012) obtiveram bons resultados de compostos fenólicos em extratos preparados com metanol absoluto em frutas vermelhas, como amora-preta, framboesa e morango.

De acordo com Franco e colaboradores (2008), é importante observar que o rendimento da extração e a atividade antioxidante dos extratos estão intimamente relacionados à polaridade do solvente utilizado na extração, o que determina tanto qualitativamente quanto quantitativamente os compostos antioxidantes extraídos. Os maiores rendimentos são obtidos geralmente com etanol e metanol e suas misturas com água, embora outros solventes também apresentem bons resultados como, por exemplo, acetona. A utilização do etanol combinado com água é preferida por apresentar baixa toxicidade e elevado rendimento de extração, além da possibilidade de modular a polaridade do solvente utilizando etanol/água em misturas com diferentes proporções.

Outro fator a ser considerado é o tempo de extração, que pode variar de 1 minuto a 24 horas, sendo que longos períodos aumentam a probabilidade da oxidação dos compostos fenólicos (SHAIJI; NACZK, 1995). Lapornik, Prosek e Wondra (2005) estudaram o efeito da temperatura em extratos de resíduos de frutas vermelhas preparados com etanol, metanol e água. Os autores verificaram que o maior tempo de extração resultou em menor obtenção de compostos fenólicos nos extratos aquosos, enquanto que nos extratos metanólicos e etanólicos houve um aumento no conteúdo dos mesmos com o avanço do tempo de extração.

Segundo Andreo e Jorge (2006), a temperatura também é considerada um fator crucial a ser controlado no momento da extração, porque a estabilidade de compostos fenólicos durante a produção dos extratos pode ser afetada, sendo considerada a maior causadora da redução do conteúdo de polifenóis. Isto ocorre pelo fato de que os fenóis podem reagir com outros componentes, impedindo sua extração (MOURE et al., 2001).

Após a extração dos compostos fenólicos podem ser realizadas diversas análises que tem por objetivo, além de quantificar os compostos fenólicos, avaliar a capacidade antioxidante dos extratos. É imprescindível ter conhecimento que a atividade antioxidante dos extratos produzidos não depende somente da presença e concentração de compostos fenólicos, mas também da metodologia de extração aplicada (HERNANDÉZ-HERNADÉZ et al., 2009).

É de grande interesse para pesquisadores da área da saúde e para o público em geral o conhecimento dos constituintes e da ação antioxidante dos alimentos que são consumidos. Infelizmente pela complexidade da composição dos alimentos, a separação e o estudo individual de cada substância com poder antioxidante se torna inviável. Desta maneira espera-

se que pesquisadores desenvolvam metodologias rápidas para a determinação da eficiência dos antioxidantes (PRADO, 2009).

A fim de quantificar os compostos fenólicos presentes nos extratos, a metodologia mais utilizada é pelo uso do reagente de *Folin-ciocalteu*. Esta metodologia foi inicialmente desenvolvida por Singleton e Rossi (1965) e posteriormente modificada por vários pesquisadores. O reagente de *Folin-ciocalteu* é uma solução de íons poliméricos formados a partir de ácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos que oxidam os fenolatos, reduzindo-os a ácidos, formando um complexo de cor azul Mo-W que pode ser lido em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 740nm. Apesar do conteúdo de fenólicos totais ser utilizado para explicar a atividade antioxidante, muitas vezes é improvável que ele a represente fielmente (HEINONEM; LEHTONEN; HOPIA, 1998; KAHKONEN et al., 1999) uma vez que este método pode sofrer a interferência de vários compostos como mono/dissacarídeos, ácido ascórbico, íons metálicos, ácidos orgânicos, entre outros que, muitas vezes, podem superestimar os resultados obtidos (STRATIL; KLEJDUS; KUBÁN, 2007). Portanto, torna-se necessária uma identificação mais detalhada dos compostos fenólicos presentes nos alimentos e que determine de forma fiel a atividade antioxidante dos compostos fenólicos.

Apesar de ensaios baseados nos dados obtidos da análise da atividade antioxidante não se mostrarem representativos em situações reais (HUANG; OU; PRIOR, 2005), diversas técnicas têm sido utilizadas a fim de determinar esta atividade *in vitro* e permitir a seleção de substâncias potencialmente interessantes (PRADO, 2009).

Os antioxidantes podem ser avaliados por sua habilidade no sequestro de espécies reativas no meio ou quanto à sua eficiência na inibição da peroxidação lipídica (OLIVEIRA et al., 2009). Porém, apesar da determinação da capacidade antioxidante em alimentos ser de extrema importância, há uma grande variedade de métodos que são utilizados com esta finalidade, mas que não são validados ou padronizados (GIADA; MANCINI-FILHO, 2004), o que dificulta a comparação de resultados de diferentes estudos.

Dentre os métodos de sequestro de espécie reativa gerada em meio reacional, estão incluídos o ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e o DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) e para os métodos de inibição da oxidação lipídica podemos citar os testes de oxidação acelerada como o Teste de Estufa (*Schaal Oven Test*) e o Rancimat.

2.7 Metodologias para avaliação da atividade antioxidante

2.7.1 Métodos de sequestro de espécies reativas geradas em meio reacional

2.7.1.1 DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

O método DPPH foi concebido há quase 50 anos por Marsden Blois na Universidade de Stanford (BLOIS, 1958), utilizando como modelo antioxidante o aminoácido cisteína. Posteriormente, este foi modificado por Brand-Williams e colaboradores (1995), sendo usado como padrão por diversos outros pesquisadores. Atualmente é um dos mais utilizados para a determinação da capacidade de um composto em capturar radicais livres. É uma metodologia adotada em diferentes laboratórios por ser rápida, prática e estável (ESPIN et al., 2000), além de ser facilmente reproduzida e recomendada para análise de extrato de frutas (MOON; SHIBAMOTO, 2009) mas que também pode ser aplicada para avaliação de grão e farelo de trigo, vegetais, ácidos linoleicos conjugados, ervas e óleos de sementes comestíveis utilizando diferentes solventes como etanol, acetona, metanol e benzeno (CHENG; MOORE, YU; 2006).

O DPPH é um radical de nitrogênio orgânico estável, de coloração violeta, que apresenta absorção máxima na faixa de 515 a 529nm. A redução do radical DPPH à DPPH2 é monitorada pelo decréscimo da absorbância durante a reação (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Na presença de um doador de hidrogênio ou elétron, a intensidade da absorção diminui e a solução com o radical perde sua coloração violeta, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados (MOLYNEUX, 2004) (Figura 5).

Figura 5 - Reação genérica entre o radical livre DPPH e um antioxidante indicando a mudança de coloração
Fonte: Adaptado de Freitas et al. (2009)

A maior desvantagem deste método consiste no uso de diversos solventes como água, metanol, etanol, acetona, éter de petróleo, hexano e diclorometano para o preparo de extratos. Além disso, os resultados do DPPH podem ser apresentados em diferentes unidades, como percentual de atividade antioxidante (CERVATO et al., 2000; PRADO, 2009), percentual de atividade em relação ao controle (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005), percentual de inibição (ERKAN; AYRANCI; AYRANCI, 2008; EL-GHORAB et al., 2010), micromol de

Trolox por grama de amostra (WOJDYLO; OSZMIANSKI; CZEMERYYS, 2007) e pela quantidade necessária de um antioxidante para reduzir a 50% a concentração do DPPH[•] inicial (E₅₀) (KOSAR; DORMAN; HILTUNEN, 2005; HINNEBURG; DORMAN; HILTUNEN, 2006; PRADO, 2009; LAGOURI; NISTEROPOULOU, 2009), dificultando a comparação dos resultados da atividade antioxidante com os relatados em outras pesquisas.

2.7.1.2 ABTS (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico))

Segundo Re e colaboradores (1999), o método ABTS baseia-se na formação do ABTS^{•+}, por meio da redução do ABTS pelo persulfato de potássio. Este radical pode ser gerado pela redução provocada pelo persulfato de potássio ou pela ação enzimática. É um composto solúvel tanto em água quanto em solventes orgânicos, permitindo que a análise seja feita em amostras hidrofílicas e lipofílicas (ARNAO, 2000).

Com a formação do radical ABTS, a solução apresenta uma coloração azul esverdeada com absorção máxima nos comprimentos de onda de 415, 645, 734 e 815nm (Figura 6). A atividade antioxidante é determinada pelo descoloramento do ABTS, que ocorre à medida que o radical é reduzido, sendo os resultados obtidos expressos em capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC) que é um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante (RE et al., 1999; DORMAN; HILTUNEN, 2004; MURCIA et al., 2004; PELLEGRINI et al., 2006; MARIUTTI et al., 2008; SHIBAMOTO, 2009).

Figura 6 - Estabilização do radical ABTS.+ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio

Fonte: Adaptada de Sousa et al. (2007)

Esta metodologia é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (TACHAKITTIRUNGROD; OKONOGI; CHOWWANAPHOONPOHN, 2007; SUN; POWERS; TAND, 2007; PRADO, 2009; MELO et al., 2008; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; RUFINO et al., 2007).

2.7.2 Métodos de determinação da inibição da oxidação lipídica

Existem diversos métodos analíticos capazes de medir a deterioração oxidativa, porém não é fácil selecionar um método que seja mais adequado para uma determinada aplicação. Estes podem ser classificados em quatro grupos: os que medem a absorção de oxigênio, a perda de substrato inicial, a formação de hidroperóxidos (produtos primários da oxidação) ou a formação de produtos secundários da oxidação (originados a partir da decomposição de hidroperóxidos) (DOBARGANES; VELASCO, 2002).

Os métodos de inibição da oxidação lipídica baseiam-se na habilidade dos antioxidantes em controlar a extensão da reação de oxidação (ANTOLOVICH et al., 2002), que pode ser determinada pela capacidade que os antioxidantes tem de retardar a formação dos produtos resultantes desta reação, por exemplos peróxidos, dienos conjugados, entre outros (ANTOLOVICH et al., 2002).

Há muitos métodos para a avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras, entretanto, nenhum se correlaciona com resultados reais com as modificações organolépticas que ocorrem como consequência das reações de oxidação (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1998). Cada método fornece informações sobre um estado em particular do processo oxidativo, que varia em função das condições aplicadas e dos substratos lipídicos avaliados (BERSET; CUVELIER, 1996; FRANKEL et al., 1994).

A maior dificuldade em avaliar o grau de oxidação está na escolha do estágio mais adequado para a determinação. Geralmente procura-se avaliar, em condições padronizadas e selecionando um determinado parâmetro indicador, o período de indução (PI) da reação. Este período é determinado como o tempo necessário para atingir um ponto final de oxidação correspondente a um nível detectável de ranço ou uma mudança súbita na velocidade de oxidação, conforme mostra a Figura 7. Durante o período de indução, os radicais alquil são formados e reagem com as moléculas de oxigênio, formando os hidroperóxidos e os radicais de peróxido na fase de propagação.

Figura 7 - Período de indução da reação de oxidação
 Fonte: Adaptado de Silva et al. (1998)

A avaliação do estado de oxidação de óleos e gorduras comestíveis pode ser feito de duas maneiras, em condições normais de armazenamento (tempo real) e em condições aceleradas. Os testes acelerados, com condições padronizadas, permitem estimar mais rapidamente a estabilidade oxidativa de uma matéria graxa ou a eficácia teórica de um antioxidante, isolado ou em associação (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1998). A maior vantagem deste método é que, como os fenômenos naturais de oxidação são processos lentos e se desenvolvem ao longo do tempo, os testes de estabilidade em tempo real tornam-se inviáveis para a indústria por demandarem um tempo maior e um custo elevado (FRANKEL, 1993). Deste modo, os testes de estabilidade acelerados assumem particular importância na rotina analítica (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1998).

A maioria dos procedimentos para o teste de oxidação acelerada envolve um agente iniciador para manipular uma ou mais variáveis no sistema de ensaio. Estes iniciadores podem ser o aumento da temperatura e da pressão parcial de oxigênio, a adição de metais catalisadores (CHACON et al., 2000), a exposição à luz para promover a foto oxidação (CHACON et al., 2000), uma variável de agitação para aumentar o contato do reagente com o substrato (MCDONALD et al., 2001) e fontes de radicais livres.

Os ensaios de oxidação em testes acelerados devem ser calibrados para cada tipo de formulação e as condições utilizadas devem ser mantidas tão próximo quanto possível àquelas em que o alimento é armazenado. Segundo Shimano (2012), os testes de oxidação acelerada requerem equipamentos simples e são muito utilizadas para análise da oxidação em alimentos. Dentre os métodos mais utilizados estão o Rancimat, teste de estufa (*Schaal Oven Test*) e o teste de Swift ou Método do oxigênio ativo (ANTOLOVICH et al., 2002; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Após a oxidação do substrato em condições controladas, a taxa de oxidação pode ser medida por meios químicos, instrumentais ou sensoriais (BECKER; NISSEN; SKIBSTED,

2004). Para se conseguir resultados fiéis em relação à vida útil do produto, é necessário que a análise da oxidação seja feita ao longo do tempo e não somente em um determinado período (FRANKEL, 1993; BERSET; CUVELIER, 1996; PRESA-OWENS; LÓPEZ-SABATER; RIVERO-URGELL, 1995).

2.7.2.1 Estabilidade oxidativa em Rancimat

O equipamento Rancimat determina a resistência de um óleo à reação de oxidação, por meio da determinação dos ácidos de baixo peso molecular gerados pela oxidação forçada da amostra a uma temperatura de aproximadamente 110°C. A avaliação é automatizada e realizada graficamente.

A amostra lipídica é exposta a um fluxo de ar seco contínuo e a uma temperatura de 100 a 140°C. Os compostos voláteis (ex. ácido fórmico) que são gerados a partir da oxidação são coletados em um frasco contendo água deionizada. Estes compostos, em sua maioria, são ácidos de baixo peso molecular que alteram a condutividade da água, a qual é medida continuamente. A determinação do período de indução é feita imediatamente quando há um aumento exponencial desta condutividade. A proteção contra a reação de oxidação está intimamente relacionada ao período de indução; quanto maior for o período da amostra adicionada de compostos antioxidantes, maior será a proteção contra a oxidação. A Figura 8 representa o esquema de funcionamento do equipamento Rancimat.

Figura 8 - Esquema de funcionamento do Rancimat
Fonte: Adaptado de Kivevele et al. (2011)

Este método se torna vantajoso por ser menos trabalhoso, não requerer nenhum controle durante o decurso de uma determinação e não se fazer necessária a realização de

análises em intervalos regulares. A princípio, os resultados desta análise eram utilizados apenas como parâmetro comparativo, mas são atualmente considerados de grande valia para a previsão do tempo de vida útil do produto (FRANKEL et al., 1994).

A maior limitação é que a taxa de oxidação se torna dependente da concentração de oxigênio, porque a solubilidade do mesmo diminui em temperaturas elevadas; o período de indução ocorre a um nível de oxidação muito alto, além do ponto em que são detectados o odor e sabor de ranço. Adicionalmente, a análise sob estas condições podem resultar em dados de valor questionável; antioxidantes voláteis como butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT) estão sujeitos a perdas significativas, são necessárias temperaturas muito elevadas para se obter ácidos orgânicos detectáveis podendo resultar em um nível de ranço acima do normal e por final; antioxidantes fenólicos em extratos naturais podem sofrer decomposição devido as altas temperaturas (FRANKEL, 1993).

2.7.2.2 Teste de estufa ou *Schaal Oven Test*

É o método de oxidação mais conhecido e utilizado, onde as amostras de óleo são armazenadas em estufa a uma temperatura constante (60 a 70°C) e, em intervalos regulares, as amostras são avaliadas quanto as índice de peróxido, ácidos graxos livres e absorvibilidade no UV. É considerado o mais adequado quando relacionado à vida útil de óleos e gorduras (KRISTOTT, 2000). Em relação ao Rancimat, este método apresenta resultados mais confiáveis, pois a 60°C uma série de reações secundárias ocorrem e a 100°C estas reações podem oferecer resultados enganosos. Os resultados obtidos com este método apresentam boa correlação com análises efetuadas sob condições normais de armazenamento (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1998). Wanasundara e Shahidi (1994) consideram que a cada dia de armazenagem a 65°C equivale a um mês de armazenamento à temperatura ambiente.

Infelizmente um único método utilizado de forma isolada não é suficientemente eficaz para predizer o comportamento de uma amostra, para isto se faz necessário, no mínimo dois métodos para caracterizar o grau de oxidação (KRISTOTT, 2000). Para a escolha destes métodos auxiliares, é necessário o conhecimento da reação da oxidação lipídica, as fases de iniciação, propagação e terminação além dos produtos formados (KAMAL-ELDIN; PORKORNY, 2005).

2.7.2.2.1 Índice de Peróxido (IP)

De acordo com Kristott (2000), o índice de peróxido representa o conteúdo total de hidroperóxido e peróxido de hidrogênio que são formados na fase de iniciação da oxidação lipídica. Existem inúmeras metodologias utilizadas para a determinação do IP, em todos os casos a precisão dos resultados está intimamente dependente das condições experimentais, pois este é um método altamente empírico.

Os métodos mais comuns baseiam-se na titulação iodométrica, originalmente desenvolvida por Lea (1931) e Wheeler (1932), onde os hidroperóxidos e peróxidos oxidam o iodeto a iodo e este é titulado com uma solução padrão de tiosulfato, utilizando como indicador de ponto de viragem o amido (ANTOLOVICH et al., 2001). A quantidade de iodo presente é proporcional à quantidade de hidroperóxido, portanto a determinação é feita por meio da medida do volume de tiosulfato utilizado para titular o iodo presente na amostra (AOCS, 2009).

Segundo Antolovich e colaboradores (2001), a Figura 9 representa a reação e a estequiometria da reação:

Figura 9 - Reação da determinação do índice de peróxido por titulação iodométrica
Fonte: Antolovich et al. (2001)

De acordo com a reação, o resultado obtido é calculado como miliequivalentes de oxigênio ativo por quilograma de amostra (mEqO₂/kg). As maiores limitações que envolvem este método estão relacionadas com sua sensibilidade e seletividade, como por exemplo, a possibilidade do iodo presente se vincular com ligações insaturadas dos ácidos graxos, gerando resultados inferiores, a oxidação do iodeto pelo oxigênio dissolvido no meio, a dificuldade em determinar o ponto final da titulação (SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008) entre outros motivos que levam pesquisadores a desenvolverem outros métodos mais eficientes, apesar do procedimento utilizando titulação ser considerado padrão (MARINOVA; YANISHLIEVA, 1996; ANTOLOVICH et al., 2001; SHAHIDI, 1997).

Esta análise pode ser considerada uma metodologia para avaliar a atividade antioxidante, uma vez que os hidroperóxidos são os produtos primários da reação de oxidação lipídica e sua medição pode servir como base para a determinação da oxidação da amostra em relação a um controle (JASWIR; MAN; KITTS, 2000).

Um detalhe importante desta reação é que a determinação do IP deve ser efetuada nos estágios iniciais da oxidação lipídica, porque o nível de peróxidos e hidroperóxidos pode variar conforme o estágio da reação, por isto um baixo teor de peróxidos não pode ser associado à boa estabilidade oxidativa da amostra, podendo até ser considerado sinônimo de alteração (BERSET; CUVELIER, 1996).

2.7.2.2.2 Ácidos Graxos Livres (AGL)

Segundo Osawa e Gonçalves (2006), a acidez é considerada uma variável que está intimamente relacionada com a qualidade da matéria-prima, com o processamento e principalmente, com as condições de conservação do óleo ou gordura (HUI, 1996).

A porção lipídica dos alimentos sofre transformações químicas durante o período do seu armazenamento e no processamento; estas transformações podem ser de origem oxidativa, hidrolítica ou por reversão (BOBBIO; BOBBIO, 2001). A rancidez hidrolítica é resultado da hidrólise da ligação éster por enzimas (lipases) ou pela umidade com a produção de ácidos graxos livres (AGL). As enzimas que provocam a rancidez geralmente estão presentes nas sementes oleaginosas ou podem ser de fontes microbiológicas, já a rancidez hidrolítica não enzimática ocorre em altas temperaturas, gerando ácidos graxos livres (HUI, 1996).

A presença de ácidos graxos livres em óleos e gorduras indica a ocorrência da reação de hidrólise na ligação de éster entre o glicerol e o ácido graxo dos triglicerídeos (REGITANO-D'ARCE, 2006). O aumento da acidez indica que há perda de triacilgliceróis neutros, portanto a verificação deste parâmetro está diretamente relacionada ao estado de conservação tanto dos grãos quanto à deterioração de óleos.

De acordo com a American Oils Chemists' Society (AOCS, 2009), a acidez em óleos de origem vegetal pode ser determinada por meio de uma titulação ácido-base que utiliza o hidróxido de sódio como titulante e a fenolftaleína como agente indicador. O resultado da análise é expresso em porcentagem (em peso) de ácidos graxos livres, em relação a um ácido graxo específico, no geral se usa o ácido oleico (PM = 282 g), porém pode considerar qualquer outro ácido graxo predominante na amostra analisada (OSAWA; GONÇALVES, 2006).

É um método de fácil operação, porém é lento, trabalhoso, necessita de precisão para obtenção de resultados confiáveis, necessita de grande quantidade de amostra e reagentes e há certa dificuldade no momento de visualização do ponto de viragem do indicador fenolftaleína (OSAWA; GONÇALVES, 2006).

2.7.2.2.3 Espectrofotometria na região do ultravioleta

No ano de 1933 foi descoberto que a formação de dienos conjugados em óleos e gorduras forma um pico de absorção que pode ser lido na região do ultravioleta (UV), entre 230 e 235nm, devido ao rearranjo das duplas ligações (SHAHIDI; ZHONG, 2005). Na década de 60, a identificação de dienos e trienos conjugados surge como uma ferramenta útil na avaliação da oxidação lipídica (ANTOLOVICH et al., 2002). No processo de formação de hidroperóxido dos ácidos graxos, os dienos conjugados podem ser formados e apresentam absorção a 234nm (SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008). Os valores obtidos são expressos como coeficiente de extinção ou absorbância específica $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ (absortividade de uma solução de matéria graxa a 1% no solvente prescrito, em célula com passagem ótica de 1cm), que pode também ser indicado como K_{232} (REGITANO-D'ARCE, 2006).

Os dienos conjugados geralmente não ocorrem em ácidos graxos insaturados, entretanto, são formados durante a reação de oxidação a partir de uma molécula com duas duplas ligações separadas por um grupo metilênico, o que ocorre em ácidos graxos poli-insaturados (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

O aumento na absorção da região do UV reflete a formação de produtos da oxidação em óleos. Em estudos foi comprovada que pode ser feita a correlação entre dienos conjugados e os valores de índice de peróxido (SHAHIDI; WANASUNDARA; BRUNET, 1994; WANASUNDARA; SHAHIDI; JABLONSKI, 1995). É um método rápido, simples, requer pequenas quantidades de reagentes químicos e amostras (SHAHIDI; ZHONG, 2005). É amplamente utilizado em experiências dinâmicas, ao invés do índice de peróxido (DOBARGANES; VELASCO, 2002). Entretanto, o resultado obtido pode ser afetado pela presença de compostos que absorvem a luz na mesma região, como por exemplo, compostos carotenoides (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992).

2.8 Considerações finais

A oxidação lipídica é considerada uma das principais causas da perda de qualidade nos alimentos. Com o intuito de retardá-la se faz necessário o uso de substâncias com poder antioxidante. Com a crescente preocupação com a saúde, há uma forte tendência pelo uso de compostos oriundos de fontes naturais em substituição dos antioxidantes sintéticos, amplamente utilizados.

Nessa busca, comprovou-se que as frutas possuem compostos que atuam como antioxidantes, oferecendo ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que ocorrem nos alimentos. É preciso deixar claro que apesar de haver inúmeros métodos de extração e

avaliação da atividade antioxidante destes compostos, todos apresentam vantagens e desvantagens, por isso é imprescindível analisar criteriosamente e considerar todos os fatores importantes no momento da seleção da técnica analítica para que os resultados obtidos sejam confiáveis.

Apesar das inúmeras pesquisas nessa área, ainda são necessários estudos complementares que esclareçam qual a melhor metodologia para a obtenção destes compostos e como podemos adicioná-los nos alimentos sem modificar drasticamente as características do produto, para que assim os anseios da população sejam atendidos.

Referências

- ABDILLE, M.D.H.; SINGH, R.P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JENA, B.S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, Barking, v. 90, p. 891-896, 2005.
- ALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolics compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, p. 191-203, 2006.
- ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. **Rancidity in foods**. London: Blackie Academic & Professional, 1994. 273 p.
- AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**, New York, v. 22, n. 9, p. 1041-1047, 2002.
- AMARAL, L.; JAIGOBIND, J.S.; JAIGOBIND, A.G.A. **Dossiê técnico: óleo de soja**. Curitiba: Instituto de Tecnologia do Paraná, 2006. 36 p.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; MOGHADDAM, P.R.; BARL, B.; WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, Barking, v. 84, p. 551-562, 2004.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. Antioxidant evaluation of coriander extract and ascorbyl palmitate in sunflower oil under thermoxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Berlin, v. 85, p. 1045-1049, 2008.
- 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.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 6th ed. Champaign, 2009. 1278 p.

ARANCIBIA-AVILA, P.; TOLEDO, F.; WERNER, E.; SUHAJ, M.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; MARTINEZ-AYALA, A.; PASKO, P.; GORINSTEIN, S. Partial characterization of a new kind of chilean murtilla-like berries. **Food Research International**, Amsterdam, v. 44, p. 2054-2062, 2011.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food and Technology**, London, v. 11, n. 11, p. 419-421, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE ÓLEOS VEGETAIS. **O Brasil no mercado mundial de soja**. São Paulo, 2012. Disponível em: <<http://www.abiove.com.br>>. Acesso em: 01 abr. 2012.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, Barking, v. 89, n. 1, p. 27-36, 2005.

AVELLO, M.; PASTENE, E. Actividad antioxidante de infusos de *Ugni molinae* Turcz ("Murtilla"). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Santiago, v. 4, p. 33-39, 2005.

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

BANDONIENE, D.; MURKOVIC, M.; PFANNHAUSER, W.; VENSKUTONIS, P.R.; GRUZDIENE, D. Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods. **European Food Research and Technology**, Heidelberg, v. 214, p. 143-147, 2002.

BARREIROS, A.L.; 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.

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

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F.R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J.A. Uses and properties of Citrus flavonoids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Barking, v. 45, p. 4505-4515, 1997.

BERGER, K.G.; HAMILTON, R.J. Lipids and oxygen: is rancidity avoidable in practice? In: HAMILTON, R.J. (Ed.). **Developments in oils and fats**. London: Chapman & Hall, 1995. cap. 7, p. 192-203.

BERSET, C.; CUVELIER, M.E. Méthodes d'valuation du degré d'oxydation des lipids et de mesure du pouvoir antioxidant. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 16, n. 3, p. 219-245, 1996.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v. 181, p. 119-1200, 1958.

BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001. 478 p.

BOROWSKA, E.J.; MAZUR, B. Changes in selected components and antioxidant properties of cowberry during processing to puree. **Bromatologia i Chemia Toksykologiczna**. Poznan, v. 41, p. 303-307, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**. Zurich, 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 óleo e gorduras – subcategoria creme vegetal e margarinas”. **Diário Oficial da União**, Brasília, 16 fev. 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 10 abr. 2013.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 795, de 15 de dezembro de 1993. Aprova as “Normas de identidade, qualidade, embalagem, marcação e apresentação do óleo e do farelo de soja”. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 dez. 1993. Disponível em: <<https://www.agricultura.gov.br>> Acesso em: 12 abr. 2013.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, Washington, v. 56, p. 317–333, 1998.

BUCK, D.F. Antioxidants. In: SMITH, J. (Ed.). **Food additive user's handbook**. London: Blackie Academic & Professional, 1991. chap. 1, p. 2-5.

BUETTNER, O.R. The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, α -tocopherol, and ascorbate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 300, n. 2, p. 535-543, 1993.

BURNS, J.; GARDNER, P.T.; MATTHEWS, D.; DUTHIE, G.G.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 12, p. 5797-5808, 2001.

CACACE, J.E.; MAZZA, G. Extraction of anthocyanins and other phenolics from black currants with sulfured water. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 5939–5946, 2002.

_____. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. **Journal of Food Science**. Chicago, v. 68, n. 1, p. 240-248, 2000.

CAMPBELL, M.K. **Bioquímica**. Trad. de H.B. Ferreira et al. 3. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2000. 752 p.

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

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M.L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M.E.; RODRÍGUEZ, J.A.; GALÁN-VIDAL, C.A. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, Barking, v. 113, n. 4, p. 859-871, 2009.

CERQUEIRA, F.; MEDEIROS, M.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CERVATO, G.; CARABELLI, M.; GERVASIO, S.; CITTERA, A.; CAZZOLA, R.; CESTARO, B. Antioxidant properties of orégano (*Origanum vulgare*) leaf extracts. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 24, n. 6, p. 453-465, 2000.

CHACON, J.N.; GAGGINI, P.; SINCLAIR, R.S.; SMITH, F.J. Photo- and thermal-oxidation studies on methyl and phenyl linoleate: anti-oxidant behaviour and rates of reaction. **Chemistry and Physics of Lipids**, Limerick, v. 107, p. 107-120, 2000.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Screening of antioxidant activity and antioxidant compounds of some edible plants of Thailand. **Food Chemistry**, Barking, v. 92, n. 3, p. 491-497, 2005.

CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 20, p. 7429-7436, 2006.

CLARK, J. P. Tocopherols and Sterols from soybean. **Lipid Technology**, Weinheim, v. 8, p. 111-114, 1996.

CONEGLIAN, S. M.; LIMA, B. S.; SILVA, L. G.; LAZZARI, C. M.; CASTAÑEDA-SERRANO, R. D.; TONELLO, C. L. Utilização de antioxidantes nas rações. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, Londrina, v. 5, n. 5, p. 1-33, 2011.

COOK, N.C.; SAMMAN, S. Flavonoids: chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. **The Journal of Nutrition and Biochemistry**, Stoneham, v. 7, p. 66-76, 1996.

COPPEN, P.P. The use of antioxidants. In: ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. **Rancidity in foods**. London: Blackie Academic Professional, 1994. chap. 5, p. 84-103.

DECKER, E.A. Antioxidant mechanisms. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 517.

DEGÁSPARI, C.H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Revista Visão Acadêmica**, Goiânia, v. 5, p. 33-40, 2004.

DELPORTE, C.; BACKHOUSE, N.; INOSTROZA, V.; AGUIRRE, M.C.; PEREDO, N.; SILVA, X.; NEGRETE, R.; MIRANDA, H.F. Analgesic activity of *Ugni molinae* (murtilla) in mice models of acute pain. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 112, p. 162–165, 2007.

DEMO, A.; PETRAKIS, C.; KEFALASA, P.; BOSKOU, D. Nutrient antioxidants nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. **Food Research International**. Amsterdam, v. 31, n. 5, p. 351-354, 1998.

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

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.

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, Abr./Jun, 2006.

EL-GHORAB, A.H.; NAUMAN, M.; ANJUM, F.M.; HUSSAIN, S.; NADEEM, M. A comparative study on chemical composition and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) and cumin (*Cuminum cyminum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 14, p.8231-8237, 2010.

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.

ESPIN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHES, H.J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 5, p. 1588-1592, 2000.

EWALD, C.; FJELKNER-MODIG, S.; JOHANSSON, K.; SJOHOLM, I.; AKESSON, B. Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. **Food Chemistry**, Barking, v. 64, p. 231–235, 1999.

FEHR, W.R.; CAVINES, C.E.; BURMOOD, D.T.; PENNINGTON, J.S. Stage of development descriptions for soybeans, *Glycine max* (L.) Merrill. **Crop Science**, Madison, v. 11, n. 6, p. 929-931, 1971.

FERGUSON, L.R.; HARRIS, P.J. Protection against cancer by wheat bran: role of dietary fibre and phytochemicals. **European Journal of Cancer Prevention**, Oxford, v. 8, n. 1, p. 17-25, 1999.

FRANCO, C.O.; FABRI, E.G.; BARREIRO NETO, M.; MANFIOLLI, M.H.; HARDER, M.N.C.; RUCKER, N.C.A. **Urucum**: sistema de produção para o Brasil. João Pessoa: EMEPA-PB, 2008. 112 p.

FRANKEL, E.N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 4, p. 220-225, 1993.

FRANKEL, E.N.; HUANG, S.-W.; KANNER, J.; GERMAN, J.B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oil vs emulsions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 42, p. 1054-1059, 1994.

FRANKEL, E.; HUANG, S.-W.; PRIOR, E.; AESCHBACH, R. Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 72, p. 201-208, 1996.

FUKUMOTO, S.; XUAN, X.; IGARASHI, I.; ZHANG, S.; MUGISHA, J.; OGATA, T.; NAGASAWA, H.; FUJISAKI, K.; SUZUKI, N.; MIKAMI, T. Morphological changes of *Babesia gibsoni* grown in canine red blood cell substituted severe combined immune deficiency mice. **Iranian Journal of Parasitology**, Tehran, v. 86, p. 956-958, 2000.

GIADA, M.L.R.; MANCINI- FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos de alimentos. **Nutrire**, São Paulo, v. 28, p. 91-107, 2004.

GIESE, J. Antioxidants: tools for preventing lipid oxidation. **Food Technology**, Champaign, v. 50, n. 1, p. 73-81, 1996.

GÓMEZ, M.E.D.B. **Modulação da composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta. I. Estabilidade oxidativa**. 2003. 149 p. Teses (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

GRAEF, G.L.; MILLER, L.A.; FEHR, W.R.; HAMMOND, E.G.J. Fatty acid development in a soybean mutant with high stearic acid. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Berlin, v. 62, p. 773-775, 1985.

GÜLCIN, I.; OKTAY, M.; KIRECCI, E.; KÜFREVIÖGLU, O.I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 83, n. 3, p. 371-382, 2003.

GUTTERIDGE, J.M.C. Biological origin of free radicals and mechanisms of antioxidant protection. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 9, p. 133-140, 1994.

GYANFI, M.A.; YONAMINE, M.; ANIYA, Y. Free radical scavenging action of medicinal herbs from Ghana Thonningla sanguine on experimentally induced liver injuries. **General Pharmacology**, Philadelphia v. 32, p. 661-667, 1999.

HALL, C.A.; CUPPET, S.L. Structure-activities of natural antioxidants. In: ARUOMA, O.I.; CUPPET, S.L. (Ed.). **Antioxidant methodology in vivo and in vitro concepts**. Champaign: III, AOCS Press, 1997. p. 2-29.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M.A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O.I. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 35, n. 1/2, p. 7-20, 1995.

HAMMOND, E.G.; DUVICK, D.N.; FEHR, W.R.; HILDEBRAND, D.F.; LACEFIELD, E.C.; PFEIFFER, T.W. Rapid screening techniques for lipoxigenases in soybeans seed. **Crop Science**, Madison, v. 32, p. 820-821, 1992.

HEINONEN, M. Antioxidant activity and antimicrobial effect of berry phenolics: a finnish perspective. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 51, p. 684–691, 2007.

HEINONEN, M.; LEHTONEN, P.J.; HOPIA, A. Antioxidative activity of berry and fruit wines and liquor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, p. 25-31, 1998.

HERNANDÉZ-HERNADÉZ, 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.

HERTOG, M.G.L.; HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 40, p. 2379-2383, 1992.

HERTOG, M.G.L.; SWEETNAM, P.M.; FEHILY, A.M.; ELWOOD, P.C.; KROMHOUT, D. Antioxidant favonols and ischemic heart disease in a welsh population of men: the Caerphilly study. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 65, p. 1489-1494, 1997.

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.

HOLLMAN, P.C.H.; HERTOOG, M.G.L.; KATAN, M.B. Analysis and health effects of flavonoids. **Food Chemistry**, Barking, v. 57, n. 1, p. 43-46, 1996.

HOPIA, A.; HEINOMEM, M. Antioxidant activity of flavonol aglycones and their glycosides in methyl linoleate. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Berlin, v. 76, p. 139-144, 1999.

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

HUDSON, B.J.F. (Ed.). **Food antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990. 430 p.

HUI, Y. H. **Edible oil and fat products**: processing technology. 5th ed. New York: John Wiley, 1996. 125 p.

IBAÑEZ, E.; CIFUENTES, A.; CREGO, A.L.; SEÑORÁNS, F.J.; CAVERO, S.; REGLERO, G. Combined use of supercritical fluid extraction, micellar electrokinetic chromatography, and reverse phase high performance liquid chromatography for the analysis of antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 4060–4065, 2000.

ISHIKAWA, G.; HASEGAWA, H.; TAKAGI, Y.; TANISAKA, T. The accumulation pattern in developing seeds and its relation to fatty acid variation in soybean. **Plant Breeding**, London, v. 120, p. 417–423, 2001.

JASWIR, I.; MAN, Y.B.C.; KITTS, D. D. Use of natural antioxidants in refined palm olein during repeated deep-fat frying. **Food Research International**, Amsterdam, v. 33, n. 6, p. 501-508, 2000.

JORGE, N.; GONCALVES, L.A.G. Comportamento do óleo de girassol com alto teor de ácido oléico em termoxidação e fritura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, p. 335-342, 1998.

KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 4076–4082, 2001.

KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; JUSSI-PEKKA RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 10, p. 3954–3962, 1999.

KAMAL-ELDIN, A.; POKORNY, J. Lipid oxidation products and methods used for their analysis. In: Kamal-Eldin, A.; Pokorny, J. (Ed.). **Analysis of lipid oxidation**. Champaign: AOCS Press, 2005. p. 1-7.

KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Antioxidants in fruits and vegetables - the millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 36, n. 7, p. 703-725, 2001.

KOSAR, M.; DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected *Lamiaceae species*. **Food Chemistry**, Barking, v. 91, p. 525–533, 2005.

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

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, Barking, v. 85, n. 4, p. 633-640, 2004.

KUSKOSKI, E.A.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 4, p. 1285-1286, 2006.

LAGOURI, V.; NISTEROPOULOU, E. Antioxidant properties of *O. Onites*, *T. Vulgaris* and *O. Basilicum* sapecies grown in Greece and their total phenol and rosmarinic acid content. **Journal of Food Lipids**, London, v. 16, n. 4, p. 484-498, 2009.

LAMPE, J.W. Health effects of vegetables and fruit: Assessing mechanisms of action in human experimental studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, Philadelphia, v. 70, p. 475S–490S, 1999.

LAPORNIK, B.; PROSEK, M.; WONDRA, A.G. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. **Journal of Food Engineering**. London, v. 71, n. 2, p. 214–222, 2005.

LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, Oxford, v. 27, p. 969-978, 1988.

LEA, C.H. Effect of light on the oxidation of fats. **Proceedings of the Royal Society of London**, Series B, London, v. 108, p. 175-189, 1931.

LEAL, P.F.; BRAGA, M.E.; SATO, D.N.; CARVALHO, J.E.; MARQUES, M.O.; MEIRELES, M.A. Functional properties of spices extracts obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 9, p. 2520-2525, 2003.

MACHEIX, J- J.; FLEURIET, A.; BILLOT, J. **Fruit phenolics**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 378 p.

MARINOVA, E.M.; YANISHLIEVA, N.V. Antioxidative activity of phenolic acids on triacylglycerols and fatty acid methyl esters from olive oil. **Food Chemistry**, Barking, v. 56, p.139-145, 1996.

MARIUTTI, L.R.B.; BARRETO, G.P.M.; BRAGAGNOLO, N.; MERCADANTE, A.Z. Free radical scavenging activity of ethanolic extracts from herbs and spices commercialized in Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 51, n. 6, p. 1225-1232, 2008.

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.

MATEUS, N.A. Química dos sabores do vinho – os polifenóis. **Revista Real Academia Gallega de Ciências**, Santiago de Compostela, v. 28, p. 5-22, 2009.

MATTEA, F.; CARDARELLI, D.A.; DAGHERO, J.D.; MATTEA, M.A. Natural antioxidants obtained with supercritical CO₂. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS, 1., 2004, Florianópolis. **Caderno de resumos...** Florianopolis: EQA/CTC; UFSC, 2004. p. 70.

- MCDONALD, M.S.; HUGHES, M.; BURNS, J.; LEAN, M.E.J.; MATTHEWS, D.; CROZIER, A. Survey of the free and conjugated myricetin and quercetin content of red wines of different geographical origins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, p. 368-375, 1998.
- MCDONALD, S.; PRENZLER, P.D.; AUTOLOVICH, M.; ROBARDS K. Phenolic content and antioxidant activity of olive extracts. **Food Chemistry**, Barking, v. 73, p. 73-84, 2001.
- MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 193-201, abr./jun. 2008.
- MELO, P. **Composição química e atividade biológica de resíduos agroindustriais**. 2010. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.
- MOLYNEUX, 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.
- MONTENEGRO, G. **Chile nuestra flora útil: guía de plantas de uso apícola, en medicina folclórica artesanal y ornamental**. Santiago: Universidad Católica de Chile, 2000. 267 p.
- 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.
- 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.
- MUÑOZ, M.; MUÑOZ, C.; GODOY, I. Especie nativa com potencial como frutales arbustivos. **Investigación y Progreso Agropecuario Carillanca**, Temuco, v. 5, n. 3, p. 32-35, 1986.
- MURAMATSU, H.; KOGAWA, K.; TANAKA, M.; OKUMURA, K.; KOIKE, K.; KUGA, T.; YOSHIRO, N. Superoxide dismutase in SAS human tongue carcinoma cell line is a factor defining invasiveness and cell motility. **Cancer Research**, Iowa, v. 55, p. 6210-6214, 1995.
- MURCIA, M.; EGEA, I.; ROMOJARO, F.; PARRAS, P.; JIMENEZ, A.; MARTINEZ-TOME, M. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 1872–1881, 2004.
- NAGEM, T. J.; ALBUQUERQUE, T. T. O.; MIRANDA, L. C. G. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 35, n. 1, p. 129-138, 1992.
- NAKATANI, N. Antioxidant from spices and herbs. In: SHAIDI, F. (Ed.). **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications**. Newfoundland: AOCS Press, 1996. chap. 4, p. 64-75.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. **Food chemistry**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1985. 1014 p.

NOVOA, H. R. **Antecedentes sobre establecimientos y producción de frutos de la especie *Ugni molinae* (Turcz.)** 1983. 90 p. Tesis (Ingeniero Florestal) - Universidad Austral de Chile, Valdivia, 1983.

OLIVEIRA, A.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.

OSAWA, C.C.; GONÇALVES, L.A.G. Evaluación de ácidos grasos libres presentes en aceites vegetales através de kits rápidos y técnica potenciométrica de detección. **Aceites y Grasas**, Sevilla, v. 1, n. 62, p. 158 163, 2006.

PASTENES, C.; SANTA-MARIA, E.; INFANTE, R.; FRANCK, N. Domestication of the Chilean guava (*Ugni molinae* Turcz.), a forest understored shrub, must consider Light intensity. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 98, p. 71-84, 2003.

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. 8142-8169, 2009.

PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; SALVATORE, S.; DEL IO, D.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F. Total antioxidant capacity of spices, dried fruits, nuts, pulses, cereals and sweets consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. **Molecular Nutrition and Food Research**, Weinheim, v. 50, n. 11, p. 1030-1038, 2006.

PEÑA, K. **Estudio químico y de acción antioxidante de frutos de murta (*Ugni molinae* Turcz) y propuesta de productos**. 2005. 112 p. Trabajo (Título de Ingeniero em Alimentos) - Universidad de La Frontera, Temuco, 2005.

PEÑA-NEIRA, A.; CÁCERES, A.; PASTENES, C. Low molecular weight phenolic and anthocyanin composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo Valley (Chile): effect of clusters thinning and vineyard yield. **Food Science and Technology**, London, v. 13, p. 153-158, 2007.

PEREIRA, R. B. **Avaliação da atividade antioxidante de sementes de frutas cítricas**. 1996. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

PINELI, L. L. O.; MORETTI, C. L.; SANTOS, M. S.; CAMPOS, A. B.; BRASILEIRO, A.V.; C'ORDOVA, A. C.; CHIARELLO, M. D. Antioxidants and other chemical and physical characteristics of two strawberry cultivars at different ripeness stages. **Journal of Food Composition and Analysis**, London, v. 24, n. 1, p. 11-16, 2011.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; JEREZ, M.; SINEIRO, J.; NUNEZ, M.J. Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 2111-2117, 2005.

POKORNY, J. Natural antioxidants for food use. **Trends in Food & Technology**, London, v. 2, p. 223-227, 1991.

POMPEU, D.R.; SILVA, E.M.; ROGEZ, H. Optimisation of the solvent extraction of phenolic antioxidants from fruits of *Euterpe oleracea* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, Barking, v. 100, p. 6076-6082, 2009.

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

PRESA-OWENS, S.; LÓPEZ-SABATER, M C.; RIVERO-URGELL, M. Shelf-life prediction of an Infant formula using an accelerated stability test (Rancimat). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 11, p. 2879-2882, 1995.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K.M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 4, p. 494-507, 2001.

RAMIREZ, M.R. **Análise química e avaliação das atividades biológicas e comportamentais de extratos de frutas ricas em compostos fenólicos (Mirtilo e Amora-Preta)**. 2008. 243 p. Tese (Doutor em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

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. B. A. 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.

REHMAN, Z.; HABIB, F.; SHAH, W. H. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. **Food Chemistry**, Barking, v. 85, n. 2, p. 215-220, 2004.

REISCHE, D.W. Antioxidants. In: AKOH, C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1998. chap. 5, p. 433-444.

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

RIBEIRO, M.A.; BERNARDO-GIL, M.G.; ESQUÍVEL, M.M. *Melissa officinalis*, L.: study of antioxidant activity in supercritical residues. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 21, n. 1, p. 51–60, 2001.

RIBEIRO, S.M.; BARBOSA, L.C.; QUEIROZ, J.H.; KNODLER, M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**, Barking, v. 110, n. 3, p. 620-626, 2008.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 375-383, 1995.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acid. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v.20, n.7, p.933-956, 1996.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, Barking, v. 66, n. 4, p. 401-436, 1999.

RUBILAR, M.; PINELO, M.; IHL, M.; SCHEUERMANN, E.; SINEIRO, J.; NUÑO EZ, M.J. Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 59–64, 2006.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. **Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 4 p. (Comunicado Técnico,128).

RUIZ, A.; HERMOSIN-GUTIERREZ, I.; MARDONES, C.; VERGARA, C.; HERLITZ, E.; VEJA, M.; DORAU, C.; WINTERHALTER, P.; VON BAER, D. Polyphenols and antioxidants activity of calafate (*Berberis microphylla*) fruits and other native berries from Southern Chile. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 58, p. 6081-6089, 2010.

SAUTÉ-GARCIA, M.T.; HEINONEN, M.; FRANKEL E.N. Anthocyanins as antioxidants on human low density lipoprotein and lecithin-liposome systems. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 9, p. 3362-3367, 1997.

SCHERER, R.; GODOY, H.T. Antioxidant activity index (AAi) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, Barking, v. 112, p. 654-658, 2009.

SCHEUERMANN, E.; SEGUEL, I.; MONTENEGRO, A.; BUSTOS, R.O.; HORMAZABAL, E.; QUIROZ, A. Evolution of aroma compounds of murtilla fruits (*Ugni molinae* Turcz) during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, p. 485–492, 2008.

SCHRECKINGER, M.L.; LOTTON, J.; LILA, M.A.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 13, p. 233–246, 2010.

SCHWARZ, K.; BERTELSEN, G.; NISSEN, L.R.; GARDNER, P.T.; HEINONEN, M.I.; HOPIA, A.; HUYNH-BA, T.; LAMBELET, P.; MACPHAIL, D.; SKIBSTED, L.H.; TIJBURG, L. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 212, n. 3, p. 319-328, 2001.

SEERAM, N.P. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities and the impact of their intake on human health, performance, and disease. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 56, p. 627-629, 2008.

SEGUEL, I.; AVENDAÑO, L. Aprovechando lo nuestro, murta: fruto nativo de alta perspectiva comercial. **Revista Sofo Campo**. Chile, v. 4, n. 32, 2001.

SEGUEL, I.; TORRALBO, L. Murtilla: el berry nativo del sur de Chile. **Revista Tierra Adentro**, Aracaunia, v. 57, p. 20-25, 2004.

SHAHIDI, F. **Natural antioxidants**: chemistry, health effects and applications. Champaign: AOCS Press, 1997. 414 p.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics**: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic Publ., 1995. 331 p.

_____. **Food phenolics**: sources, chemistry, effects and applications. 2nd ed. Lancaster: CRC Press, 2003. 405 p.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, J.P.K. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 32, p. 67-103, 1992.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U.N. Measurement of lipid oxidation and evaluation of antioxidant activity. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Natural antioxidants**: chemistry, health effects and applications. Champaign: AOCS Press, 1996. chap. 24, p. 379-395.

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

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U.N.; BRUNET, N. Oxidative stability of oil from blubber of harp Seal (*Phoca groenlandica*) as assessed by NMR and standard procedures. **Institute of Food Research**, Norwich, v. 27, p. 555-562, 1994.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Antioxidants: regulatory status. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Bailey's industrial oil and fat products**. 6th ed. New York: Wiley, 2005. v. 6, p. 57-102.

SHENE, C.; REYES, A.; VILLARROEL, M.; SINEIRO, J.; PINELO, M.; RUBILAR, M. Plant location and extraction procedure strongly alter the antimicrobial activity of murta extracts. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 228, p. 467-475, 2009.

SHIMANO, M.Y.H. **Ação antioxidante de extratos de especiarias e suas misturas binárias e ternárias sobre a estabilidade oxidativa de óleo de soja**. 2012. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 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.

SIMIC, M.G.; JOVANOVIĆ, V.; NIKI, E. Mechanisms of lipid oxidative processes and their inhibition. In: ALLEN, J.A. **Lipid oxidation in food**. New York: American Chemical Society, 1992. chap. 2, p. 14-32.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E.M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de Uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOARES, S.E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SPAGOLLA, L.C.; SANTOS, M.M.; PASSOS, L.M.L.; AGUIAR, C.L. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 30, n. 2, p. 187-191, 2009.

STOCLET, J.C.; CHATAIGNEAU, T.; NDIAYE, M.; OAK, M.H.; EL BEDOUI, J.; CHATAIGNEAU, M.; SCHINI-KERTH, V.B. Vascular protection by dietary polyphenols. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 500, p. 299-313, 2004.

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

SUN, T.; POWERS, J.R.; TAND, J. Evaluation of the antioxidant activity of asparagus, broccoli and their juices. **Food Chemistry**, Barking, v. 105, n. 1, p. 101-106, 2007.

SUWALSKY, M.; ORELLANA, P.; AVELLO, M.; VILLENA, F. Protective effect of *Ugni molinae* Turcz against oxidative damage of human erythrocytes. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 45, p. 130-135, 2007.

SZAJDEK, A.; BOROWSKA, E.J. Bioactive compounds and health-promoting properties of berry fruits: a review. **Plant Foods for Human Nutrition**, London, v. 63, p. 147-156, 2008.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOGLI, S.; CHOWWANAPONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chemistry**, Barking, v. 103, p. 381-388, 2007.

TAKIKAWA, A.Y.; RAMPAZZO, V.; HAMINIUK, C.W.I. Estudo in vitro da capacidade antioxidante e compostos fenólicos de extratos de frutas vermelhas. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 17., 2012, Campo Mourão. **Anais...** Curitiba: Editora Frederico Westphal, 2012. Versão online disponível em: <<http://conferencias.utfpr.edu.br/ocs/index.php/sicite/2012/paper/viewFile/977/398>>. Acesso em: 02 abr. 2013.

TIVERON, A.P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. 2010. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TOLEDO, M.C.F.; ESTEVES, W.; HARTMANN, V.E.M. Eficiência de antioxidantes em óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 5, n. 1, p. 1-11, 1985.

TRICHOPOULOU, A.; VASILPOULOU, E.; HOLLMAN, P.; CHAMALIDES, C.; FOUFA, E.; KALOUDIS, D.; KROMHOUT, D.; MISKAKI, P.; PETROCHIOU, I.; POULIMA, E.; STAFILAKIS, K.; THEOPHILOU, D. Nutritional composition and flavonoid content of edible wild greens and green pies: a potential rich source of antioxidant nutrients in the Mediterranean diet. **Food Chemistry**, Barking, v. 70, p. 319-323, 2000.

TSANG, C.; HIGGINS, S.; DUTHIE, G.G.; DUTHIE, S.J.; HOWIE, M.; MULLEN, W.; LEAN, M.E.J.; CROZIER, A. The influence of moderate red wine consumption on antioxidant status and indices of oxidative stress associated with CHD in healthy volunteers. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 93, n. 2, p. 233-240, 2005.

VALENZUELA, B.A.; NIETO, K.S. Synthetic and natural antioxidants: food quality protectors. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 47, n. 3, p. 186-196, 1996.

VELASCO, J.; DOBARGANES, C. Oxidative stability of virgin olive oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 104, n. 9/10, p. 661-676, 2002.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, p. 4113-4117, 1998.

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; MOYÁ, M.L.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARRILLA, M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, New York, v. 71, n. 1, p. 230-235, 2007.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M.C. Amora-preta (*Rubus* sp.): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, p. 1209-1214, dez. 2011.

WANASUNDARA, U.N.; SHAHIDI, F. Stabilization of canola oil with flavonoids. **Food Chemistry**, Barking, v. 50, p. 393-396, 1994.

_____. Antioxidants: science, technology, and applications. In: SHAHIDI, F. **Bailey's industrial oil and fat products: chemistry, properties and health effects**. 6th ed. Wiley–Interscience, 2005. v. 6, p. 431-489.

WANASUNDARA, U.N.; SHAHIDI, F.; JABLONSKI, C.R. Comparison of standard and NMR methodologies for assessment of oxidation stability of canola and soybean oils. **Food Chemistry**, Barking, v. 52, p. 249-253, 1995.

WANG, H.; CAO, G.; PRIOR, R.L. total antioxidant capacity of fruits. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 3, p. 701-705, 1996.

WHEELER, D.H. Peroxide formation as a measure of autoxidative deterioration. **Oil Soap**, Chicago, v. 9, p. 89-97, 1932.

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

WU, X.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; GEBHARDT, S.; PRIOR, R. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common food in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, p. 4026-4037, 2004.

ZAINOL, M.K.; ABDUL-HAMID, A.; YUSOF, S.; MUSE, R. Antioxidative activity and total phenolic compounds of leaf, root and petiole of four accessions of *Centella asiatica* (L.) urban. **Food Chemistry**, Barking, v. 49, p. 5165-5170, 2003.

3 OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DE FRUTOS DE *MURTILLA* (*ugni molinae* Turcz.) PELA METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Resumo

As frutas são conhecidas por possuírem ativos com comprovada ação antioxidante. Para a obtenção destes ativos, se faz a necessária a etapa de obtenção de extratos e avaliação de sua atividade antioxidante. Com o intuito de otimizar estas operações, a Metodologia de Superfície de Resposta representa uma ferramenta importante, tanto na economia de tempo e reagentes, quanto na redução de custos. Esta metodologia foi utilizada para otimização do processo de extração de compostos fenólicos de frutos de *murtilla* (*Ugni molinae* Turcz.), visando sua aplicação em sistema-modelo para avaliação da atividade antioxidante. Foi aplicado um delineamento fatorial completo do tipo 2^2 com ponto central, sendo que as variáveis explanatórias avaliadas foram a temperatura (30°C a 60°C) e o grau de hidratação do solvente (Etanol 0-99%, v/v). A variável dependente foi o teor de compostos fenólicos totais, expresso em equivalentes ao ácido gálico (mg GAE/ g de *murtilla* seca), realizado pela determinação com reagente de *Folin-ciocalteu*. Os resultados obtidos elucidam que o processo de extração sofre influência direta do grau de hidratação do etanol, sendo que os extratos com maiores teores de compostos fenólicos foram obtidos com solução de 49,5% (v/v) de etanol, em uma ampla faixa de temperatura (30 e 60°C). Análise por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas foi realizada visando à identificação dos compostos presentes nos extratos, após derivatização das amostras. Foram identificados componentes como quercetina, epicatequina, ácido gálico, ácido benzoico e ácido hidrocafeico, que possuem atividade antioxidante comprovada. É possível afirmar que os extratos hidroalcoólicos de frutos de *murtilla* apresentam potencial antioxidante para uso em alimentos de base lipídica

Palavras-chave: Estabilidade oxidativa; Antioxidantes naturais; Frutas, Extração de compostos fenólicos; Capacidade antioxidante

Abstract

Fruits are known for presenting compounds with antioxidant activity and for obtaining these assets it is necessary to extract and to evaluate of their activity. In order to optimize these operations, the Response Surface Methodology becomes as an important tool, both in saving time and reagents, aiming cost reduction. This methodology was used to verify the effect of the degree of hydration of the solvent (ethanol) and temperature on the phenolic content of *murtilla*'s fruits (*Ugni molinae* Turcz.) aiming its application in a model system for evaluation of antioxidant activity. A factorial design 2^2 with central point was applied, and the explanatory variables evaluated were temperature (30°C to 60°C) and the degree of hydration of the solvent (ethanol 0-99%, v/v). The dependent variable was the content of total phenolic compounds expressed as gallic acid equivalent (mg GAE / g dry *murtilla*), conducted by the determination with the *Folin-ciocalteu*. The results elucidate that the extraction process is under direct influence of the water content of ethanol, and the extracts with higher concentrations of phenolic compounds were obtained with a solution of 49.5% ethanol, in a wide temperature range (30 to 60°C). The analysis by gas chromatography-mass detector was performed for the identification of compounds presents in the extracts after derivatization of the samples. Were identified compounds as quercetin, epicatechin, gallic

acid, benzoic acid and hidrocafeic that have proven antioxidant activity. Thus it can be said that the *murtilla's* fruits hydroalcoholic extracts have a huge antioxidant potential for your use in fatty foods.

Keywords: Oxidative stability; Natural antioxidants; Fruits; Extraction of phenolic compounds; Antioxidant capacity

3.1 Introdução

Por apresentarem vitaminas, minerais e fibras, as frutas são reconhecidamente importantes na dieta. Nos últimos anos estudos têm demonstrado que seu consumo regular está relacionado à redução de doenças crônicas não transmissíveis, como as cardiovasculares (MELO et al., 2008) sendo este efeito protetor atribuído à presença de compostos com atividade antioxidante. Dentre estes compostos se destacam os fenólicos (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996), que podem ser encontrados tanto nas folhas, quanto no caule, frutos e sementes. Seu conteúdo sofre interferência de vários fatores, como a parte da planta, estágio de desenvolvimento da planta, grau de maturação, condições ambientais, solo, clima entre outros.

Devido à sua atividade antioxidante já demonstrada, pesquisas têm sido concentradas na extração, identificação e avaliação da atividade destes compostos em sistemas *in vivo* e *in vitro*, além de avaliar sua aplicabilidade em alimentos, a fim de substituir os antioxidantes sintéticos por compostos de origem natural. Uma vez que compostos fenólicos apresentam uma ampla diversidade, diferentes solubilidades e graus de polimerização se faz necessária maior atenção quanto ao processo de extração dos mesmos, isto porque fatores como tipos de compostos alvo, solvente, temperatura e tempo influenciam seu teor final presente no extrato (ANDREO; JORGE, 2006).

A extração de compostos fenólicos é considerada uma das etapas mais importantes, não apenas da análise, mas também para o próprio rendimento da extração, isto porque ela deve ser suficiente para extrair a maior quantidade possível de compostos para que seja possível produzir um extrato com um alto rendimento destes ativos (MORELLI, 2010). As técnicas mais empregadas são extração líquido-líquido, sólido-líquido e em fase sólida (SPE), muito empregada com o objetivo de eliminar interferentes que possam induzir a falsos resultados. Os solventes mais utilizados são o etanol (SOUZA-SARTORI et al., 2013), acetona (CAETANO et al., 2009), metanol (SPAGOLLA et al., 2009), éter (PRADO; ARAGÃO; FETT, 2009), entre outros. Entretanto, é evidente que para extrato ser utilizado em alimentos, é necessário o uso de solventes menos tóxicos, sendo o etanol o mais indicado.

A fim de otimizar a etapa de extração, permitindo a obtenção de maior quantidade de informações a partir de um número reduzido de experimentos (BAS; BOYACI, 2007), é possível empregar a metodologia de Superfície de Resposta ou “Response Surface Methodology” (RSM), definida como um planejamento experimental utilizado para o desenvolvimento e otimização de processos (MYERS; MONTGOMERY, 2002).

De acordo com Montgomery (1997), o planejamento experimental é um conjunto de ensaios com critérios científicos e estatísticos pré-estabelecidos que tem por finalidade avaliar a influência de diferentes variáveis nos resultados de um sistema ou processo. Dentre suas maiores vantagens estão a possibilidade de determinar quais as variáveis que interferem nos resultados, conferir os valores destas variáveis para que além de ser possível otimizar a resposta média, se consiga minimizar a variabilidade dos resultados obtidos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi, por meio da metodologia de Superfície de Resposta, avaliar os efeitos da temperatura e do solvente empregados na extração de compostos fenólicos de frutos de *murtilla* (*Ugni molinae* Turcz.), com o objetivo de predizer as condições ótimas para a obtenção de extratos com alto teor de compostos fenólicos, além de identificar seus componentes por meio da técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Amostras e preparo dos extratos

As duas amostras estudadas são compostas por frutos de *murtilla*, uma por frutos silvestres e a outra por frutos pertencentes ao genótipo 14-4 proveniente do banco de germoplasma do INIA (Instituto de Investigações Agropecuárias) localizado na região da Araucanía (Temuco, Chile). Estas foram colhidas no dia 18 de abril de 2011 (38°, 45’S, 73° 21’O), sendo sua secagem realizada no dia 19 de abril de 2011, por meio de um secador de gabinete industrial (1,8m comprimento, 2,2 m altura, 3,5m profundidade), com temperatura constante de 70°C por 6 horas, com umidade inicial de 78,5% e umidade final de 5,4% (base seca). Após este processo, os frutos foram embalados a vácuo em embalagens com proteção à entrada de luz e oxigênio.

Os extratos hidroalcoólicos foram produzidos em laboratório de acordo com a metodologia de Ribeiro et al. (2008), com algumas modificações. Os frutos desidratados foram moídos e 1,0g de cada amostra foi condicionada em erlenmeyers de 250mL, onde foram adicionados 30mL da mistura etanol:água destilada. O grau de hidratação do etanol foi

definido no planejamento experimental e é apresentado na Tabela 4. Em seguida os erlenmeyers foram colocados sob agitação em banho-maria durante 50 minutos e mantidos sob temperatura controlada, de 30 a 60°C (Tabela 4). Em seguida os extratos foram centrifugados a 2057 g durante 15 minutos e, posteriormente, filtrados sobre papel de filtro tipo Whatman n. 2 e armazenados sob refrigeração a 7°C em frascos âmbar, por até 1 mês.

3.2.2 Determinação do teor de compostos fenólicos totais (*Folin-ciocalteu*)

O teor de composto fenólicos totais dos extratos de *murtilla* foi realizado em triplicata e determinado de acordo com o método espectrofotométrico de *Folin-ciocalteu*, descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999), utilizando o ácido gálico como padrão.

Os extratos hidroalcoólicos foram diluídos na mistura etanol:água na concentração 1:10 (v/v). Uma alíquota de 0,5mL da amostra diluída foi transferida para um tubo de ensaio adicionado 2,5mL da solução *Folin-ciocalteu*:água (1:10, v/v). A mistura foi agitada em vórtex seguida de repouso, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. Em seguida foram adicionados 2,0mL da solução de carbonato de sódio 4% (m/v), sendo a mistura novamente agitada e mantida em repouso por duas horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-1203 (Shimadzu, modelo UV 1203) a 740nm. Uma amostra em branco foi preparada e analisada nas mesmas condições, sendo que os resultados foram calculados a partir da curva padrão com concentrações conhecidas (2,5 a 50µg/ml) de ácido gálico (Apêndice A). Os resultados foram expressos em mg de Ácido gálico (GAE) / g matéria seca.

3.2.3 Remoção de interferentes das amostras através da técnica de SPE (*Solid Phase Extraction*)

A técnica SPE foi utilizada para a remoção de interferentes que poderiam intervir na identificação dos compostos de interesse por cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massas. Os cartuchos SPE-LC18 (Supelco, 2 gramas) foram condicionados por meio de várias lavagens com metanol e água ácida (pH=2), respectivamente. Em seguida, 4 mL de cada extrato etanólico, rotoevaporado a temperatura de 45°C e redissolvido na mesma quantidade de água, foram acrescentados aos respectivos cartuchos. Após a passagem do extrato pela coluna, foi adicionada água ácida suficiente para a retirada dos açúcares presentes. Em seguida, foi acrescido metanol para a eluição dos compostos de interesse, que foram recolhidas em *vials* de vidro.

3.2.4 Derivatização

Esta etapa foi necessária, pois a amostra a ser analisada pela espectrometria de massas (CG-EM) apresentava-se no estado líquido, portanto a derivatização foi procedida para reduzir a polaridade de grupos funcionais das substâncias de interesse e viabilizar sua separação no cromatógrafo gasoso.

Deste modo, os extratos selecionados para a análise de cromatografia gasosa foram os que apresentaram o maior rendimento de compostos fenólicos totais. Estes, foram evaporados sob corrente de nitrogênio para a retirada do solvente e as frações aquosas restantes foram congeladas e posteriormente submetidas à liofilização. Foram adicionados 100µL do reagente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) em aproximadamente 20mg do material liofilizado. A mistura foi homogeneizada e levada à estufa por 10 minutos a 70°C para reação. O reagente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e o produto da derivatização foi rediluído em 600-800µL de hexano, sendo homogeneizado novamente e o sobrenadante injetado no CG-EM. Todos os compostos formados foram derivados do MSTFA.

3.2.5 Identificação química dos extratos por cromatografia em fase gasosa com espectrometria de massas (CG-EM)

A análise em CG-EM foi realizada em fase gasosa no cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo GC 2010, acoplado ao espectrômetro de massas Shimadzu, modelo QP 2010 Plus. As amostras foram separadas em coluna capilar (RTX5MS 30m x 0,25mm x 0,25µm).

A temperatura inicial da coluna foi de 80°C, durante 1 minuto; e atingiu 250°C a taxa de 20°C/min, permanecendo nesta temperatura por 1 minuto, de 250 a 300°C a taxa de 6°C/min, durante 5 minutos; de 300 a 310°C a taxa de 15°C/min durante 5 minutos; de 310 a 320°C a taxa de 20°C/min durante 10 minutos, totalizando 40 minutos de análise. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste e a temperatura do injetor foi de 280°C e o volume de injeção foi de 0,2µL no modo “splitless”. A interface foi mantida à temperatura de 280°C e o detector de massas operou no modo “scanning” m/z de 40 a 800.

A integração foi feita no software LabSolutions-GCMS e os flavonóides, ácidos fenólicos e derivados foram identificados pela comparação com os dados obtidos do CG-EM (tempo de retenção e fragmentação iônica) de padrões idênticos sinalizados e eluídos nas mesmas condições e com as bibliotecas Wiley8 e de “fenólicos”, elaborada no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN/ESALQ). Os

compostos que não foram identificados, caracterizam-se os íons moleculares principais, de acordo com a relação massa-carga (m/z).

3.2.6 Otimização da extração de fenólicos e análise estatística

Por meio do método de Superfície de Resposta e da análise de regressão múltipla, foram estudados os efeitos da temperatura e percentual de etanol utilizados na produção dos extratos sobre o teor de compostos fenólicos totais, a fim de definir as condições ótimas de obtenção de extratos com potencial antioxidante. Foi procedido o ajuste do modelo matemático de segunda ordem com a inclusão de termos lineares, quadráticos e interações entre as variáveis explanatórias. Foi elaborado um planejamento fatorial com dois níveis (+1 e -1) para cada variável explanatória (%etanol e temperatura).

Considerando que “n” variáveis estão envolvidas no estudo de um processo específico, o número de ensaios a serem realizados a fim de avaliar as possíveis combinações entre as variáveis foram 2^n . Para se estimar o erro experimental, foram acrescentados quatro ensaios com valores codificados relativos ao nível zero, que representavam o ponto central. Para completar o planejamento foram realizados ensaios referentes aos pontos axiais, posicionados a uma distância codificada α , sendo $\alpha=2^{n/4}$ do ponto central. A Tabela 4 apresenta as faixas de estudo das condições de preparo dos extratos e os níveis das variáveis explanatórias. O delineamento experimental é apresentado na Tabela 5.

O modelo matemático 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 11 (STATSOFT, 2010). A fórmula geral do modelo é representada pela Equação (1):

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

Onde:

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

Tabela 4 - Faixas de estudo das condições de preparo de extratos de frutos de *murtilla* e seus níveis de variação

Variáveis explanatórias	Níveis de variação				
	-1,41	-1	0	1	1,41
% Etanol	0	14,4	49,5	84,6	99
Temperatura (°C)	30	34,4	45	55,6	60

Tabela 5 - Delineamento experimental do planejamento fatorial completo do tipo 2² aplicado no processo de produção dos extratos

Ensaio	Variáveis explanatórias	
	% Etanol	Temperatura (°C)
1	14,4	34,4
2	84,6	34,4
3	14,4	55,6
4	84,6	55,6
5	0	45
6	99	45
7	49,5	30
8	49,5	60
9	49,5	45
10	49,5	45
11	49,5	45
12	49,5	45

3.3 Resultados e discussão

Diversos estudos da extração de compostos fenólicos, que empregam diferentes solventes e temperaturas, vêm aumentando consideravelmente na tentativa de estabelecer o modelo mais eficiente quanto à extração destes compostos (KARVELA et al., 2009; SCHEUERMANN, 2008; MURAKAMI, 2010). O planejamento experimental é considerado um aliado na otimização do processo de extração tendo sua aplicação em análises que possuem diversas variáveis explanatórias influenciando uma variável dependente, permitindo a identificação das relações estatísticas e matemáticas entre os níveis pré-determinados das variáveis (THOMPSON, 1982). Com ele se torna possível selecionar um número fixo de níveis para cada uma das variáveis e em seguida executar experimentos com todas as combinações possíveis.

A Tabela 6 apresenta o teor de compostos fenólicos totais extraídos, por meio da metodologia de superfície de resposta, dos frutos das duas cultivares de *murtilla*, já as Tabelas 7 e 8 apresentam a estimativa dos efeitos das variáveis explanatórias analisadas sobre o teor de compostos fenólicos totais dos extratos.

Tabela 6 - Teor de compostos fenólicos totais dos extratos de frutos de *murtilla*

Ensaio	Variáveis explanatórias		Teor de fenólicos totais (mg GAE/g matéria seca)	
	Temperatura (°C)	Etanol (%)	<i>Murtilla</i> silvestre*	<i>Murtilla</i> 14-4*
1	34,4	14,4	14,27	20,41
2	34,4	84,6	9,9	8,87
3	55,6	14,4	14,64	22,6
4	55,6	84,6	11,64	17,62
5	45	0	11,39	14,6
6	45	99	7,3	5,56
7	30	49,5	18,39	26,14
8	60	49,5	18,86	27,9
9	45	49,5	17,54	25,22
10	45	49,5	17,77	23,63
11	45	49,5	18	27,23
12	45	49,5	19,46	27,79

*valores expressos pelas médias de três determinações analíticas

Tabela 7 - Estimativa dos efeitos das variáveis explanatórias sobre o teor de compostos fenólicos totais extraídos da *murtilla* silvestre

<i>Murtilla</i> Silvestre	Efeito	Desvio Padrão	Nível descritivo (P)
Média	18,1932	0,4326	0,0000
Etanol (L)	-3,2975	0,6127	0,0126
Etanol (Q)	-9,5775	0,6868	0,0008
Temperatura (L)	0,6942	0,6127	0,3396
Temperatura (Q)	-0,2458	0,6868	0,7441
Etanol (L) x Temperatura (L)	0,6862	0,8652	0,4856

Termos em negrito: estatisticamente significativos a 95% de confiança (p<0,05)

L=linear; Q=quadrático

Tabela 8 - Estimativa dos efeitos das variáveis explanatórias sobre o teor de compostos fenólicos totais extraídos da *murtilla* 14-4

<i>Murtilla</i> 14-4	Efeito	Desvio Padrão	Nível descritivo (P)
Média	25,9713	0,9553	0,0001
Etanol (L)	-7,3387	1,3530	0,0123
Etanol (Q)	-16,5590	1,5167	0,0016
Temperatura (L)	3,3676	1,3530	0,0886
Temperatura (Q)	0,4874	1,5167	0,7690
Etanol (L) x Temperatura (L)	3,2805	1,9105	0,1845

Termos em negrito: estatisticamente significativos a 95% de confiança (p<0,05)

L=linear; Q=quadrático

Analisando os resultados apresentados nas Tabelas 7 e 8, é possível afirmar que o processo de extração dos compostos fenólicos dos frutos tanto da *murtilla* silvestre quanto da 14-4 foi afetado pelo grau de hidratação do etanol, sendo que tanto o efeito linear quanto o quadrático se mostraram estatisticamente significativos. Já o aumento na temperatura, apesar

de ter promovido maior extração de compostos fenólicos nas duas amostras de frutos de *murtilla*, não foi estatisticamente significativo segundo o teste T-student ($p < 0,05$).

Apesar da diferença dos resultados obtidos em cada ensaio, para as duas cultivares de *murtilla*, observa-se que houve o mesmo comportamento em relação à extração de compostos fenólicos e o grau de hidratação do etanol utilizado. Após a análise dos efeitos, os termos não significativos foram eliminados e obtiveram-se os coeficientes de regressão das equações de segunda ordem. Os modelos matemáticos são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 - Modelos matemáticos de segunda ordem das duas cultivares de frutos de *murtilla*

<i>Murtilla</i>	Equação polinomial de segunda ordem (modelo codificado)
Silvestre	Fenólicos totais (mg GAE/g matéria seca) = $18,09542 - 1,64877 * \% \text{Etanol} - 4,76455 * \% \text{Etanol}^2$
14-4	Fenólicos totais (mg GAE/g matéria seca) = $26,165239 - 3,66933 * \% \text{Etanol} - 8,32753 * \% \text{Etanol}^2$

A análise de variância (Tabelas 10 e 11) reportou que os modelos propostos são considerados válidos, porque as regressões são estatisticamente significativas ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{Tabelado}}$). O teste F indicou que a falta de ajuste não foi estatisticamente significativa ao nível de 5% ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{Tabelado}}$). Os valores dos coeficientes de determinação (R^2) obtidos foram considerados altos, maiores que 0,90. Essa combinação de indicadores depreendida após a realização da ANOVA, em que se observa que os valores calculados de F para as regressões dos dois modelos matemáticos foram mais do que três vezes superiores que os valores tabelados de F, associada ao alto coeficiente de determinação, permitem concluir que os modelos são válidos e podem ser utilizados para fins preditivos.

Tabela 5 - Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais do extrato de frutos da *murtilla* silvestre

Fonte de variação	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F
Regressão	171,5866	2	85,79331	96,96129
Resíduo	7,9634	9	0,88482	
Falta de ajuste	5,7179	6	0,952977	1,273172
Erro puro	2,2455	3	0,748506	
Total	179,5500	11		

$F_{0,95;2;9}=4,26$; $F_{0,95;6;3}=8,94$; $R^2= 0,95565$

Tabela 6 - Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais do extrato de frutos da *murtilla* 14-4

Fonte de variação	Soma Quadrática	GL	Média Quadrática	F
Regressão	565,3251	2	282,6625	43,98831
Resíduo	57,8327	9	6,425855	
Falta de ajuste	46,8821	6	7,813691	2,14063
Erro puro	10,9505	3	3,650183	
Total	623,1578	11		

$F_{0,95;2;9}=4,26$; $F_{0,95;6;3}=8,94$; $R^2= 0,90719$

Os modelos matemáticos obtidos para o processo de extração das duas amostras de frutos de *murtilla* apresentaram parâmetros quadráticos negativos, indicando que as superfícies de resposta obtidas são uma curvatura, com passagem por uma região de máximo teor de fenólicos. As Figuras 10 e 11 apresentam as superfícies de resposta ajustadas aos modelos matemáticos das duas amostras estudadas, bem como o gráfico de contorno.

Figura 10 - Efeito da temperatura e da solução etanol:água sobre o teor de compostos fenólicos totais dos extratos dos frutos de *murtilla* silvestre

Figura 11 - Efeito da temperatura e da solução etanol:água sobre o teor de compostos fenólicos totais dos extratos dos frutos de *murtilla* 14-4

Observou-se que a porcentagem de etanol 49,5% (v/v) em todas as temperaturas proporcionou maior rendimento de extração dos compostos fenólicos, desta forma pode-se considerar que para este substrato esta concentração de solvente (etanol: água) é considerada a mais eficiente quanto ao poder de extração. Valores de hidratação do etanol superiores a 50% (v/v) indicaram uma redução da eficiência da extração.

Tsao et al. (2003) afirmam que há uma grande diferença no teor de fenólicos entre cultivares cultivadas e silvestres, e este fato pode ser uma hipótese para o extrato dos frutos da *murtilla* 14-4 ter apresentado um teor de fenólicos superior que da *murtilla* silvestre. Tuberoso et al. (2010) fizeram a extração dos compostos fenólicos de bagas de murta (*Myrtus communis* L.) com etanol, acetato de etila e água e encontraram diferenças significativas entre os solventes, sendo que o etanol foi o solvente mais eficiente, seguido pelo acetato de etila e pela água, sendo esta última a menos eficaz. Também foram encontradas diferenças quanto aos perfis dos compostos fenólicos, verificou-se que aqueles extraídos com etanol apresentaram compostos mais polares, tais como antocianinas, enquanto com o uso de acetato de etila foram extraídos compostos apolares, como, por exemplo, os flavonóis.

Spagolla et al. (2009) realizaram a extração de compostos fenólicos de mirtilo com diferentes proporções de etanol e água e concluíram que a proporção de 60:40 (etanol: água, v/v), foi capaz de extrair a maior quantidade de fenólicos totais da fruta. Já Silva (2010), obteve altos teores de fenólicos de casca de uvas *Syrah* e *Cabernet Sauvignon* com o processo de extração utilizando a proporção de 80:20 (etanol: água, v/v). Cacace e Mazza (2003) avaliaram a otimização da extração de fenólicos a partir de groselhas, e com uma combinação das variáveis tempo e porcentagem de etanol, concluíram que a extração foi afetada principalmente pela concentração de etanol, sendo que a temperatura não foi estatisticamente significativa. Os compostos fenólicos encontrados aumentaram com a concentração de etanol de aproximadamente 60%, sendo reduzida com o aumento desta porcentagem. Guerrero e colaboradores (2010) avaliaram a extração e atividade antioxidante de oito frutos comerciais (três cultivares de mirtilo, dois de framboesa, dois de saskatoon e um de morango) e seis frutos silvestres (salsaparrilha, sabugueiro, amora silvestre, *murtilla*, rosa mosqueta e maqui) chilenos. Por meio de uma extração etanólica, relataram que a rosa mosqueta, o sabugueiro, a amora silvestre e o saskatoon demonstraram os maiores teores de fenólicos extraídos.

De acordo com os resultados obtidos em nosso estudo, foi definido que a melhor condição para obtenção de extratos com alto teor de compostos fenólicos foi a mesma para as duas cultivares de *murtilla*: etanol 49,5% (v/v) a 30°C. Como a temperatura, dentro da faixa estudada, não influenciou significativamente o teor de compostos fenólicos extraído, optou-se por utilizar a menor temperatura. O grau de hidratação do etanol foi selecionado com base na análise da superfície de resposta. Deste modo, todas as análises subsequentes foram procedidas com a utilização de extratos hidroalcoólicos produzidos nesta condição.

A técnica em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) é muito empregada para diversas análises em alimentos, como por exemplo, análise de compostos

voláteis em frutas (PINO; MARBOT, 2001; BOULANGER; CROUZET, 2001), açúcar, álcool e ácido carboxílico (FÜZFAI; MOLNÁR-PERL, 2007) e até compostos tóxicos (CHIARADIA; COLLINS; JARDIM, 2008). No presente trabalho, os perfis cromatográficos das frações dos extratos analisados estão apresentados nas Figuras 12 e 13, seguidas das respectivas identificações dos picos e dos principais fragmentos dos íons compostos não identificados (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12 - Tempos de retenção (TR), porcentagem de cada componente, íons significativos do espectro de massa e similaridade dos compostos presentes na fração recuperada dos extratos hidroalcoólicos de frutos de *murtilla* silvestre

TR (min)	Composto	m/z	% área	Similaridade (%)
8.951	Ácido Arabinóico 2,3,5- TRIS-O- γ -lactona, L- n.i	73(100) 217(57) 147(15) 45(15) 75(14) 218(11) 129(10) 74(9)	4.94	87
9.291	Ácido cítrico	73(100) 147(45) 273(42) 75(16) 45(12) 375(11) 347(10)	11.25	90
9.426	Ácido Manônico, 2,3,5,6- Tetraquis-O-lactona n.i	73(100) 217(59) 147(25) 218(12)	1.04	83
10.016	Ácido Benzoico	73(100) 281(57) 458(46) 459(20) 443(18) 45(15) 74(9) 147(8) 75(6) 133(4)	10.61	92
10.446	Ácido Palmítico n.i	73(100) 75(82) 117(74) 43(43) 132(39) 41(33) 55(29) 29(18) 57(16) 28(13)	2.19	89
11.580	Ácido Oleico n.i	73(100) 75(88) 117(63) 55(54) 129(45) 339(43) 41(40) 43(30) 145(30) 67(25)	1.51	85
13.082	Glucopiranosídeo	73(100) 204(91) 133(29) 147(19) 205(19) 217(15) 74(9) 75(8) 45(7) 89(7) 119(7)	2.46	79
14.534	Glucose	73(100) 204(94) 191(45) 147(23) 205(19) 217(17)	4.81	81
14.910	D-Turanose	73(100) 103(22) 147(26) 217(24) 204(16) 361(44) 362(14)	3.79	82
15.347	Ácido Hidrocafeeico n.i	73(100) 267(34) 280(28) 265(24) 75(17) 45(17)	1.08	76
17.380	Propanotriol	73(100) 217(63) 105(51) 129(23) 75(22) 147(17) 251(14) 218(13)	2.12	75
17.605	Epicatequina	368(100) 73(56) 355(46) 369(34) 650(23)	12.03	85
18.166	Ácido Galacturônico	73(100) 204(24) 217(24) 147(18)	2.49	74
20.760	Quercetina	575(100) 576(48) 73(43) 577(27) 647(17) 487(16) 648(10)	2.51	78

n.i Composto não identificado

Figura 12 - Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato de frutos de *murtilla* silvestre

Tabela 13 - Tempos de retenção (TR), porcentagem de cada componente, íons significativos do espectro de massa e similaridade dos compostos presentes na fração recuperada dos extratos hidroalcoólicos de frutos de *murtilla* 14-4

TR (min)	Composto	m/z	% área	Similaridade (%)
6.997	Ácido Mandélico	179(100) 73(83) 147(28) 180(15) 45(15) 75(11) 77(11)	3.28	93
8.375	Ácido Propanoico	73(100) 75(86) 145(42) 45(16) 43(11) 74(10)	0.32	81
8.953	Ácido Manônico, 2,3,5,6-Tetraquis-O- Lactona n.i	73(100) 217(60) 147(16) 45(15) 75(14) 218(12)	1.42	87
9.427	D-Xilose	73(100) 217(41) 147(15) 204(15) 45(13) 117(12) 191(10)	0.56	83
10.020	Ácido Gálico	73(100) 281(56) 458(46) 459(19) 443(18) 45(15) 282(14)	6.68	93
10.450	Ácido Palmítico	73(100) 75(82) 117(74) 43(43) 132(38) 313(34) 129(31)	3.46	94
11.584	Ácido Oleico	73(100) 43(30) 41(40) 55(55) 67(25) 75(88) 117(64) 129(45) 145(30) 339(43)	2.82	95
12.224	Glucofuranose	217(100) 73(91) 218(48) 129(47) 91(34) 162(31) 39(27) 204(26)	4.62	80
13.084	D-Glucopiranosídeo n.i	73(100) 204(91) 91(87) 217(24) 147(21) 205(19)	2.78	81
13.811	Arabitol n.i	73(100) 103(28) 147(21) 205(18) 217(29) 307(11)	6.98	74
13.999	Ribitol n.i	73(100) 204(25) 103(21) 217(20) 75(18) 193(18)	0.86	80
14.380	D-Manose n.i	73(99) 191(40) 147(22) 204(100) 205(20) 217(17)	8.18	75
14.540	Glucose n.i	73(100) 147(23) 191(45) 204(95) 205(19)	5,21	84
14.913	D-Turanose	73(100) 217(34) 361(30) 103(24) 129(23) 437(12)	3,67	84
17.616	Epicatequina	368(100) 73(56) 355(46) 369(34) 650(23) 370(16)	22,88	95
20.766	Quercetina	575(100) 576(48) 73(43) 577(27) 647(17) 487(17)	2,22	82

n.i Composto não identificado

Figura 13 - Perfil cromatográfico da fração recuperada do extrato de frutos de *murtilla* 14-4

A Figura 14 ilustra a identificação dos picos sobrepostos das duas *murtillas*, mostrando quais foram os compostos semelhantes, os diferentes e suas dimensões.

Figura 14 - Perfil cromatográfico da fração recuperada dos extratos de frutos de *murtilla* silvestre e 14-4

Apesar de ter sido empregada a técnica de SPE, uma grande quantidade de açúcares foi identificada, o que dificulta a separação e inviabiliza a identificação de outros compostos de interesse. Apesar disso, foi possível identificar a presença de compostos fenólicos. Alguns picos cromatográficos não foram identificados pela biblioteca Wiley 8, entretanto compostos como quercetina e epicatequina foram identificados. Também foi possível verificar a presença de alguns compostos provenientes da estrutura de pectinas, ácido hidroxibenzoico (ácido benzoico – aroma, ácido gálico) e ácido hidroxicinâmico (ácido hidrocafeico).

Peña-Neira et al. (2007) identificaram derivados de quercetina em frutos de *murtilla* de diferentes ecotipos por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência e relataram que os perfis cromatográficos variaram de acordo com a amostra analisada.

Muitos estudos focam a identificação de polifenóis em folhas de *murtilla*, onde é possível encontrar ácidos fenólicos, epicatequina, miricetina, quercetina entre outros (AVELLO, 2000; RUBILAR et al., 2006). Rubilar e colaboradores (2006) encontraram nas folhas de *murtilla* (*Ugni molinae* Turcz.) compostos como epicatequina e ácido gálico, o que demonstra que tanto nas folhas, quanto nos frutos estes compostos se fazem presentes.

Seeram et al. (2006) identificaram uma grande quantidade de quercetina em morango (*Fragaria x ananassa* Duch.), já Zuo, Wang e Zhan (2002) identificaram os ácidos benzoico e cafeico, pela técnica de CG-EM em cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) e Borges e colaboradores (2010) identificaram, por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, a presença de ácido cafeico e quercetina em groselha preta, mirtilo, framboesa, groselha vermelha e oxicoco.

Apesar das diferenças metodológicas, foi possível comparar os resultados obtidos neste estudo com os relatados em outras pesquisas, porém é necessário ressaltar que as discrepâncias encontradas devem ser consideradas pela diferença de substrato analisado, estágio de maturação dos frutos além da variedade e condições climáticas da região de cultivo.

3.4 Conclusões

A aplicação da metodologia de Superfície de Resposta mostrou-se uma ferramenta importante para a determinação das melhores condições operacionais para obtenção de extratos de frutos de *murtilla* com o máximo teor de compostos fenólicos totais. O método aplicado para quantificação teor de compostos fenólicos, *Folin-ciocalteu*, apesar de simples e muito utilizado, pode fornecer valores superestimados, pelo fato de que algumas substâncias presentes na amostra, como açúcares, ácido ascórbico e ácidos orgânicos, interferirem nos resultados. Foi possível encontrar compostos de interesse como epicatequina, quercetina, ácido gálico, ácido benzoico e ácido hidrocafeico, que possuem atividade antioxidante já comprovada por outros estudos.

Avaliando todos os dados obtidos, concluiu-se que os extratos de *murtilla* podem ser considerados potenciais fontes de antioxidantes, sendo necessária a aplicação destes em sistemas-modelo para que sua ação seja efetivamente comprovada.

Referências

- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.
- AVELLO, M. **Estudio fitoquímico de hojas de *Ugni molinae* (Murtilla) y evaluación de la actividad antioxidante de sus componentes**. 2000. 100 p. Tesis (Doctor in Químico Farmacéutico) - Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, 2000.
- BAS, D.; BOYACI, I.H. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**, London, v. 78, n. 3, p. 836-845, 2007.
- BORGES, G.; DEGENEVE, A.; MULLEN, W.; CROZIER, A. Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, n. 7, p. 3901-3909, 2009.
- BOULANGER, R.; CROUZET, J. Identification of the aroma components of acerola (*Malpighia glabra* L.): free and bound flavour compounds. **Food Chemistry**, Barking, v. 74, p. 209-216, 2001.
- CACAE, J. E.; MAZZA, G. Optimization of extraction of anthocyanins from Black currants with aqueous ethanol. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 68, p. 240-248, 2003.
- CAETANO, A.C.S. **Potencial antioxidante de extratos de resíduos de acerolas (*Malpighia emarginata* D.C.) em diferentes sistemas modelos e na estabilidade oxidativa do óleo de soja**. 2009. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.
- CHIARADIA, C.M.; COLLINS, C.H.; JARDIN, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.
- FÜZFAI, Z.; MOLNÁR-PERL, I. Gas chromatographic-mass spectrometric fragmentation study of flavonoids as their trimethylsilyl derivatives: analysis of flavonoids, sugars, carboxylic and amino acids in model systems and in citrus fruits. **Journal of Chromatography**, Budapest, v. 1149, n. 1, p. 88-101, 2007.
- GUERRERO, J.C.; CIAMPI, L.P.; CASTILLA, A.C.; MEDEL, F.S.; SCHALCHILI, H.S.; HOR5MAZABAL, E.U.; BENSCH, E.T.; ALBERDI, M.L. Antioxidant capacity, anthocyanins, and total phenols of wild and cultivated berries in Chile. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Temuco, v. 70, n. 4, p. 537-544, Oct./Dec. 2010.
- KARVELA, E.; MAKRIS, D.P.; KALOGEROPOULOS, N.; KARATHANOS, V.T. Development of response surface methodology to optimise recovery of grape (*Vitis vinifera*) stem polyphenols. **Talanta**, New York, v. 79, p. 1311-1321, 2009.
- MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 193-201, abr./jun. 2008.

MONTGOMERY, D.C. **Design and analysis of experiments**. New York: Wiley, 1997. 680 p.

MORELLI, L.L.L. **Avaliação de compostos fenólicos majoritários em geleia de uva produzida com a variedade IAC-138-22 (máximo)**. 2010. 147p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

MURAKAMI, A.N.N. **Concentração de compostos fenólicos de extrato aquoso de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)** 2010. 156 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MYERS, R.H.; MONTGOMERY, D.C. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. 2nd ed. New York: John Wiley, 2002. 680 p.

PEÑA-NEIRA, A.; CÁCERES, A.; PASTENES, C. Low molecular weight phenolic and anthocyanin composition of grape skins from cv. Syrah (*Vitis vinifera* L.) in the Maipo Valley (Chile): Effect of clusters thinning and vineyard yield. **Food Science and Technology**, London, v. 13, p. 153-158, 2007.

PINO, J.A.; MARBOT, R. Volatile flavor constituents of acerola (*Malpighia emarginata* D.C.) fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, p. 5880-5882, 2001.

PRADO, A.C.P.; ARAGÃO, A.M.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, n. 4, p. 323-332, 2009.

RIBEIRO, S.M.; BARBOSA, L.C.; QUEIROZ, J.H.; KNODLER, M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**, Barking, v. 110, n. 3, p. 620-626, 2008.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RUBILAR, M.; PINELO, M.; IHL, M.; SCHEUERMANN, E.; SINEIRO, J.; NUÑO EZ, M.J. Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 59-64, 2006.

SCHEUERMANN, E.S.S. **Estudio de componentes volatiles y capacidad antioxidante de frutos de murta (*Ugni molinae* Turcz.) y evaluación de su estabilidad em almacenamiento refrigerado, congelación y tratamiento térmico de pasteurización**. 2008. 200 p. Tesis (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidad de Santiago de Chile, Santiago, 2008.

SEERAM, N.P.; ADAMS, L.S.; ZHANG, Y.; LEE, R.; SAND, D.; SCHEULLER, H.R.; HEBER, D. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 929–933, 2006.

SILVA, A.D.F. **Análise de compostos fenólicos e potencial antioxidante de amostras comerciais de sucos de uva e produtos derivados de uvas vinícolas**. 2010. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

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

SOUZA-SARTORI, J.A.; SCALISE, C.; BAPTISTA, A.S.; LIMA, R.B.; AGUIAR, C.L. Parameters of influence on extraction of phenolic compounds from sugarcane tops with total antioxidant activity. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 29, n. 2, p. 297-307, Mar./Apr. 2013.

SPAGOLLA, L.C.; SANTOS, M.M.; PASSOS, L.M.L.; AGUIAR, C.L. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 30, n. 2, p. 187-191, 2009.

THOMPSON, D. R. Response surface experimentation. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, v. 6, n. 3, p. 155-188, 1982.

TSAO, R.; YANG, R.; SOCKNOVIE, E.; ZHOU, T.; DALE, A. Antioxidant phytochemicals in cultivated and wild Canadian strawberry. **International Society of Horticultural Science**, Toronto, v. 616, p. 25-35, 2003.

ZUO, Y.; WANG, C.; ZHAN, J. Separation, characterization, and quantitation of benzoic and phenolic antioxidants in American cranberry fruit by GC-MS. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 13, p. 3789-3794, 2002.

4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE FRUTOS DE *MURTILLA* (*Ugni molinae* Turcz.)

Resumo

A oxidação lipídica é uma das causas mais importantes relacionadas à perda da qualidade nutricional e sensorial dos alimentos, diminuindo assim sua vida de prateleira e provocando rejeição por parte dos consumidores. Considerando estes aspectos, a indústria de alimentos faz o uso de compostos antioxidantes capazes de inibir ou retardar este tipo de reação. Porém, a maioria dos antioxidantes utilizados é de origem sintética, com uma série de restrições quanto ao seu uso, principalmente pelo fato de que em elevadas concentrações podem provocar danos à saúde do consumidor. Na última década ocorreu um aumento considerável no número de pesquisas sobre o uso de antioxidantes de fontes naturais (como plantas, vegetais, frutas, entre outros) em alimentos, a fim de avaliar quais são as fontes que possuem maior quantidade de compostos fenólicos e como estes compostos atuam na proteção contra o fenômeno da oxidação lipídica. Com esse objetivo, o presente trabalho avaliou a atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos de frutos de duas cultivares de *murtilla* (*Ugni molinae* Turcz.) em sistema modelo a base de óleo de soja refinado, a partir das análises de *Folin-ciocalteu*, DPPH e ABTS a fim de mensurar sua capacidade antioxidante. A *murtilla* silvestre e a 14-4 apresentaram 19,35 e 40,28mg GAE/ g de matéria seca para fenólicos, 76,48 e 134,35 μ mol TEAC/ g de matéria seca para DPPH e 157,04 e 293,99 μ mol TEAC/ g de matéria seca para ABTS, respectivamente. Assim, foram adicionados 50, 100, 150 e 200 mg kg⁻¹ do extrato em óleo de soja refinado para conduzir os ensaios em estufa (*Schaal Oven Test*) e Rancimat, sendo que as concentrações que apresentaram melhores resultados foram de 150 e 200 mg kg⁻¹ para as duas cultivares de *murtilla*.

Palavras-chave: *Murtilla*; Óleo de soja; Teste de estufa; Compostos antioxidantes

Abstract

Lipid oxidation is one the most important cause that promotes the loss of nutritional and sensory qualities of the food, thus reducing their shelf life and causing rejection by consumers. Considering these aspects, the food industry uses antioxidant compounds that are able to inhibit or retard this reaction. Most of the antioxidants are synthetic and due to this, there a series of restrictions on its use, mainly because of the fact that at high concentration can cause damage to the health of the consumer. In the last decade there was an increase in the number of researches that focused on applying natural sources of antioxidants (such as plant, vegetable, fruit, etc) in food, in order to assess which are the sources that have higher amounts of phenolic compounds and how these compounds act in the protection of food. With this objective, the present study evaluated the antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from fruits of two cultivars of *murtilla* (*Ugni molinae* Turcz.) in a model system based on refined soybean oil, proceeding analyzes *Folin-ciocalteu*, DPPH and ABTS in order to measure their antioxidant capacity. The wild *murtilla* and 14-4 showed 19,35 and 40,28mg GAE/g of dry sample for phenolics, 76,48 and 134,35 μ mol TEAC/g of dry sample for DPPH and 157,04 and 293,99 μ mol TEAC/g of dry sample for ABTS, respectively. Then was added 50, 100, 150 and 200 mg kg⁻¹ of the extract into soybean oil to conduct the tests in the oven (*Schaal Oven Test*) and Rancimat, and the concentrations that showed better results were 150 and 200 mg kg⁻¹ for both of cultivars of *murtilla*.

Keywords: *Murtilla*; Soybean oil; Oven test; Antioxidant compounds

4.1 Introdução

Uma das maiores causas da deterioração e perda de qualidade nos alimentos é a oxidação lipídica, responsável pela destruição de compostos nutricionais, alteração do aroma, textura e sabor do produto, além da formação de substâncias potencialmente tóxicas aos seres humanos (FRANKEL, 1993). Esta reação pode ser iniciada por diversos mecanismos relacionados à estrutura lipídica e ao meio onde se encontra, como grau de insaturação dos lipídios, temperatura, luz, presença de íons metálicos, oxigênio, pigmentos, entre outros (BERSET; COUVELIER, 1996; FRANKEL et al., 1994). Pode ocorrer tanto no processamento quanto no armazenamento, sendo sua determinação essencial para avaliação da estabilidade do produto (DOBARGANES; VELASCO, 2002).

Para a indústria de alimentos, estas alterações provocam grandes danos comerciais por isso houve um avanço na busca por novas tecnologias que auxiliam no aumento da vida de prateleira dos alimentos. Estas estão relacionadas à alteração de constituintes das embalagens, redução da porção de oxigênio em contato com o alimento, embalagens com atmosfera modificada, cuidados durante o processamento dos alimentos e a uso de antioxidantes (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999), sendo esta última a prática mais comum (CASTERA-ROSSIGNOL; BOSQUE, 1994).

Os antioxidantes são ativos capazes de retardar as reações de oxidação de compostos lipídicos (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002). Estes compostos podem ser obtidos de fontes sintéticas ou naturais e seu uso em alimentos, principalmente no caso dos sintéticos, é limitado pelo fato de serem potencialmente tóxicos a saúde quando adicionados em altas dosagens (HUDSON, 1990). Em consequência, na última década surgiram diversas pesquisas que objetivam a obtenção de antioxidantes de fontes naturais e sua avaliação quanto a capacidade de combater e sequestrar os radicais livres, além da possibilidade de sua aplicação nos alimentos. Dentre as fontes mais estudadas estão as frutas, que possuem em sua composição os compostos fenólicos, que além do poder antioxidante, apresentam atividade antimicrobiana, antialérgica, antitumorigênica, anti-inflamatória, anti-trombótica e efeitos cardioprotetores e vasodilatadores (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2001; ALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Apesar de todos os benefícios oferecidos pelos antioxidantes naturais, ainda há a necessidade de maiores estudos quanto sua forma de ação e aplicação nos alimentos, uma vez que, apesar da ação antioxidante comprovada, sua atividade específica em cada tipo de alimento pode ser diferenciada. Além disso, sua aplicação também pode provocar alterações organolépticas nos produtos. O presente estudo teve como objetivo produzir e avaliar a

atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos de frutos de *murtilla* (*Ugni molinae* Turcz.), e adicioná-los em sistema modelo a base de óleo de soja a fim de analisar seu efeito protetor frente à reação de oxidação.

4.2 Material e métodos

4.2.1 *Murtilla* e óleo de soja

As duas amostras estudadas são compostas por frutos de *murtilla*, uma por frutos silvestres e a outra por frutos pertencentes ao genótipo 14-4, proveniente do banco de germoplasma do INIA (Instituto de Investigações Agropecuárias) localizado na região da Araucanía (Temuco, Chile). Estas foram colhidas no dia 18 de abril de 2011 (38°, 45'S, 73° 21'O), sendo sua secagem procedida no dia 19 de abril de 2011 por meio de um secador de gabinete industrial (1,8m comprimento, 2,2 m altura, 3,5m profundidade), com temperatura constante de 70°C por 6 horas, com umidade inicial de 78,5% e umidade final de 5,4% (base seca). Após este processo, os frutos foram embalados a vácuo em embalagens com proteção à entrada de luz e oxigênio.

O óleo utilizado foi o óleo de soja refinado, isento de antioxidantes sintéticos, fornecido pela empresa Cargill (Mairinque, São Paulo, Brasil). Este foi recebido em latas de 18 kg, sendo em seguida porcionado em embalagens de 1,5 L e posteriormente congelado a -18°C até o momento do uso.

4.2.2 Processo de extração

Os extratos hidroalcoólicos foram produzidos em laboratório segundo a metodologia de Ribeiro et al. (2008) com algumas modificações.

Os frutos desidratados foram moídos e acondicionados em erlenmeyers de 250mL, aos quais foram adicionados uma proporção de 1:30 (1g amostra: 30mL solvente) com a mistura etanol:água (49,5%:50,5%, v/v). Em seguida, os erlenmeyers foram mantidos sob agitação em banho-maria durante 50 minutos com temperatura de 30°C.

Logo os extratos foram centrifugados a 2057 g durante 15 minutos e, posteriormente, filtrados em papel de filtro tipo Whatman n. 2 e armazenados sob refrigeração a 7°C em frascos âmbar, por até 1 mês.

4.2.3 Correlação da atividade antioxidante

4.2.3.1 Determinação de compostos fenólicos totais

O teor de composto fenólicos totais dos extratos de *murtilla* foi realizado em triplicata e determinado de acordo com o método espectrofotométrico de *Folin-ciocalteu*, descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999), utilizando o ácido gálico como padrão.

Os extratos hidroalcoólicos foram diluídos na mistura etanol:água na concentração 1:10 (v/v). Uma alíquota de 0,5mL da amostra diluída foi transferida para um tubo de ensaio adicionado 2,5mL da solução *Folin-ciocalteu*:água (1:10, v/v). A mistura foi agitada em vórtex seguida de repouso, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. Em seguida foram adicionados 2,0mL da solução de carbonato de sódio 4% (m/v), sendo a mistura novamente agitada e mantida em repouso por duas horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-1203 (Shimadzu, modelo UV1203) a 740nm. Uma amostra em branco foi preparada e analisada nas mesmas condições, sendo que os resultados foram calculados a partir da curva padrão com concentrações conhecidas (2,5 a 50µg/ml) de ácido gálico (Apêndice A). Os resultados foram expressos em mg de Ácido gálico (GAE) / g matéria seca.

4.2.3.2 Atividade antioxidante (DPPH)

A atividade antioxidante foi determinada segundo o método do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil) por Brand-Willians, Cuvelier e Berset (1995). Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5ml do extrato diluído em solução etanólica 80%, 3,0ml de etanol 99% e 0,3ml do radical DPPH 0,5 mM, diluído em solução de etanol:água (80:20, v/v).

Uma amostra em branco foi preparada substituindo-se o volume do extrato por igual volume de etanol 99%. Em seguida os tubos foram agitados e incubados durante 45 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV 1203) à 515nm. A atividade dos extratos foi determinada por meio da Equação (2) e em µmol TEAC/g fruta.

$$\% \text{ DPPH reduzido} = \frac{\text{Abs branco} - \text{abs amostra}}{\text{Abs branco}} * 100 \quad (2)$$

Foi utilizado o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) como padrão para a determinação da curva de calibração, nas concentrações de 0,01 a 0,1µmol (Apêndice B).

4.2.3.3 Atividade ABTS

A atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazoline-6-ácido sulfônico)] foi determinada conforme a metodologia descrita por Re et al.(1999) e Camargo et al. (2012).

O radical ABTS foi formado pela reação da solução de ABTS^{•+} 7mM com a solução de persulfato de potássio 140mM, incubados à temperatura de 25°C e no escuro durante 12-16 horas. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol P.A. até a obtenção do valor de absorbância de 0,700±0,020 a 734nm. A partir dos extratos, foram preparadas diluições em triplicata e em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 30µL de cada diluição do extrato para tubos de ensaio com 3,0mL do radical ABTS. A leitura foi feita utilizando um espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV 1203) após 6 minutos de reação, com o comprimento de onda de 734nm. Para o branco, foi utilizado etanol ao invés da amostra e a atividade dos extratos foi determinada por meio da Equação (3) e µmol TEAC/g matéria seca.

$$\% \text{ sequestro do radical ABTS} = \frac{\text{Abs branco} - \text{abs amostra}}{\text{Abs branco}} * 100 \quad (3)$$

Como referência utilizou-se o Trolox, um antioxidante sintético análogo à vitamina E, como padrão (Apêndice C).

4.2.4 Testes acelerados de oxidação

Para os testes acelerados em estufa e Rancimat, foram estabelecidos 10 tratamentos designados como Controle, 50, 100, 150 e 200mg kg⁻¹ de extrato hidroalcoólico de frutos de cada cultivar de *murtilla* (silvestre e 14-4) e 200mg kg⁻¹ de TBHQ, todos adicionados ao óleo de soja. O tratamento controle foi composto somente pelo óleo de soja refinado. Os resultados obtidos da análise de Compostos fenólicos totais (*Folin- ciocalteu*) procedida nos extratos foram utilizados como base para o cálculo das concentrações (mg kg⁻¹).

4.2.4.1 Estabilidade oxidativa em Rancimat

A estabilidade oxidativa do óleo de soja em todos os tratamentos foi determinada de acordo com o método Cd 12b-92 da American Oil Chemists' Society (AOCS, 2009), utilizando-se o equipamento Rancimat 743 (Metrohm AG, CH-9100 Herisau Switzerland).

Para a determinação do período de indução (PI), foram utilizados 5 gramas de óleo de cada tratamento para esta análise. Esses óleos foram submetidos à oxidação acelerada à

temperatura de 110°C e fluxo intenso de ar seco a taxa de 9L/h, conforme o método descrito. As amostras foram preparadas e conduzidas em duplicata. A atividade antioxidante foi expressa pelo Fator de Proteção (PF), utilizando a Equação (4):

$$PF = \frac{Pla * 100}{Plc} \quad (4)$$

Onde:

Pla = Período de indução do óleo com os extratos

Plc = Período de indução do controle (óleo sem extrato)

4.2.4.2 Teste de estufa ou *Schaal Oven Test*

Para cada ensaio, as amostras foram preparadas em triplicata, acondicionadas em béqueres de 50 mL e distribuídas aleatoriamente na estufa. A temperatura estabelecida foi de 63°C ± 2°C e, ao final de cada intervalo de tempo estabelecido (36, 72 e 96 horas), as amostras foram retiradas para a determinação do índice de peróxido, teor de ácidos graxos livres e absorvibilidade na região do ultravioleta.

4.2.4.2.1 Índice de Peróxido (IP)

O índice de peróxido foi determinado segundo o método Cd 8b-90 (AOCS, 2009). Os resultados foram expressos em meq O₂ kg de óleo⁻¹ e obtidos pela Equação (5):

$$IP = \frac{(N * (A - B) * 1000)}{m} \quad (5)$$

Onde:

N= normalidade da solução de tiosulfato de sódio

A= volume gasto para titular a amostra

B= volume gasto para titular o branco

m= massa da amostra (gramas)

4.2.4.2.2 Ácidos Graxos Livres (AGL)

O teor de ácidos graxos livres foi determinado de acordo com a metodologia Ca 5-40 (AOCS, 2009). Os resultados foram expressos em percentual de ácido oléico através da Equação (6):

$$AGL = \frac{V * 28,2 * N}{m} \quad (6)$$

Onde:

V= volume gasto de solução padronizada de hidróxido de sódio

N= normalidade da solução de hidróxido de sódio

m= massa da amostra (gramas)

4.2.4.2.3 Absortividade no Ultravioleta (UV)

A absorbância específica no comprimento de onda de 232nm foi determinada segundo a metodologia Ch 5-91 (AOCS, 2009). Os resultados foram expressos em $E^{1\%}_{1cm}$ e calculado por meio da Equação (7):

$$E^{1\%}_{1cm} = \frac{A}{C} \quad (7)$$

Onde:

A = absorbância no comprimento de onda 232nm

C = concentração da solução (g/100mL)

4.2.5 Delineamento experimental e análise estatística

Todas as medições foram procedidas em triplicata e os resultados expressos como média±desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise estatística por meio do software SAS (Statistical Analysis System) aplicando-se a análise de variância (ANOVA). Para a comparação das médias, utilizou-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Para a análise da correlação de compostos fenólicos totais, ABTS e DPPH, foi realizada análise de Correlação de Pearson ao nível de 5% de significância utilizando o programa estatístico SAS (Statistical Analysis System) (SAS INSTITUTE, 2000).

4.2.6 Resultados e discussão

4.2.6.1 Correlação dos compostos fenólicos totais com a atividade antioxidante

O controle da formação dos compostos de oxidação, hidroperóxidos e dienos conjugados se faz necessário em todo alimento visando garantir maior vida útil, além da segurança do consumidor. A melhor forma de retardar a formação destes compostos se dá

através da utilização de antioxidantes, que podem ser tanto de fontes sintéticas quanto naturais. As fontes naturais de antioxidantes vêm sendo incansavelmente estudadas principalmente pela tendência do mercado na exigência por produtos que, além de serem mais seguros, demonstram benefícios à saúde.

Atualmente não há um método oficial para a determinação da atividade antioxidante em produtos de origem vegetal, porque há diversos mecanismos antioxidantes que podem ocorrer, além da própria heterogeneidade de compostos ativos presentes no meio (SOUZA, VIEIRA, LIMA, 2011). Na literatura estão descritos diferentes métodos, cada um baseado em um princípio de ação diferente, desta forma este estudo buscou avaliar a propriedade antioxidante dos extratos dos frutos de *murtilla* utilizando três metodologias para que assim fosse possível inferir de forma segura se estes podem apresentar atividade antioxidante.

Para as análises de correlação, Rancimat e Teste de estufa foram realizadas duas análises de compostos fenólicos totais utilizando diferentes extratos produzidos. Cada análise foi procedida em períodos de tempo diferentes, o que impossibilitava a utilização do mesmo extrato, porém todos estes foram produzidos utilizando as mesmas amostras de *murtilla* desidratadas. Na correlação das análises de compostos fenólicos totais, DPPH e ABTS os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Teores de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos de frutos de *murtilla*

<i>Murtilla</i>	Compostos fenólicos totais ⁽¹⁾	Atividade Antioxidante			
		DPPH ⁽²⁾	%DPPH reduzido	ABTS ⁽²⁾	%Sequestro do radical ABTS
Silvestre	19,35±0,02	76,48±0,03	88,71±0,03	157,04±0,01	28,75±0,01
14-4	40,28±0,04	134,35±0,03	100,0±0,03	293,99±0,01	26,13±0,01

⁽¹⁾ mg GAE/g matéria seca

⁽²⁾ µmol TEAC/g matéria seca

Para a análise de compostos fenólicos totais, observou-se que o resultado do extrato da *murtilla* 14-4 apresentou aproximadamente o dobro dos fenólicos encontrados na variedade silvestre. O mesmo padrão também pôde ser observado nas análises de DPPH e ABTS. Isto pode ser explicado pela diferença já demonstrada nos teores de fenólicos é esperada quando comparadas variedades cultivadas e silvestres (TSAO et al., 2003).

Diversos pesquisadores reportaram diferenças no conteúdo de fenólicos totais e outros componentes antioxidantes quando avaliados diferentes cultivares. Wang e Lin (2000) compararam o conteúdo de fenólicos entre três cultivares de amora e cinco de framboesa e evidenciaram que há efeitos significativos da cultivar nos resultados obtidos. Sellappan e

colaboradores (2002) alegam que há diferenças no conteúdo de compostos fenólicos e na capacidade antioxidante entre diferentes cultivares de uma determinada espécie.

Scheuermann et al. (2008), por meio da extração aquosa de frutos de *murtilla*, encontrou $853 \pm 67,6$ mg GAE/100g de matéria seca. Este valor está abaixo do verificado neste estudo, porém é válido ressaltar que o autor procedeu a análise utilizando uma metodologia analítica diferente. Benvenuti e colaboradores (2004) analisaram diferentes cultivares de amoras (*Rubus fruticosus* L.) e framboesas (*Rubus idaeus* L.) e obtiveram valores em torno de 140,6 a 351,7 mg GAE/ 100g de fruta fresca, abaixo do encontrado nos frutos de *murtillas* analisados. Wang e Lin (2000) reportaram que as concentrações de compostos fenólicos totais em amora, framboesa e morango, de diferentes cultivares e graus de maturação, variam de 204 a 326, de 57 a 338 e de 91 a 279mg GAE/100g fruta fresca, respectivamente.

Rodrigues e colaboradores (2011) analisaram diferentes cultivares de mirtilo e obtiveram valores de 274,48 a 694,60 mg GAE/100g de fresca para fenólicos, 1.238,50 a 2.445,96 μmol TEAC/100g de fruta fresca para ABTS e 1.014,20 a 1,983,00 μmol TEAC/100g de fruta fresca para DPPH, valores aproximados aos obtidos dos extratos dos frutos de *murtilla* produzidos, mas apresentados em frutos desidratados.

Para a análise da atividade antioxidante total pelo método DPPH, os valores obtidos em μmol TEAC/g de matéria seca e em porcentagem foram 76,48 e 88,71% e 134,35 e 100% para a cultivar silvestre e 14-4, respectivamente. Takikawa et al. (2012) analisaram a capacidade antioxidante de extrato de frutas vermelhas e observaram valores de 86,12% para amora-preta, 94,66 para framboesa e 94,84% de DPPH reduzido para o morango. Copeti (2010) avaliou atividade antioxidante de duas cultivares de morango (*Fragaria x ananassa* Duch) e obteve valores de 1.101,54 a 1.800,46 μmol TEAC/100g de fruta fresca pelo método do DPPH e 1.472,72 μmol TEAC/100g de fruta fresca pelo método de ABTS.

Melo e colaboradores (2008) avaliaram a capacidade antioxidante de frutas *in natura* pelo método DPPH e classificaram em forte poder antioxidante (degradação >70% dos radicais DPPH) para acerola (*Malpighia emarginata* D.C.), moderado (entre 50 e 70%) para goiaba (*Psidium guajava*) e fraco (degradação <50%) para melancia (*Citrullus lanatus*).

Para a análise da atividade antioxidante total pelo método ABTS os valores obtidos em μmol TEAC/g de matéria seca e em porcentagem foram 157,04 e 28,75% e 293,99 e 26,13% para a cultivar silvestre e 14-4, respectivamente. Rufino (2008) avaliou a atividade antioxidante de frutas tropicais brasileiras não convencionais e obteve 64,4 para o açaí, 952,9 para acerola, 316,5 para jabuticaba e 165,9 μmol TEAC/g de fruta seca para a murta. Çekiç e Özgen (2010) avaliaram a capacidade antioxidante de framboesas vermelhas (*Rubus idaeus*

L.), silvestre e cultivada, colhidas em diferentes altitudes e obtiveram valores de 8,9 a 21,5 $\mu\text{mol TEAC/g}$ de fruta fresca pelo método de ABTS.

Analisando os resultados da Tabela 12, foi possível observar que apesar dos extratos apresentarem boa atividade antioxidante pelos dois métodos utilizados, os valores obtidos pelo sequestro do radical ABTS^+ foram superiores aos valores da análise de redução do radical DPPH. Isso pode ser explicado pelo fato de que alguns compostos antioxidantes podem reagir com radicais específicos, por exemplo, os ácidos fenólicos siríngico, vanílico e p-cumárico e a procianidina B3 não reagem com o radical ABTS^+ ; entretanto, apresentam elevada atividade antioxidante pelo método DPPH (VILLANO et al., 2007).

Floegel e colaboradores (2011) avaliaram o potencial antioxidante de 18 frutas, 13 legumes e 19 bebidas consumidas nos Estados Unidos e verificaram que a capacidade antioxidante detectada pelo método ABTS^+ foi expressivamente maior quando comparado com o ensaio DPPH. De acordo com os autores, os antioxidantes hidrofílicos e de alta pigmentação foram melhor mensurados pelo ensaio ABTS^+ , indicando que este método pode ser mais útil do que o DPPH.

Os coeficientes de correlação calculados para os fenólicos e a atividade antioxidante dos extratos encontram-se na Tabela 15. A atividade antioxidante apresentou correlação alta e positiva com o conteúdo de compostos fenólicos totais, sendo que a maior correlação foi verificada para o teste do DPPH e ABTS (ambos $R = 0,99$) para a cultivar 14-4.

Tabela 15 - Coeficientes de correlação de Pearson entre as determinações analíticas

Variáveis	Coeficiente de Correlação (R)	
	<i>Murtilla Silvestre</i>	<i>Murtilla 14-4</i>
Fenólicos x ABTS	0,96	0,99
Fenólicos x DPPH	0,95	0,99
DPPH x ABTS	0,98	0,99

Segundo Dancey e Reidy (2005), valores de coeficiente de correlação 0,1 a 0,3 são considerados fracos, para 0,4 a 0,6, moderados e 0,7 a 1,0 fortes. Quanto mais perto de 1,0, independente do sinal, maior é o grau de dependência estatística linear entre as variáveis analisadas, sendo que se torna possível afirmar que há semelhanças entre a distribuição dos valores das variáveis (FIGUEIREDO-FILHO; SILVA JUNIOR; BRITO, 2009).

Silva (2007) avaliou a capacidade antioxidante de diferentes cultivares de amora-preta, mirtilo e morango e verificaram que o teor de fenólicos totais correlacionou-se significativamente com a capacidade antioxidante, resultado semelhante encontrado por Cheel e colaboradores (2007) em morango e por Jiao e Wang (2000) em amora-preta.

Silva (2008) avaliou a correlação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante total pelo método DPPH em frutos de dezenove clones comerciais de aceroleira e obteve uma correlação positiva significativa a 1% de probabilidade (0,73). Rufino et al. (2010), ao analisarem a correlação entre os compostos fenólicos e atividade antioxidante total pelo método ABTS de dezoito frutas tropicais, obtiveram correlações positivas e significativas (0,92). Leong e Shui (2002), ao correlacionarem a capacidade antioxidante pelos ensaios ABTS⁺ e DPPH em 27 frutas comercializadas em Singapura, reportaram uma boa correlação ($R = 0,90$) entre a atividade antirradical livre em apenas 11. Thaipong et al. (2006) em avaliação da atividade antioxidante de extratos metanólicos de goiaba pelos ensaios ABTS⁺ e DPPH, obtiveram uma correlação significativa ($p = 0,85$) entre estes dois métodos. Leong e Shui (2002) reportaram a avaliação de onze frutas, dentre elas morango, obtiveram uma alta correlação entre os métodos ABTS e DPPH ($R = 0,9045$).

As Figuras 15, 16 e 17 ilustram a correlação existente entre os métodos de avaliação da capacidade antioxidante o que permite concluir que existe uma proporcionalidade entre os dois métodos podendo-se optar pelo uso de apenas um deles. Porém, é necessário ressaltar que os compostos presentes em cada cultivar influenciam a atividade antioxidante e favorecem para respostas diferentes de acordo com o método utilizado (CATANEO, 2008).

Figura 15 - Correlação da análise atividade antioxidante dos extratos dos frutos das *murtilhas* silvestre e 14-4

Figura 16 - Correlação do teor de compostos fenólicos totais com a atividade antioxidante do radical DPPH dps extratos dos frutos das *murtilhas* silvestre e 14-4

Figura 17 - Correlação do teor de compostos fenólicos totais com a atividade antioxidante do radical ABTS para as *murtillas* silvestre e 14-4

Diversos estudos apresentam a correlação entre a atividade antioxidante total e o teor de compostos fenólicos, sendo que estes são considerados os mais representativos dentre as substâncias bioativas com essa atividade (HEIM et al., 2002). Entretanto, o entendimento da contribuição dos fenólicos para a capacidade antioxidante de diferentes espécies de frutas e vegetais ainda é muito frágil e elementar (SILVA, 2007).

Alguns autores sugerem que a expressão da atividade antioxidante é consequência do sinergismo entre diferentes compostos fenólicos, não podendo ser atribuída especificamente a um constituinte (ARNOUS; MAKRIS; KEFALAS, 2001; LEE et al., 2003). Fukumoto e Mazza (2000), analisando a atividade antioxidante de compostos fenólicos, concluíram que esta cresce de acordo com o aumento no número de grupamentos hidroxila e diminuição de grupos glicosilados, entretanto se fazem necessárias investigações que identifiquem qual grupamento fenólico é responsável por exercer poder antioxidante em uma determinada fruta para que sejam elucidadas de forma precisa estas interações.

4.2.6.2 Estabilidade oxidativa em Rancimat

Para a análise de estabilidade oxidativa em Rancimat, os teores de compostos fenólicos totais, obtidos através da análise por *Folin-ciocalteu*, utilizados no cálculo das concentrações foram de 14,30 e 26,39 mg GAE/g matéria seca para a *murtilla* silvestre e 14-4, respectivamente. Após os cálculos, os extratos foram adicionados ao óleo de soja e submetidos à análise no equipamento Rancimat. Os resultados são apresentados nas Tabelas 16 e 17. Este é um teste de oxidação acelerada que mede a estabilidade de óleos e gorduras, detectando ácidos orgânicos voláteis formados durante a oxidação das amostras lipídicas que alteram a condutividade da água, sendo possível assim a determinação do período de indução pelo ponto de inflexão quando a condutividade aumenta de forma exponencial (KRISTOTT, 2000).

Tabela 16 - Período de indução dos tratamentos no equipamento Rancimat (controle, óleo adicionado de TBHQ e de extratos de frutos de *murtilla* silvestre)

Amostras	Período de Indução*
Controle	7,47±0,06c
<i>Murtilla</i> silvestre 50mg kg ⁻¹	7,37±0,02c
<i>Murtilla</i> silvestre 100mg kg ⁻¹	7,25±0,03c
<i>Murtilla</i> silvestre 150mg kg ⁻¹	6,65±0,07c
<i>Murtilla</i> silvestre 200mg kg ⁻¹	8,74±0,63b
TBHQ 200mg kg ⁻¹	21,27±0,49a

Médias das triplicatas ± desvio padrão

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 17 - Período de indução dos tratamentos no equipamento Rancimat (controle, óleo adicionado de TBHQ e de extratos de frutos de *murtilla* 14-4)

Amostras	Período de Indução*
Controle	7,47±0,06b
<i>Murtilla</i> 14-4 50mg kg ⁻¹	6,91±0,01bc
<i>Murtilla</i> 14-4 100mg kg ⁻¹	6,09±0,31cd
<i>Murtilla</i> 14-4 150mg kg ⁻¹	6,63±0,58bcd
<i>Murtilla</i> 14-4 200mg kg ⁻¹	5,84±0,36d
TBHQ 200mg kg ⁻¹	21,27±0,49a

Médias das triplicatas ± desvio padrão

*Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

O período de tempo necessário para o início da oxidação do controle foi de 7,47 horas, sendo que o tempo transcorrido até a formação dos compostos voláteis foi maior no óleo de soja adicionado do antioxidante sintético TBHQ (21,27 horas). Os extratos hidroalcoólicos de *murtilla* não demonstraram o mesmo desempenho que o antioxidante TBHQ nas condições do teste. No entanto, o tratamento contendo *murtilla* silvestre (200 mg kg⁻¹) apresentou bom resultado.

Os fatores de proteção obtidos para cada extrato estão expressos na Figura 18. Este fator é definido pela relação entre o período de indução e o controle calculado para os tratamentos, a partir da análise da estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado aos extratos.

Figura 18 - Fator de proteção obtido a partir da análise de estabilidade oxidativa (Rancimat) do óleo de soja adicionado de extratos de frutos de *murtilla* silvestre e 14-4

Médias das triplicatas estão indicadas. Letras diferentes indicadas nas colunas diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

O antioxidante sintético TBHQ (terc-butil-hidroquinona) foi submetido às mesmas condições das demais amostras, pois serviu como forma de comparação por ser um antioxidante largamente empregado pela indústria de alimentos na inibição da oxidação. Meza et al. (1999) avaliaram a estabilidade oxidativa de óleo de soja sem adição de antioxidantes e adicionado de 200 mg kg^{-1} de TBHQ e obtiveram períodos de indução de 6,24 e 21,70 horas, respectivamente, resultados estes bem próximos aos encontrados neste estudo. Angelo e Jorge (2008) avaliaram a estabilidade oxidativa de óleo de girassol sem adição de antioxidante sintético pelo método Rancimat e obtiveram um período de indução de 8,71 horas.

Prado (2009) avaliou o fator de proteção de extratos de abacaxi, acerola, manga, maracujá, melão, goiaba e pitanga, adicionados em óleo de soja, e observou que o extrato de acerola apresentou a maior proteção ao óleo (7,94 horas), sendo que os fatores de proteção encontrados foram de 1,02 a 1,13. Jardini e Mancini-Filho (2007) avaliaram a atividade antioxidante de extratos de romã pelo método Rancimat e obtiveram valores de porcentagem de inibição de 41,39 para o extrato alcoólico e 47,76 para o extrato aquoso.

O presente trabalho encontrou variações do período de indução de 6,09 a 8,74 horas entre os extratos, sendo que o fator de proteção variou de 0,78 a 1,17. Desta forma é possível afirmar que estes valores estão coerentes com os encontrados na literatura e análise da estabilidade antioxidante pelo método Rancimat pode ser usada como fator de proteção

indicativo para a seleção de antioxidantes quando é prevista uma exposição do óleo a altas temperaturas, como no caso de frituras.

4.2.6.3 Teste de estufa

Com o objetivo de avaliar da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras, na literatura estão descritos diversos métodos, cada um fornecendo informações sobre um estado em particular do processo oxidativo, que varia em função dos substratos lipídicos e das condições aplicadas (BERSET; CUVELIER, 1996; FRANKEL et al., 1994).

Para o teste de estufa os teores de compostos fenólicos totais, obtidos da análise por *Folin-ciocalteu* e utilizados no cálculo das concentrações foram de 14,30 e 26,39 mg GAE/g matéria seca para a *murtilla* silvestre e 14-4, respectivamente.

Tabela 18 - Índice de peróxido do óleo de soja controle, do adicionado dos extratos de frutos de *murtilla* silvestre e de TBHQ, submetidos ao teste de estufa

Tempo (h)	Índice de peróxido (meq O ₂ kg de óleo ⁻¹)*					TBHQ
	Controle	Silvestre 50mg kg ⁻¹	Silvestre 100mg kg ⁻¹	Silvestre 150mg kg ⁻¹	Silvestre 200mg kg ⁻¹	
0	0,20±0,00B	0,20±0,00D	0,20±0,00C	0,20±0,00C	0,20±0,00C	0,20±0,00B
36	0,60±0,00Bc	6,03±0,00Ba	2,01±0,00Bb	2,01±0,00Bb	1,51±0,50Cb	0,20±0,00Bc
72	6,09±1,05Ab	4,02±0,00Cc	4,02±0,00Ac	9,07±1,01Aa	4,03±0,00Bc	0,20±0,00Bd
96	6,21±0,05Ac	9,32±0,25Ab	5,04±1,01Ac	2,01±0,00Bd	13,09±1,01Aa	2,01±0,00Ad

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna ou da mesma minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 19 - Índice de peróxido do óleo de soja controle, do adicionado dos extratos de frutos de *murtilla* 14-4 e de TBHQ, submetidos ao teste de estufa

Tempo (h)	Índice de peróxido (meq O ₂ kg de óleo ⁻¹)*					TBHQ
	Controle	14-4 50mg kg ⁻¹	14-4 100mg kg ⁻¹	14-4 150mg kg ⁻¹	14-4 200mg kg ⁻¹	
0	0,20±0,00B	0,20±0,00C	0,20±0,00B	0,20±0,00C	0,20±0,00C	0,20±0,00B
36	0,60±0,00Bcd	1,51±0,50BCbc	3,02±1,01Aa	2,01±0,00BCab	2,01±1,16Bab	0,20±0,00Bd
72	6,09±1,05Aa	2,01±0,00Bcd	1,34±0,58Bcd	3,05±0,99Bcb	5,03±1,01Aab	0,20±0,00Bd
96	6,21±0,05Ab	9,07±1,01Aa	4,28±0,25Ac	5,03±1,01Abc	2,01±0,00Bd	2,01±0,00Ad

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna ou da mesma minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A determinação do Índice de peróxido (IP) é expressa em miliequivalentes de oxigênio ativo por kg de amostra graxa, representando a diferença entre a formação e a decomposição de peróxidos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). A titulação iodométrica baseia-se na oxidação do íon iodeto por hidroperóxidos (ANTOLOVICH et al., 2002) sendo que neste método, a solução saturada de iodeto de potássio é adicionada a amostra de óleo, o iodo é liberado e titulado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio utilizando o amido como indicador do ponto de viragem (ANTOLOVICH et al., 2002; KIRITSAKIS; KANAVOURAS; KIRITSAKIS, 2002). O IP é o método mais utilizado para a determinação

da concentração de peróxidos, pois por apresentarem uma natureza instável e intermediária, sendo altamente sensíveis à temperatura, o IP é um indicador aproximado do estado de oxidação da matéria graxa, particularmente na fase inicial de oxidação (WAŚOWICZ et al. 2004).

Na determinação do IP foi possível observar que em todos os tratamentos ocorreu um aumento gradativo deste índice no decorrer do tempo, sendo que o tratamento contendo o antioxidante sintético TBHQ apresentou os menores resultados, como esperado, visto que este composto é considerado o mais indicado antioxidante para óleo de fritura, por apresentar boa atividade protetora em altas temperaturas. Nenhum dos extratos, em nenhuma concentração, conseguiu conferir a mesma proteção que o TBHQ. Analisando os resultados dos extratos de *murtilla* silvestre (Tabela 18), pôde-se observar que no tempo zero, todos os tratamentos apresentaram o mesmo teor de peróxidos ($0,20 \pm 0,00$ meq O_2 kg de óleo⁻¹). No tempo de 36 horas ocorreu um aumento elevado deste teor, sendo que a concentração de 50 mg kg⁻¹ apresentou o maior valor ($6,03 \pm 0,00$ meq O_2 kg de óleo⁻¹).

Após as 72 horas de estufa, o teor de peróxido continuou aumentando, porém para o tratamento de 50 mg kg⁻¹ não foi observada esta linearidade, provavelmente devido à instabilidade dos hidroperóxidos sob temperaturas altas. Já no tempo de 96 horas o tratamento 150 mg kg⁻¹ apresentou a menor formação de peróxidos ($2,01 \pm 0,0$ meq O_2 kg de óleo⁻¹), mostrando-se estatisticamente semelhante ao resultado obtido pelo TBHQ ($2,01 \pm 0,0$ meq O_2 kg de óleo⁻¹), contudo também não demonstrou linearidade nos resultados, sendo que as causas podem ter sido as mesmas já citadas para o tratamento de 50 mg kg⁻¹. Para o de 200 mg kg⁻¹ o valor de peróxido ($13,09 \pm 1,01$ meq O_2 kg de óleo⁻¹) foi muito elevado e provavelmente associado à um possível efeito pró-oxidante dos compostos antioxidantes presentes no extrato. Com relação ao efeito protetor, a eficiência dos extratos foi classificada da seguinte maneira: 150ppm = TBHQ > 100 > Controle > 50 > 200 mg kg⁻¹.

Nos resultados obtidos com a adição dos extratos de *murtilla* 14-4 (Tabela 19) no tempo zero, todas as amostras também apresentaram o mesmo valor ($0,20 \pm 0,00$ meq O_2 kg de óleo⁻¹). Após 36 horas de permanência na estufa, todos os tratamentos apresentaram um aumento nos índices, sendo que a dose de 100 mg kg⁻¹ apresentou a maior índice de peróxido ($3,02 \pm 1,01$ meq O_2 kg de óleo⁻¹). No tempo 72 horas, apesar do contínuo aumento do IP, o TBHQ apresentou o mesmo valor das 36 horas e ocorreu um decréscimo no tratamento 100 mg kg⁻¹, as possíveis razões podem ser semelhantes à dos tratamentos que apresentaram a mesma característica. Após as 96 horas de estufa, 100 e 150 mg kg⁻¹ ($4,28 \pm 0,25$ e $5,03 \pm 1,01$ meq O_2 kg de óleo⁻¹, respectivamente) apresentaram os menores índices de peróxido e apesar

do 200 mg kg^{-1} ter demonstrado um valor muito abaixo dos demais, este não poderá ser considerado válido porque observou-se que ao invés de aumentar o IP do tempo 72 horas para o de 96 horas, ocorreu uma redução deste valor, provavelmente pela degradação dos peróxidos formados na amostra. Com relação ao efeito protetor, a eficiência dos extratos foi classificada da seguinte maneira: $\text{TBHQ} = 200^* > 100 = 150 > \text{Controle} > 50 \text{ mg kg}^{-1}$.

Em estudo comparativo sobre a eficiência dos antioxidantes TBHQ, BHT, BHA e PG adicionados ao óleo de soja e mantidos em estufa a 60°C , após 10 dias o TBHQ apresentou o maior efeito protetor, apresentando índice de peróxido de $4,57 \text{ meq O}_2\text{kg}^{-1}$ de óleo (TOLEDO; ESTEVES, HARTMANN, 1985). Luzia e Jorge (2009) avaliaram a atividade antioxidante de extrato de semente de limão (*Citrus limon*) adicionado em sistema modelo a base de soja, e obtiveram valores de índice de peróxido de $2,83 \text{ meq O}_2 \text{ kg de óleo}^{-1}$ após 3 dias a 60°C , sendo que para o TBHQ foi de $2,84 \text{ meq O}_2 \text{ kg de óleo}^{-1}$. Já Jorge et al. (2009) compararam o efeito protetor do extrato de semente de maracujá (500 mg kg^{-1} e 1.000 mg kg^{-1}) com antioxidante sintético BHT em óleo de soja a 60°C , e verificaram que as duas concentrações testadas foram capazes de reduzir a formação de peróxidos no óleo. Os autores alegam que quanto maior o tempo de aquecimento, maior a formação de peróxido em todos os tratamentos, situação observada no presente trabalho.

Gaméz-Meza et al. (1999) adicionaram extrato de bagaço de uva, nas concentrações de 0,1% e 0,3% de compostos fenólicos totais, BHA (0,02%) e TBHQ (0,02%) em óleo de soja submetido ao teste de estufa (60°C durante 21 dias) e observaram que as concentrações dos extratos não apresentaram diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$), entretanto apresentaram poder antioxidante mais alto que o BHA, porém menor que o TBHQ, podendo ser considerado uma alternativa de antioxidante natural. Caetano et al. (2009) avaliaram, por meio do teste de estufa (60°C), o efeito antioxidante de extrato hidroetanólico de bagaço de acerola em óleo de soja. Após sete dias foram produzidos $2,13 \pm 0,13 \text{ meq O}_2 \text{ kg de óleo}^{-1}$, resultado muito próximo ao encontrado neste estudo.

No Brasil as normas que regulamentam a adequação de óleo para o consumo, segundo a Portaria 482/99-ANVISA, estabelecem o máximo de $10,0 \text{ meq O}_2 \text{ kg de óleo}^{-1}$ de IP para o óleo de soja refinado (BRASIL, 1999). Neste trabalho somente o extrato de *murtilla* silvestre com 200ppm de fenólicos, após 96 horas, apresentou valor acima deste limite, sendo que todas as outras concentrações dos extratos das duas *murtillas* foram eficientes até o período de 96 horas. É possível concluir, com base nos resultados obtidos com a análise do IP, que o extrato de *murtilla* silvestre e da cultivar 14-4 preparados nas condições descritas neste trabalho, podem ser considerados fontes de antioxidantes naturais.

Tabela 20 - Ácidos graxos livres quantificados no óleo de soja controle, no adicionado dos extratos de frutos de *murtilla* silvestre e de TBHQ, submetidos ao teste de estufa

Tempo (h)	Ácidos graxos livres (%ácido oleico)*					
	Controle	Silvestre 50mg kg ⁻¹	Silvestre 100mg kg ⁻¹	Silvestre 150mg kg ⁻¹	Silvestre 200mg kg ⁻¹	TBHQ
0	0,07±0,00C	0,07±0,00B	0,07±0,00D	0,07±0,00D	0,07±0,00D	0,07±0,00C
36	0,15±0,00Bc	0,07±0,00Bd	0,15±0,00Cc	0,47±0,04Ca	0,36±0,00Cb	0,11±0,00Bcd
72	0,13±0,02Bc	0,79±0,01Ab	0,79±0,01Bb	0,89±0,02Aa	0,89±0,02Aa	0,07±0,00Cd
96	0,18±0,00Ad	0,80±0,00AcB	0,83±0,02Aa	0,81±0,00Bab	0,78±0,00Bc	0,15±0,00Ae

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna ou da mesma minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 21 - Ácidos graxos livres quantificados no óleo de soja controle, no adicionado dos extratos de frutos de *murtilla* 14-4 e de TBHQ, submetidos ao teste de estufa

Tempo (h)	Ácidos graxos livres (%ácido oleico)*					
	Controle	14-4 50mg kg ⁻¹	14-4 100mg kg ⁻¹	14-4 150mg kg ⁻¹	14-4 200mg kg ⁻¹	TBHQ
0	0,07±0,00C	0,07±0,00B	0,07±0,00C	0,07±0,00C	0,07±0,00C	0,07±0,00C
36	0,15±0,00Bc	0,07±0,00Bd	0,15±0,00Cc	0,24±0,04Bb	0,44±0,00Ba	0,11±0,00Bcd
72	0,13±0,02Bc	0,78±0,01Ab	0,79±0,01Bb	0,79±0,01Ab	0,83±0,01Aa	0,07±0,00Cd
96	0,18±0,00Ac	0,79±0,01Ab	1,43±0,07Aa	0,78±0,00Ab	0,81±0,00Ab	0,15±0,00Ac

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna ou da mesma minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

O percentual de ácidos graxos livres (AGL) é considerado um parâmetro relacionado à qualidade da matéria-prima, do processamento e das condições de conservação da matéria graxa (HUI, 1996). No processo de rancidez hidrolítica, ocorre a hidrólise da ligação éster pela ação da umidade ou da temperatura, resultando na produção de ácidos graxos livres (HUI, 1996). Portanto é importante na determinação quantitativa dos ácidos graxos livres para que assim seja possível estimar o grau de deterioração do produto (CECCHI, 2003).

Segundo a American Oils Chemists' Society (AOCS, 2009), a acidez em óleos vegetais pode ser determinada pela titulação ácido-base, podendo utilizar o NaOH como titulante e a fenolftaleína como agente indicador do ponto de viragem. O resultado desta análise é expresso em percentual (em peso) de ácidos graxos livres em relação a um ácido graxo específico, geralmente o ácido oleico, entretanto pode-se considerar qualquer outro ácido graxo predominante na amostra analisada (OSAWA; GONÇALVES, 2006).

Analisando o percentual de ácido oleico nos tratamentos com extratos de frutos de *murtilla* silvestre, observou-se que no tempo zero, todos apresentaram baixas porcentagens (0,07 a 0,47%), já após 36 horas na estufa, o percentual aumentou, sendo que o tratamento 150 mg kg⁻¹ apresentou o maior valor (0,47±0,04 % ácido oleico). No tempo de 72 horas os tratamentos 150 e 200 mg kg⁻¹ apresentaram os maiores percentuais sendo os dois foram

estatisticamente semelhantes ($0,89 \pm 0,02\%$ ácido oleico). Ao final das 96 horas de estufa, o óleo contendo o antioxidante TBHQ apresentou o menor valor ($0,15 \pm 0,0\%$ ácido oleico) sendo inferior ao controle ($0,18 \pm 0,00\%$ ácido oleico). Para os tratamentos de *murtilla* 14-4, também para o tempo zero todos os tratamentos apresentaram o mesmo índice de acidez, entretanto no tempo 36 horas ocorreu um aumento no qual o tratamento 200 mg kg^{-1} ($0,83 \pm 0,01\%$ ácido oleico) foi considerado estatisticamente diferente dos demais. Após as 72 horas, além do tratamento 200 mg kg^{-1} , os tratamentos 50, 100 e 150 mg kg^{-1} apresentaram valores muito altos de acidez ($0,78 \pm 0,01$, $0,79 \pm 0,01$ e $0,79 \pm 0,01\%$ em ácido oleico, respectivamente) sendo superiores ao controle ($0,18 \pm 0,00\%$ em ácido oleico).

Para todas as concentrações, tanto de extrato de frutos de *murtilla* silvestre quanto da 14-4 após as 72 horas de estufa, o percentual de ácido oleico foi elevado e isto pode ter ocorrido pelo fato dos extratos possuírem em sua composição 50,5% de água. Este resultado era esperado uma vez que o aumento da acidez indica o desenvolvimento de reações hidrolíticas com a produção de AGL, que são aceleradas pela presença de água e alta temperatura (CELLA; REGITANO D'ARCE; SPOTO, 2002).

Osawa e Gonçalves (2006) analisaram amostras comerciais de óleos de arroz, algodão, canola, girassol, milho e soja refinados e obtiveram valores de ácidos graxos livres de 0,028 a 0,096%, expressos em ácido oleico, resultados estes semelhantes ao encontrado neste estudo no tempo zero para o TBHQ. Coimbra, Del Ré e Jorge (2009) avaliaram o efeito protetor de extratos metanólicos de alho em óleo de soja, armazenados a 65°C . Após quatro dias obtiveram 0,11% ácidos graxos livres para as amostras de óleo de soja adicionadas de 1.500 e 2.000 mg kg^{-1} de extrato. Ravelli (2011) avaliou o efeito de extratos hidroalcoólicos etanol:água (80:20, v/v) de alecrim, sálvia, orégano, manjerona, tomilho, louro, cominho e endro em óleo de soja refinado e após 72h na estufa, obteve resultados que variaram de 0,09 a 0,10, valores aproximados aos encontrados neste estudo porém em diferente tempo.

De acordo com a Resolução RDC nº482, de 23 de setembro de 1999 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais, o valor máximo de acidez permitida é de 0,3% (BRASIL, 1993). Como após as 36 horas de permanência na estufa os resultados desta análise (exceto TBHQ e controle) se encontram acima deste valor, pode-se concluir que os extratos de *murtilla* silvestre e 14-4, produzidos a 30°C com 49,5% de etanol e 50,5% de água, propiciam o aumento da produção de ácidos graxos livres em óleo de soja refinado.

Tabela 22 - Absortividade no UV 232nm do óleo de soja controle, do adicionado dos extratos de frutos de *murtilla* silvestre e de TBHQ, submetidos ao teste de estufa

Tempo (h)	UV 232nm*					
	Controle	Silvestre 50mg kg ⁻¹	Silvestre 100mg kg ⁻¹	Silvestre 150mg kg ⁻¹	Silvestre 200mg kg ⁻¹	TBHQ
0	4,63±0,13D	4,63±0,13B	4,63±0,13C	4,63±0,13BC	4,63±0,13C	4,63±0,13A
36	3,60±0,25Cd	4,84±0,26Bbc	5,68±0,07Ba	4,49±0,43Cc	5,18±0,10Bab	4,29±0,09Bc
72	10,70±0,11Ba	5,27±0,36Bc	5,27±0,05Bc	7,26±0,23Ab	5,00±0,15BCc	4,31±0,05ABd
96	13,19±0,17Aa	9,26±0,73Ab	6,81±0,38Ac	5,18±0,01Bd	12,72±0,26Aa	4,32±0,20ABd

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna ou da mesma minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Tabela 23 - Absortividade no UV 232nm do óleo de soja controle, do adicionado dos extratos de frutos de *murtilla* 14-4 e de TBHQ, submetidos ao teste de estufa

Tempo (h)	UV 232nm*					
	Controle	14-4 50mg kg ⁻¹	14-4 100mg kg ⁻¹	14-4 150mg kg ⁻¹	14-4 200mg kg ⁻¹	TBHQ
0	4,63±0,13C	4,63±0,13C	4,63±0,13C	4,63±0,13B	4,63±0,13B	4,63±0,13A
36	3,60±0,25Dc	4,84±0,13BCabc	5,90±0,73Ba	5,09±0,10ABab	5,25±0,48ABab	4,29±0,09Bbc
72	10,70±0,11Ba	6,18±0,37Bb	5,61±0,24BCb	4,83±0,12Bc	4,82±0,42ABc	4,31±0,05AB
96	13,19±0,17Aa	9,21±0,66Ab	7,86±0,52Ac	5,60±0,37Ad	5,61±0,28Ad	4,32±0,20ABe

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna ou da mesma minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

A oxidação de ácidos graxos poliinsaturados promove a formação de hidroperóxidos e imediatamente após sua formação, as ligações duplas não conjugadas presentes nos lipídios insaturados sofrem um rearranjo gerando os dienos conjugados (GERTZ; KLOSTERNMANN; KOCHHAR, 2000), compostos estes que originam um pico de absorção a 230-235 nm na região do ultravioleta (UV) (SHAHIDI; ZHONG, 2005).

A análise espectrofotométrica na região do ultravioleta pode fornecer informações sobre a qualidade da amostra, seu estado de conservação, além das modificações provocadas pelos processos tecnológicos (REGITANO-D'ARCE, 2006). Os valores das absorbâncias são expressos como coeficiente de extinção ou absorbância específica $E^{1\%}_{1cm}$ (absortividade de uma solução de matéria graxa a 1% no solvente prescrito, em célula com passagem ótica de 1cm), segundo a metodologia da International of Pure and Applied Chemistry (IUPAC, 1979). De acordo com Regitano-d'Arce (2006), a análise de UV pode fornecer informações, em termos relativos, da auto-oxidação dos ácidos graxos absorvida em comprimentos de onda específicos na faixa do ultravioleta (232nm para os dienos conjugados).

Analisando os resultados da Tabela 22 observou-se que no tempo 36 horas todos os tratamentos, com exceção do controle ($3,60 \pm 0,25 E^{1\%}_{1cm}$), apresentaram altos valores de dienos conjugados. Após 72 horas de estufa todos exibiram um aumento no valor sendo que o controle expressou o índice mais elevado ($10,70 \pm 0,11 E^{1\%}_{1cm}$). Ao final das 96 horas de

estufa os tratamentos que demonstraram os maiores valores de dienos conjugados foram o controle, 200 e 50 mg kg⁻¹ (13,19±0,17; 12,72±0,26 e 9,26±0,73 E^{1%}_{1cm}, respectivamente). No decorrer do tempo o TBHQ demonstrou um efeito protetor contra a oxidação do óleo muito maior que os outros tratamentos. Entretanto considerando que o resultado apresentado pelo tratamento 150 mg kg⁻¹ foi estatisticamente semelhante ao TBHQ no tempo de 96 horas, é possível afirmar que nesta concentração o extrato de *murtilla*, produzido nas condições descritas por este trabalho, e adicionado na concentração de 150 mg kg⁻¹ em óleo de soja, apresenta um significativo poder antioxidante, retardando a reação de oxidação. Todos os tratamentos apresentaram valores que aumentavam gradativamente com o decorrer do tempo, entretanto as amostras 100 e 200 mg kg⁻¹ não exibiram esta linearidade devido possivelmente à influência da distribuição na disposição das amostras dentro estufa. Deste modo podemos afirmar que em relação ao efeito protetor a eficiência dos extratos foi classificada da seguinte maneira: TBHQ > 150 > 100 > 50 > 200mg kg⁻¹ > Controle.

Segundo a Tabela 23, no tempo 36 horas todos os tratamentos exibiram resultados muito próximos, porém o controle foi considerado estatisticamente o menor (3,60±0,25 E^{1%}_{1cm}). Após 72 horas na estufa observou-se um aumento na concentração de dienos conjugados, entretanto os tratamentos 150 e 200 mg kg⁻¹ exibiram uma redução destes compostos (de 5,09±0,10 para 4,83±0,12 e de 5,25±0,48 para 4,82±0,42 E^{1%}_{1cm}, respectivamente). No tempo de 96 horas, todos os tratamentos exibiram aumento no teor de dienos conjugados, sendo que o tratamento 150 e o 200 mg kg⁻¹ exprimiram valores bem próximos ao do TBHQ (5,60±0,37, 5,61±0,28 e 4,32±0,20, respectivamente). Deste modo, em relação ao efeito protetor, a eficiência dos extratos foi classificada da seguinte maneira: TBHQ > 150 > 200 > 100 > 50mg kg⁻¹ > Controle.

Anwar et al. (2010) avaliaram a atividade antioxidante de extratos metanólicos de três variedades de cevada na estabilização de óleo de girassol a 60°C, e 10 dias obtiveram resultados que variaram de 8,38±0,37 a 9,97±0,83 E^{1%}_{1cm}, valores bem acima dos encontrados neste estudo. Papuc, Nicorescu e Durdun (2009) avaliaram o efeito protetor de extrato de calêndula e espinheiro adicionado ao óleo de girassol, milho e soja e armazenado a 65°C. Os autores reportaram que a absortividade em 232nm foi progressiva com o passar do tempo para todos os óleos, sendo que os dois extratos testados induziram a diminuição da absortividade em 232nm, demonstrando seu efeito protetor. Anwar e colaboradores (2007) avaliaram o efeito de extratos hidrometanólicos de folha de *Moringa aloeifera* em óleo de girassol e obtiveram que a concentração de 600 mg kg⁻¹ exibiu o menor teor de dienos conjugados, refletindo maior proteção do extrato contra a oxidação. Coimbra, Del Ré e Jorge (2009)

relataram baixos valores de dienos conjugados na adição de extrato metanólico de alho (nas concentrações de 50mg/kg e 1500mg/kg) em óleo de soja refinado. Os valores obtidos dos extratos de *murtilla* silvestre e 14-4 na análise de UV apresentaram boa correlação com os dados obtidos da análise do IP, correlação está já observada por Almeida-Doria e Regitano d-`Arce (2000), Vieira e Regitano d-`Arce (1999), Ravelli (2011) e Shimano (2012).

4.3 Conclusões

Atualmente existem diversas metodologias para avaliar e quantificar os compostos produzidos pela oxidação em óleos e gorduras, entretanto é importante considerar que o método escolhido depende do tipo de amostra a ser analisada e do estágio de oxidação em si. Há uma grande necessidade da padronização dos métodos utilizados e dos resultados apresentados para possibilitar uma comparação mais fidedigna com os trabalhos citados por outros autores. É imprescindível elucidar que a comparação da estabilidade oxidativa e da eficiência do composto antioxidante em sistemas modelos lipídicos só será fiel quando forem consideradas as condições de oxidação utilizadas, o método analítico e o indicador de oxidação escolhido, sendo que cada método apresenta vantagens e desvantagens que devem ser consideradas no momento da seleção da metodologia.

Os extratos de frutos de *murtilla* analisados neste experimento demonstraram uma correlação positiva entre o conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante em sistema *in vitro*. Entretanto para estabelecer uma relação direta com cada composto fenólico em particular se faz necessário um estudo mais aprofundado. Quando adicionados em sistema modelo a base de óleo de soja refinado, os extratos demonstraram atividade protetora em comparação a outros estudos reportados na literatura. Embora os extratos não tenham atingido o grau de proteção do antioxidante sintético TBHQ, pode-se concluir que os extratos hidroalcoólicos de *murtilla* silvestre e 14-4, produzidos nas condições estabelecidas neste estudo, podem ser considerados fontes de antioxidantes naturais para aplicação em produtos ricos em lipídios.

Referências

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

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**, New York, v. 22, n. 9, p. 1041-1047, 2002.

ALMEIDA-DORIA, F.R.; REGITANO-D'ARCE, B.A.M. 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.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Antioxidant evaluation of coriander extract and ascorbyl palmitate in sunflower oil under thermoxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Berlin, v. 85, p. 1045-1049, 2008.

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.

ANWAR, F.; LATIF, S.; ASHRAF, M.; GILANI, A.H. *Moringa oleifera*: a food plant with multiple medicinal uses. **Phytotherapy Research**, Chichester, v. 21, p. 17–25, 2007.

ANWAR, F.; QAYYUM, M.A.; HUSSAIN, A.I.; IQBAL, S. Antioxidant activity of 100% and 80% methanol extracts from barley seeds (*Hordeum vulgare* L.): stabilization of sunflower oil. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 61, n. 3, p. 237-243, 2010.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 6th ed. Champaign, 2009. 1278 p.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F.R.; ORTUNO, A.; DEL RIO, J.A. Uses and properties of Citrus flavonoids. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. Barking, v. 45, p. 4505–4515, 1997.

BENVENUTI, S.; PELLATI, F.; MELEGARI, M.; BERTELLI, D. Polyphenols, anthocyanins, ascorbic acid, and radical scavenging activity of *Rubus*, *Ribes*, and *Aronia*. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 69, p. 164-169, 2004.

BERSET, C.; CUVELIER, M.E. Méthodes d'valuation du degree d'oxydation des lipids et de mesure du pouvoir antioxidant. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 16, n. 3, p. 219-245, 1996.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 482, de 23 de setembro de 1999. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Óleos e Gorduras Vegetais. **Diário Oficial da União**, Brasília, 13 out. 1999. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a2190900474588939242d63fbc4c6735/RDC_482_1999.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 04 abr. 2013.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria n. 795, de 15 de dezembro de 1993. Aprova as normas de identidade, qualidade, embalagem, marcação e apresentação do óleo e do farelo de soja. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 dez. 1993. Disponível em: <http://www.cisoja.com.br/index.php?p=portaria_norma&idPN=14>. Acesso em: 10 abr. 2013.

CAMARGO, A.C.; VIEIRA, T.M.F.S.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; CALORI-DOMINGUES, M.A.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G. Gamma radiation effects on peanut skin antioxidants. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 13, p. 3073-3084, 2012.

CASTERA-ROSSIGNOL, A.; BOSQUE, F. Nouvelle approche des anti-oxydants. **Oléagineux, Corp Gras, Lipides**, Paris, v. 1, p. 131-143, 1994.

CATANEO, C.B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L.V.; KUSKOSKI, E.M.; FEET, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 29, n. 1, p. 93-102, 2008.

CECCHI, H.M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos**. 2. ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 2003. 207 p.

ÇEKİÇ, Ç.; ÖZGEN, M. Comparison of antioxidant capacity and phytochemical properties of wild and cultivated red raspberries (*Rubus idaeus* L.). **Journal of Food Composition and Analysis**, London, v. 23, n. 6, p. 540-544, 2010.

CELLA, R.C.F.; REGITANO-D'ARCE, A.B.; SPOTO, M.H.F. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 111-116, 2002.

CHEEL, J.; THEODULOZ, C.; RODRIGUEZ, J.A.; CALIGARI, P.D.S.; SCHMEDAHIRSCHMANN, G. Free-radical scavenging activity and phenolic content in achenes from, *Fragaria chiloensis* ssp. , *F. vesca*, and *F. x ananassa* cv. Chandler. **Food Chemistry**, Barking, v. 102, p. 36-44, 2007.

COIMBRA, M.C.; DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Influência do extrato de alho na estabilidade oxidativa do óleo de soja refinado. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 56, n. 5, p. 547-550, set./out. 2009.

COPETTI, C. **Atividade antioxidante *in vitro* e compostos fenólicos em morangos (*Fragaria X ananassa* Duch): Influência da cultivar, sistema de cultivo e período de colheita**. 2010. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

DANCEY, C.; REIDY, J. **Estatística sem matemática para psicologia: usando SPSS para Windows**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 608 p.

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

FIGUEIREDO FILHO, D. B.; SILVA JUNIOR, J. A. Desvendando os mistérios do coeficiente de correlação de Pearson (r). **Revista Política Hoje**, Recife, v. 18, n. 1, p. 115-146, 2009.

FLOEGEL, A.; KIM, D.O.; CHUNG, S.J.; KOO, S.I.; CHUN, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, London, v. 24, p. 1043-1048, 2011.

FRANKEL, E.N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 4, p. 220-225, 1993.

FRANKEL, E.N.; HUANG, S.W.; KANNER, J.; GERMAN, J.B. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oil vs emulsions. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 42, p. 1054-1059, 1994.

FUKUMOTO, L.R.; MAZZA, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 8, p. 3597-3604, 2000.

GÁMEZ-MEZA, N.; NORIEGA-RODRÍGUEZ, J.A.; MEDINA-JUÁREZ, L.A.; ORTEGA-GARCÍA, J.; CÁZAREZ-CASANOVA, R.; ANGULO-GUERRERO, O. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompson grape bagasse. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Champaign, v. 76, n. 12, p. 1445-1447, 1999.

GERTZ, C.; KLOSTERMANN, S.; KOCHHAR, S.P. Testing and comparing oxidative stability of vegetable oils and fats at frying temperature. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v.102, n. 8/9, p. 543-551, 2000.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoids antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**. Stoneham, v. 13, p. 572-584, 2002.

HUDSON, B.J.F. (Ed.). **Food antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990. 317 p.

HUI, Y.H. **Edible oil and fat products**: processing technology. 5th ed. New York: John Wiley, 1996. 125 p.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives** 6th ed. Oxford: Pergamon Press, 1979. 170 p.

JARDINI, F.A.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes de romã (*Punica granatum* L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 137-147, jan./mar. 2007.

JIAO, H.; WANG, S.Y. Correlation of antioxidant capacities to oxygen radical scavenging enzyme activities in blackberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, p. 5672-5676, 2000.

JORGE, N.; MALACRIDA, C.R.; ANGELO, P.M.; ANDREO, D. Composição centesimal e atividade antioxidante do extrato de sementes de maracujá (*Passiflora edulis*) em óleo de soja. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 39, n. 4, p. 380-385, 2009.

KIRITSAKIS, A.K.; KANAVOURAS, A.; KIRITSAKIS, K. Chemical analysis, quality control and packaging issues of olive oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 104, p. 628-638, 2002.

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

LEONG, L.P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruit in Singapore markets. **Food Chemistry**, Washington, v. 76, p. 69-75, 2002.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 193-210, abr./jun. 2008.

OSAWA, C.C.; GONÇALVES, L.A.G. Evaluación de ácidos grasos libres presentes en aceites vegetales a través de kits rápidos y técnica potenciométrica de detección. **Aceites y Grasas**, Sevilla, v. 1, n. 62, p. 158-163, 2006.

PAPUC, C.; NICORESCU, V.; DURDUN, C. Evaluation of antioxidant activity of some plant extracts upon vegetal oils under thermal oxidation. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, Faisalabad, v. 3, n. 2, p. 157-164, 2009.

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

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; NOHYNEK, L.; MEIER, C.; KÄHKÖNEN, M.; HEINONEN, M.; HOPIA, A.; OKSMAN-CALDENTY, K.M. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 4, p. 494-507, 2001.

RAVELLI, D. **Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias: correlação entre parâmetros físicos-químicos e avaliação sensorial**. 2011. 113 p. 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 ABST radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REGITANO-D'ARCE, M.B.A. 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.

RIBEIRO, S.M.; BARBOSA, L.C.; QUEIROZ, J.H.; KNODLER, M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**, Barking, v. 110, n. 3, p. 620-626, 2008.

RODRIGUES, E.; POERNER, N.; ROCKENBACH, I.I.; GONZAGA, L.V.; MENDES, C.R.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de cultivares de mirtilo produzidas no Brasil. **Ciência e Tecnologia em Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 4, p. 911-917, out./dez. 2011.

RUFINO, M.S.M. **Propriedades funcionais de frutas tropicais brasileiras não tradicionais**. 2008. 263 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2008.

RUFINO, M.S.M., ALVES, R.E., BRITO, E.S., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F., MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, Barking, v. 121, p. 996–1002, 2010.

SCHEUERMANN, E.; SEGUEL, I.; MONTENEGRO, A.; BUSTOS, R.O.; HORMAZABAL, E.; QUIROZ, A. Evolution of aroma compounds of Murtilla fruits (*Ugni molinae* Turcz) during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, p. 485–492, 2008.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 8, p. 2432-2438, 2002.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Antioxidants: regulatory status. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Bailey's industrial oil and fat products**. 6th ed. New York: Wiley, 2005. v. 6, p. 57-102.

SHIMANO, M.Y.H. **Ação antioxidante de extratos de especiarias e suas misturas binárias e ternárias sobre a estabilidade oxidativa de óleo de soja**. 2012. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

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.

SILVA, R.S. **Potencial antioxidante correlacionado com fenóis totais e antocianinas de cultivares de amora-preta, mirtilo, morango e pêssego**. 2007. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

SILVA, W.S. **Qualidade e atividade antioxidante em frutos de variedades de aceroleira**. 2008. 137 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

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

SOUSA, M.S.B.; VIEIRA, L.M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de resíduos de polpas de frutas tropicais. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, p. 202-210, 2011.

TAKIKAWA, A.Y.; RAMPAZZO, V.; HAMINIUK, C.W.I. Estudo in vitro da capacidade antioxidante e compostos fenólicos de extratos de frutas vermelhas. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UTFPR, 17., 2012, Campo Mourão. **Anais...** Curitiba: Editora Frederico Westphal, 2012. Disponível em: <<http://conferencias.utfpr.edu.br/ocs/index.php/sicite/2012/paper/viewFile/977/398>>. Acesso em: 02 abr. 2013.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROSZEVALLOS, L.; BYRNE, D.H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, London, v. 19, p. 669-675, 2006.

TOLEDO, M.C.F.; ESTEVES, W.; HARTMANN, V.E.M. Eficiência de antioxidantes em óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 5, n. 1, p. 1-11, 1985.

TSAO, R.; YANG, R.; SOCKNOVIE, E.; ZHOU, T.; DALE, A. Antioxidant phytochemicals in cultivated and wild Canadian strawberry. **International Society of Horticultural Science**, Toronto, v. 616, p. 25-35, 2003.

VIEIRA, T.M.F.S.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. UV-Spectrophotometric evaluation of corn oil oxidative stability during microwave heating and oven test. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, n. 6, p. 2003-2006, 1999.

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; MOYÁ, M.L.; TRONCOSO, A.M.; GARCIA-PARRILLA, M.C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, New York, v. 71, n. 1, p. 230-235, 2007.

WANG, S.Y.; LIN, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 2, p. 140-146, 2000.

WĄSOWICZ, E.; GRAMZA, A.; HEŚ, M.; JELEŃ, H.H.; KORCZAK, J.; MAŁECKA, M.; MILDNER-SZKUDLARZ, S.; RUDZIŃSKA, M.; SAMOTYJA, U.; ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R. Oxidation of lipids in food. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, Olsztyn, v. 54, p. 87-100, 2004.

5 ANÁLISE SENSORIAL DE ÓLEO DE SOJA ADICIONADO DE EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE FRUTOS DE *MURTILLA* (*Ugni molinae* Turcz.)

Resumo

A reação de oxidação de óleos e gorduras é considerada uma das principais causas da perda da qualidade sensorial e nutricional dos alimentos. Esta reação pode ocorrer tanto no processamento quanto no armazenamento dos alimentos e sua maior implicação, além da produção de compostos tóxicos à saúde humana, é a formação de um odor característico conhecido como ranço. Para a indústria de alimentos a oxidação provoca grandes danos comerciais, pela alteração da cor, sabor, odor e textura do produto, ocasionando a redução da vida de prateleira e a rejeição por parte do consumidor. A fim de tentar reduzir/retardar este tipo de problema, a indústria lança mão de estratégias como o uso de compostos antioxidantes. Geralmente, estes compostos são de origem sintética e possuem uma série de restrições quanto ao seu uso. Nos últimos anos tem se dado uma atenção especial ao uso de antioxidantes de fontes naturais em alimentos, sendo que o maior desafio da utilização destes compostos é a comprovação da sua capacidade antioxidante e, não menos importante, que sua aplicação não altere as características organolépticas do alimento. Com a finalidade de auxiliar neste processo a análise sensorial se torna uma ferramenta útil avaliar se a adição do composto antioxidante de fonte natural terá uma boa aceitação por parte do consumidor. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar por meio do teste discriminativo, a aceitação da adição de extratos hidroalcoólicos de frutos de duas cultivares de *murtilla* em sistema modelo a base de óleo de soja comparando com o antioxidante TBHQ. Os tratamentos foram definidos como controle não oxidado, controle oxidado, *murtilla* silvestre 150 mg kg⁻¹, *murtilla* 14-4 150 mg kg⁻¹, *murtilla* silvestre 200 mg kg⁻¹, *murtilla* 14-4 200 mg kg⁻¹ e TBHQ 200 mg kg⁻¹. Foram analisados três tempos, o zero, o 72 e o 96 horas de estufa à 63±2°C. Os resultados demonstraram que não houve diferenças estatisticamente significativas da aceitação entre as concentrações dos extratos sendo que o TBHQ demonstrou a melhor aceitação. Contudo, considerando as observações feitas pelos provadores, é possível afirmar que após as 96 horas de estufa, o odor de ranço é mascarado pelo odor agradável da fruta, mesmo este não sendo predominante.

Palavras-chave: Análise sensorial; Extrato de frutos de *murtilla*; Oxidação lipídica; Teste discriminativo

Abstract

The reaction of oxidation in oils and fats is considered the second greatest cause of loss of sensory and nutritional qualities of foods, this reaction can occur in processing and in the storage of the product and its greater implication, besides the production of compounds toxic to human health, is the formation of a distinctive odor known as rancidity. For the food industry, oxidation causes significant commercial damage, because it changes the color, flavor, odor and texture of the product and there is reduction of shelf life and rejection by the consumer. In order to try to inhibit/reduce this kind of problem, the industry makes use of strategies such as the use of antioxidant compounds. Generally, these compounds are synthetic origin and due to this there is a series of restrictions on their use. In the recent year, it has given a special attention to the use of natural sources of antioxidants in food even the biggest challenge of the use of these compounds is the proof of its antioxidant capacity, and not least, the application will not alter the organoleptic characteristics of the food. In order to

assist this process the sensory analysis becomes a useful tool that evaluates if the addition of the antioxidant compound from natural sources will have a good acceptance by consumers. Therefore, the objective of this study was to evaluate through discriminatory test the acceptance of the addition of hydroalcoholic extracts from two cultivars of *murtilla*'s fruits in a model system based on soybean oil compared with the antioxidant TBHQ. The treatments were defined as control unoxidized, oxidized control, wild *murtilla* 150 mg kg⁻¹, 14-4 *murtilla* 150 mg kg⁻¹, wild *murtilla* 200mg kg⁻¹, 14-4 *murtilla* 200mg kg⁻¹ and TBHQ 200mg kg⁻¹. They were analyzed at three times, at zero, at 72 and at 96 hours of oven at 63±2°C. The results showed that there was no statistically significant difference among the concentrations of the extracts, and TBHQ showed a better acceptance. However, considering the comments made by the tasters is possible to affirm that after 96 hours of oven, the rancid odor is masked by the pleasant odor of the fruit even this is not predominant.

Keywords: Sensory analysis; Extract of *murtilla*'s fruits; Lipid oxidation; Discriminative test

5.1 Introdução

O odor dos alimentos pode sofrer alterações durante o processamento ou armazenamento, porque alguns compostos aromáticos podem ser perdidos e outros podem ser formados (WĄSOWICZ et al., 2004). Em alguns alimentos estas mudanças são consideradas desejáveis, porém em outros elas representam expressivas perdas na qualidade sensorial. Na reação da oxidação lipídica ocorre a formação de compostos voláteis com odor desagradável, considerados os maiores responsáveis pelas perdas comerciais na indústria de alimentos (GROSH et al., 1992). Logo, se faz necessária a determinação da estabilidade oxidativa dos produtos para que estas perdas sejam evitadas ou reduzidas. Segundo Coppin e Pike (2001) a manifestação do ranço pode ser determinada pela avaliação sensorial, permitindo a determinação do “período de indução sensorial” definido como o tempo necessário para que o ranço se torne ligeiramente perceptível por um painel sensorial.

A análise sensorial é definida como uma metodologia científica que tem a função de mensurar, analisar e interpretar as respostas dos provadores por meio dos cinco sentidos: visão, olfato, tato, paladar e audição (STONE; SIDEL, 1993). É considerada a mais fidedigna de todas as determinações, já que afere a percepção do consumidor e traduz sua aceitação relativa ao produto analisado (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Para a indústria de alimentos esta ferramenta é utilizada em diversas situações, como na avaliação da estabilidade de um produto durante seu armazenamento, no melhoramento de um produto já existente, na redução de custo e/ou de nova fonte de matérias-primas, no controle da qualidade, no desenvolvimento de novos produtos, na seleção e treinamento de provadores, na correlação das medidas sensoriais com medidas físico-químicas, entre outras (STONE; McDERMOTT; SIDEL, 1991). A análise sensorial também é considerada uma importante ferramenta na

detecção de *off-flavours* formados durante a oxidação lipídica, já que estes compostos indicam quando um alimento torna-se impróprio para consumo (GORDON et al., 2001).

Para sua realização é de fundamental importância que seja baseada em atributos definidos e praticada por provadores capacitados (YAMAMOTO, 2011), sendo o ideal trabalhar com uma equipe sensorial treinada e que este treinamento seja direcionado para o produto que se deseja conhecer ou melhorar (PEDRÃO; CORÓ, 1999). Deve ser procedida de forma que a coleta e a olfação das amostras sejam monitoradas no decorrer do tempo para que deste modo seja possível acompanhar a manifestação progressiva dos *off-flavours* (WAŚOWICZ et al., 2004).

Entretanto, esta análise não pode se estabelecer por si só como um método de controle, principalmente por apresentar diversos inconvenientes. A necessidade de identificar os odores desagradáveis demanda longo período de tempo, sendo que a sensação percebida não é única e se altera à medida que a oxidação avança (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1998). Embora diversos pesquisadores assegurem que a análise sensorial seja insubstituível para saber se um teste químico ou físico reflete a alteração das propriedades organolépticas (BERSET; CUVELIER, 1996), deve-se lembrar que a composição de um alimento influencia a percepção e que a sensibilidade de identificação da mesma difere de um indivíduo para o outro (FRANKEL, 1993; BERSET; CUVELIER, 1996). Logo, se faz necessária o uso de um conjunto de testes objetivos que se fundamentem na determinação das propriedades físicas e químicas do produto analisado.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Amostras de *murtilla* e óleo de soja

As duas amostras estudadas são compostas por frutos de *murtilla*, uma por frutos silvestres e a outra por frutos pertencentes ao genótipo 14-4, proveniente do banco de germoplasma do INIA (Instituto de Investigações Agropecuárias) localizado na região da Araucanía (Temuco, Chile). Estas foram colhidas no dia 18 de abril de 2011 (38°, 45'S, 73° 21'O), sendo sua secagem procedida no dia 19 de abril de 2011 por meio de um secador de gabinete industrial (1,8m comprimento, 2,2 m altura, 3,5m profundidade), com temperatura constante de 70°C por 6 horas, com umidade inicial de 78,5% e umidade final de 5,4% (base seca). Após este processo, os frutos foram embalados a vácuo em embalagens com proteção à entrada de luz e oxigênio.

O óleo utilizado foi o óleo de soja refinado, isento de antioxidantes sintéticos, fornecido pela empresa Cargill (Mairinque, São Paulo, Brasil). Este foi recebido em latas de

18 kg, sendo em seguida porcionado em embalagens de 1,5 L e posteriormente congelado a -18°C até o momento do uso.

5.2.2 Preparo dos extratos

Os extratos hidroalcoólicos foram produzidos em laboratório segundo a metodologia de Ribeiro et al. (2008) com algumas modificações.

Os frutos desidratados foram moídos e acondicionados em erlenmeyers de 250mL, aos quais foram adicionados uma proporção de 1:30 (1g amostra: 30mL solvente) com a mistura etanol:água (49,5%:50,5%, v/v). Em seguida, os erlenmeyers foram mantidos sob agitação em banho-maria durante 50 minutos com temperatura de 30°C.

Logo os extratos foram centrifugados a 2057 g durante 15 minutos e, posteriormente, filtrados em papel de filtro tipo Whatman n. 2 e armazenados sob refrigeração a 7°C em frascos âmbar, por até 1 mês.

5.2.3 Determinação de Compostos Fenólicos Totais

O teor de composto fenólicos totais dos extratos de *murtilla* foi realizado em triplicata e determinado de acordo com o método espectrofotométrico de *Folin-ciocalteu*, descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999), utilizando o ácido gálico como padrão.

Os extratos hidroalcoólicos foram diluídos na mistura etanol:água na concentração 1:10 (v/v). Uma alíquota de 0,5mL da amostra diluída foi transferida para um tubo de ensaio adicionado 2,5mL da solução *Folin-ciocalteu*:água (1:10, v/v). A mistura foi agitada em vórtex seguida de repouso, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. Em seguida foram adicionados 2,0mL da solução de carbonato de sódio 4% (m/v), sendo a mistura novamente agitada e mantida em repouso por duas horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-1203 (Shimadzu) a 740nm. Uma amostra em branco foi preparada e analisada nas mesmas condições, sendo que os resultados foram calculados a partir da curva padrão com concentrações conhecidas (2,5 a 50µg/ml) de ácido gálico (Apêndice A). Os resultados foram expressos em mg de Ácido gálico (GAE) / g matéria seca.

5.2.4 Adição dos extratos hidroalcoólicos em óleo de soja

Os resultados da análise de *Folin-ciocalteu* foram utilizados para os cálculos das concentrações, em mg kg⁻¹, dos extratos adicionados no óleo de soja. Foram definidos sete tratamentos, os quais são controle não oxidado, controle oxidado, 150mg kg⁻¹ de *murtilla*

silvestre, 150mg kg⁻¹ de *murtilla* 14-4, 200mg kg⁻¹ de *murtilla* silvestre, 200mg kg⁻¹ de *murtilla* 14-4 e 200mg kg⁻¹ do antioxidante sintético TBHQ. Após a adição dos extratos o óleo foi porcionado em béqueres de 50 mL e, em triplicada, foram aleatoriamente acondicionados em estufa sob uma temperatura de 63±2°C até a análise sensorial (exceto o tempo zero). Foram definidos três tempos de análise, tempo zero, 72 horas de estufa e 96 horas de estufa.

5.2.5 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada em cabines individuais no laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil. Foi realizado um teste discriminativo, por meio de um teste de escala não estruturada com 6 provadores treinados, que fazem parte do painel formado pelo Laboratório de Óleos e Gorduras da ESALQ/USP. Somente a característica de odor (ranço) foi avaliada com a utilização de uma escala não estruturada. Para o teste sensorial, 20 mL de cada tratamento foram distribuídos a 43°C (INSTITUTE OF FOOD TECHNOLOGY, 1981) em copinhos pretos de plástico para que não houvesse interferência quanto à coloração das amostras. Todos os recipientes foram preenchidos com quantidades iguais de óleo e etiquetados com números aleatórios de três dígitos. A análise foi realizada sob luz vermelha de acordo com a metodologia da American Society for Testing and Materials (ASTM, 1968). Foi utilizado um delineamento de blocos completos, balanceados, sendo que a ordem da apresentação das amostras foi diferente para cada consumidor.

A apresentação das amostras foi descrita em uma ficha controle (Figura 19) e os dados obtidos foram analisados estatisticamente. Foi solicitado aos provadores que fizessem observações para todas as amostras analisadas.

Nome: _____		Data: _____	
Por favor, avalie cada uma das amostras da bandeja, indicando com um traço vertical, o ponto da escala não estruturada de 9cm que melhor quantifique a intensidade do atributo.			
ODOR			
Ranço	Amostra	fraco	forte

OBSERVAÇÕES:			

Figura 19 - Ficha de aplicação do teste discriminativo

5.2.6 Delineamento experimental e análise estatística

Todas as determinações foram procedidas em triplicata e os resultados expressos como média. Os dados foram submetidos à análise estatística por meio do software SAS (Statistical Analysis System) aplicando-se a análise de variância (ANOVA). Para a comparação das médias, utilizou-se o teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

5.3 Resultados e discussão

Apesar das desvantagens que a análise sensorial apresenta como a dependência da experiência e capacidade do julgador, local da análise, estado emocional e a saúde do julgador, entre outros fatores, a utilização correta da metodologia resulta na obtenção de resultados reprodutíveis e precisos (CHAVES; SPROESSER, 2006). Os testes discriminativos ou de diferença são considerados métodos objetivos utilizados na análise sensorial de alimentos que minimizam os efeitos das opiniões dos indivíduos. Uma vez que mensuram atributos específicos pela discriminação, indicando por comparações se há ou não diferenças estatísticas entre as amostras (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). O teste de escala indica o tipo ou a intensidade de uma resposta sensorial, sendo que a escala não estruturada é demarcada por expressões quantitativas nas extremidades.

Para a análise sensorial, os teores de compostos fenólicos totais obtidos da análise por *Folin-ciocalteu* utilizados no cálculo das concentrações foram de 11,61 e 23,96 mg GAE/g matéria seca para a *murtilla* silvestre e 14-4, respectivamente. Os resultados obtidos da análise

das fichas sensoriais aplicadas estão apresentados na Tabela 24. O odor específico analisado foi o ranço, sendo que o traço vertical na ficha de resposta referente à nota de cada julgador foi transformado em escore, medido em cm, do comprimento da linha assinalada na ficha.

Tabela 24 - Escore do odor de ranço no óleo de soja refinado adicionado de extrato de frutos de *murtilla* silvestre e 14-4

Tempo	Amostras						TBHQ*
	Controle não oxidado*	Controle oxidado*	<i>Murtilla</i> silvestre 150mg kg ⁻¹ *	<i>Murtilla</i> 14-4 150mg kg ⁻¹ *	<i>Murtilla</i> silvestre 200mg kg ⁻¹ *	<i>Murtilla</i> 14-4 200mg kg ⁻¹ *	
0 horas	1,89Ab	2,97Aa	1,83Bb	1,84Cb	1,89Cb	2,10Cb	1,88Bb
72 horas	1,70Ad	2,68Ca	2,19Bb	2,63Ba	2,46Bab	2,71Ba	1,77Bcd
96 horas	1,67Ac	3,80Ba	3,60Aa	3,67Aa	3,61Aa	3,81Aa	2,53Ab

*Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna ou da mesma minúscula na linha não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Analisando os dados obtidos da análise no tempo zero, é possível observar que somente o controle oxidado apresentou um alto escore de ranço, sendo que os demais tratamentos não se diferenciaram estatisticamente. Após 72 horas na estufa, foi possível observar que os julgadores perceberam um leve odor de ranço, principalmente no controle oxidado, na *murtilla* 14-4 150 mg kg⁻¹, na silvestre e 14-4, ambas 200mg kg⁻¹. Pelas observações feitas pelos julgadores, apesar do leve odor de ranço, o odor da *murtilla*, misturada com um leve fundo de etanol foi detectado, sendo que este mascarou o ranço das amostras.

Já no tempo de 96 horas de estufa, observou-se que todas as amostras apresentavam um forte odor de ranço, sendo que todos os escores aumentaram, com exceção do controle, que não passou pelo processo de oxidação em estufa. No tempo de 72 e 96 horas, o TBHQ não apresentou nenhum odor característico de ranço, isto já era esperado porque este antioxidante sintético apresenta boa atividade protetora em altas temperaturas. Apesar dos extratos de frutos de *murtilla* não apresentarem boa proteção no Rancimat e no Teste de Estufa, já que o odor de ranço evidente demonstrou que ocorreu a oxidação lipídica no óleo de soja, é possível afirmar que estes extratos, por apresentarem um agradável odor da fruta, sua aplicação pode ser considerados apropriada em sistemas lipídicos.

A Figura 20 demonstra de uma forma mais explícita o aumento do escore do ranço com o passar do tempo dos óleos na estufa, já na Figura 21 pode-se observar a aceitação de cada amostra em cada tempo de análise.

Figura 20 - Relação entre a média do escore de ranço em cada tempo da análise sensorial

Figura 21 - Relação entre a média do valor de ranço para cada tratamento avaliado na análise sensorial. Letras diferentes indicadas nas barras diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Ravelli (2001) avaliou a preferência de óleo de soja adicionado de extrato hidroalcoólico de especiarias (alecrim, orégano, tomilho e sálvia) comparados com o TBHQ, e observou que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o óleo adicionado de cada especiaria com o do TBHQ não podendo comprovar a preferência em relação a um determinado óleo. Este resultado foi semelhante ao encontrado para os extratos de *murtilla*, sendo que o TBHQ demonstrou a maior aceitação por parte dos provadores treinados.

Deste modo, concluiu-se que somente o tratamento adicionado do antioxidante TBHQ apresentou maior preferência dentre os demais. Entretanto, considerando que o odor de ranço demonstrou ser mais evidente após as 96 horas de estufa, os extratos de *murtilla* auxiliaram mascarando-o, mesmo que não por completo.

5.4 Conclusões

A oxidação é uma reação muito difícil de ser controlada, principalmente em óleos e alimentos lipídicos submetidos a altas temperaturas por longo período de tempo. Para os extratos hidroalcoólicos de *murtilla* produzidos nas condições especificadas neste estudo e adicionados em duas concentrações diferentes em sistema modelo a base de óleo de soja, pode-se concluir que não houve aceitação por um extrato em particular, sendo que o óleo adicionado de TBHQ demonstrou o menor escore para ranço. Apesar de não apresentarem efeito antioxidante semelhante ao antioxidante sintético, os extratos contribuíram de modo a mascarar o odor de ranço no óleo de soja oxidado. Ainda se fazem necessários estudos adicionais empregando outras concentrações destes extratos para que assim seja estabelecida a mais eficaz contra a reação de oxidação.

Referências

BERSET, C.; CUVELIER, M.E. Méthodes d'valuation du degree d'oxydation des lipids et de mesure du pouvoir antioxidant. **Sciences des Aliments**, Paris, v. 16, n. 3, p. 219-245, 1996.

CHAVES, J.B.P.; SPROESSER, R.L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: UFV, 1999. 81 p.

COPPIN, E.; PIKE, O. Oil stability index correlated with sensory determination of oxidative stability in light-exposed soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Berlin, v. 78, n. 1, p. 13-17, 2001.

FRANKEL, E. N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science and Technology**, London, v. 4, p. 220-225, 1993.

GORDON, M. Measuring antioxidant activity. In: J. POKORNY, N.Y.; GORDON, M. (Ed.). **Antioxidants in food: practical applications**. Cambridge: Woodhead Publ., 2001. p. 71-84.

GROSCH, W.; WIDDER, S.; SEN, A. Changes in the flavour compounds of butterfat during storage. In: ROTHE, M.; KRUSE, H.P. (Ed.). **Aroma production and application**. Potsdam-Rehbrücke: Deutsche Institute für Ernährungsforschung, 1992. p. 147-154.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília: ANVISA, 2005. 999 p.

PEDRÃO, M.R.; CORÓ, F.A.G. Análise sensorial e sua importância na pesquisa de alimentos. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 1, n. 1, p. 85-89, out. 1999.

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

RIBEIRO, S.M.; BARBOSA, L.C.; QUEIROZ, J.H.; KNODLER, M.; SCHIEBER, A. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Brazilian mango (*Mangifera indica* L.) varieties. **Food Chemistry**, Barking, v. 110, n. 3, p. 620-626, 2008.

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.

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

STONE, H.; McDERMOTT, B.J.; SIDEL, J.L. The importance of sensory analysis for the evaluation of quality. **Food Technology**, Chicago, v. 45, n. 6, p. 88-95, 1991.

STONE, H.S.; SIDEL, J.L. **Sensory evaluation practices**. San Diego: Academic Press, 1993. 308 p.

WAŚOWICZ, E.; GRAMZA, A.; HEŚ, M.; JELEŃ, H.H.; KORCZAK, J.; MAŁECKA, M.; MILDNER-SZKUDLARZ, S.; RUDZIŃSKA, M.; SAMOTYJA U.; ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R. Oxidation of lipids in food. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, Olsztyn, v. 54, p. 87-100, 2004.

YAMAMOTO, B.L. **Análise descritiva quantitativa (ADQ) e teste de aceitabilidade na avaliação do frescor da tainha (*Mugil Liza*, Valenciennes, 1836)**. 2011. 170 p. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O controle da formação dos compostos da oxidação, hidroperóxidos e dienos conjugados, se faz necessário em todo alimento visando sua maior vida útil, além da segurança do consumidor. A melhor forma de reduzir ou mesmo retardar a formação destes compostos é pela utilização de antioxidantes, que podem ser tanto de fontes sintéticas quanto naturais, sendo que esta última vem sendo incansavelmente estudada principalmente pela tendência do mercado na exigência por produtos que, além de serem mais seguros, fazem bem a saúde.

Considerando as condições deste estudo, foi possível otimizar o processo de extração dos compostos fenólicos de *murtilla* utilizando etanol hidratado e avaliar sua atividade antioxidante em sistema modelo a base de óleo de soja. A metodologia de Superfície de Resposta foi muito importante para que fosse possível a identificação das condições de temperatura e volume de solvente ideal necessária para extrair a maior quantidade de compostos fenólicos totais dos frutos. Já as análises da atividade antioxidante e inibição da oxidação foram úteis para a definição de potencial aplicação dos extratos em alimentos.

Apesar dos resultados positivos, ainda se fazem necessários estudos complementares, em relação à composição fenólica do fruto, para que seja possível identificar qual composto presente em sua composição, apresenta o efeito antioxidante desejado. É necessário ressaltar que os resultados foram positivos para sistema modelo a base de óleo de soja, embora não tenha se atingido o grau de proteção oferecida pelo antioxidante sintético TBQH.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Figura 21 - Curva de calibração do ácido gálico

APÊNDICE B

Figura 22 - Curva de calibração do Trolox para análise de DPPH

APÊNDICE C

Figura 23 - Curva de calibração do Trolox para análise de ABTS