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

Potencial antioxidante de extratos de especiarias em sistemas modelo e
na estabilidade oxidativa do óleo de soja

Ana Paula Marques Pino Sichieri

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

**Piracicaba
2013**

Ana Paula Marques Pino Sichieri
Engenheira Agrônoma

**Potencial antioxidante de extratos de especiarias em sistemas modelo e na
estabilidade oxidativa do óleo de soja**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Prof. Dra. **MARISA APARECIDA BISMARA REGITANO D'ARCE**

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

**Piracicaba
2013**

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

Sichieri, Ana Paula Marques Pino

Potencial antioxidante de extratos de especiarias em sistemas modelo e na estabilidade oxidativa do óleo de soja / Ana Paula Marques Pino Sichieri.- - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2013. 125 p: il.

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

1. Oxidação lipídica 2. Antioxidantes naturais 3. Compostos fenólicos 4. Metodologia de Superfície de Resposta 5. Armazenamento I. Título

CDD 664.369
S565p

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

Aos meus filhos Laura (*in memoriam*) e Pedro Henrique, que me enchem de coragem e estímulo para continuar a lutar. A cada olhar sincero e sorriso verdadeiro faz a vida valer a pena. Amo vocês incondicionalmente.

DEDICO.

Aos meus pais Antonio Francisco e Sônia por acreditarem sempre em mim, e por todos os ensinamentos, carinho e apoio. Aos meus irmãos Lillian e Júnior pela amizade, amor e companheirismo. Ao meu esposo Carlos Eduardo por todos os momentos, e por sempre estar ao meu lado.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela dádiva da vida.

À minha família, minha base, amo demais vocês.

Aos meus filhos Laura Pino Sichieri (*in memoriam*) e Pedro Henrique Pino Sichieri, por me ensinarem o sentido da vida e por serem minha eterna fonte de inspiração. Tudo isso foi por vocês.

Aos meus pais, Antonio Francisco Pino e Sônia Regina Marques Pino por sempre me ensinarem a humildade, honestidade, a lutar pelos objetivos e por sempre acreditarem em mim. Vocês são um exemplo para mim, os melhores. Obrigada por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos. Meu eterno amor, admiração e gratidão.

A minha irmã Lilian Marques Pino por ser a precursora deste meu sonho. Você é um exemplo de luta e determinação para mim. Obrigada pelos conselhos, momentos de alegria e amizade.

Ao meu irmão Antonio Francisco Pino Júnior, por me ensinar que a vida pode ser mais fácil do que pensamos. Sua forma de viver e ver a vida são uma inspiração para mim. Obrigada pela amizade, carinho e estímulo.

Ao meu eterno namorado, esposo e amigo Carlos Eduardo Sichieri, pelo amor, carinho e por sempre estar ao meu lado. Meu eterno amor.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, lugar que eu amo e admiro e a todos os professores que contribuíram para minha formação profissional.

Ao laboratório de Óleo e Gorduras, por ser uma extensão da minha casa e onde eu sempre amei trabalhar.

À professora Dra. Marisa Aparecida Bismara Regitano d’Arce, minha querida mãe científica, obrigada pela formação profissional e também pessoal, pela confiança, dedicação, estímulo e amizade. Obrigada por sempre acreditar em mim! Meu eterno carinho, admiração e gratidão.

À professora Dra. Thaís Vieira pela contribuição e apoio.

À professora Dra. Carmen Contreras Castillo, não poderia deixar de agradecer o carinho que a Sra. teve comigo e por ter me ensinado muito durante um ano e meio que estivemos juntas.

À professora Dra. Marta Spoto, pela ajuda na parte da sensorial e por sempre me receber com carinho.

À Professora Dra. Silene Bruder por disponibilizar o laboratório e equipamentos.

As minhas meninas, como carinhosamente as chamo, Joseanne Rodella, Marcela Mattus e Tais Zucolo, pelo carinho, amizade, confiança, lealdade e principalmente pela valiosa contribuição. A ajuda de vocês foi determinante para a realização e conclusão deste trabalho. Meu eterno carinho, amizade e admiração.

À querida Doutora Naiane Sangaletti, pelos ensinamentos e ajuda na conclusão da superfície de resposta. Você não mediu esforços em me ajudar... Meu eterno carinho, gratidão e lealdade.

Ao professor Gerson Mourão e a mestranda Mayara Salvian pela indispensável ajuda na parte estatística.

À professora do Instituto Federal de São Roque Dra. Vânia Battestin Wiendh, pela ajuda indispensável na conclusão da superfície de resposta.

Ao Adriano de Camargo, pela grande ajuda na parte de DPPH e ABTS. Sua ajuda e ensinamento foram de grande valia. Muito obrigada!

Aos colegas do laboratório de Óleos e Gorduras, Samuel, Gabi, Larissa, Adriana, Grasi, Lucas, Gustavo, Yu, Richitier e Mariana pelos momentos de descontração, ajuda e carinho.

As queridas, Juliana Ruiz, Roberta Rizzo, Anna Cristina Zari, pelos momentos felizes que passamos juntas.

À Paula Porreli do laboratório de Frutas e Hortaliças, pela ajuda e paciência nos ensinamentos do SAS. Muito obrigada!

À Ana Paula Tiveron, Adna Prado Massarioli, Ivani Moreno e Keityane Boone Bergamaschi, do laboratório de Bioquímica e Análise Instrumental, por me acudirem e ajudarem com seus ensinamentos. Vocês são muito queridas.

Aos eternos amigos de laboratório Maria Fernanda de Almeida Prado, Aelson Brum, Aline Racanicci e Karen Piedade, vocês estiverem presentes nos momentos mais felizes e no mais triste da minha vida, obrigada pelos ensinamentos, ajuda, carinho, amizade. A amizade de vocês é muito importante para mim, carregarei todos eternamente em meu coração.

Aos funcionários Regina Marafon e Rodrigo (secretaria) e Fábio B. Rodrigues e Ana Paula Meneghetti da pós-graduação por sempre estarem dispostos a ajudar.

A todos os funcionários do LAN, sem exceção, pela ajuda prestada e amizade.

À Empresa Cargill pelo fornecimento do óleo para a realização desta pesquisa.

À CAPES pela concessão de bolsa de mestrado.

"A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita".

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Revisão bibliográfica.....	18
1.1.1 Óleo de soja e oxidação lipídica.....	18
1.1.1.1 Autoxidação.....	20
1.1.1.2 Fotoxidação.....	21
1.1.2 Antioxidantes.....	22
1.1.2.1 Antioxidantes sintéticos.....	25
1.1.2.2 Antioxidantes naturais.....	27
1.1.2.2.1 Compostos fenólicos.....	27
1.1.2.2.2. Especiarias e sua atividade antioxidante.....	28
1.1.2.2.2.1 Cravo.....	30
1.1.2.2.2.2 Canela.....	32
1.1.2.2.2.3 Pimenta dedo-de-moça.....	33
1.1.3 Métodos de extração.....	36
1.1.4 Metodologias de avaliação da atividade antioxidante in vitro.....	37
1.1.4.1 Método DPPH•.....	38
1.1.4.2 Método ABTS ^{•+}	38
1.1.5 Métodos para avaliação da oxidação.....	39
1.1.5.1 Índice de peróxido.....	40
1.1.5.2 Dienos conjugados.....	40
1.1.5.3 Estabilidade oxidativa pelo Rancimat.....	41
1.1.5.4 Índice de acidez.....	42
1.1.6 Embalagem.....	43
1.1.6.1 Embalagem de vidro.....	43

Referências	45
2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CRAVO, CANELA E PIMENTA DEDO-DE-MOÇA NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÓLEO DE SOJA.....	61
Resumo.....	61
Abstract.....	61
2.1 Introdução.....	62
2.2 Material e métodos.....	63
2.2.1 Preparo das especiarias.....	63
2.2.2 Processo de extração.....	64
2.2.3 Determinação do teor de compostos fenólicos.....	64
2.2.4 Atividade antioxidante pelo método DPPH.....	64
2.2.5 Atividade antioxidante pelo método ABTS.....	65
2.2.6 Delineamento experimental e análise estatística.....	65
2.3 Resultados e discussões.....	67
2.3.1 Superfície de resposta (RSM).....	67
2.3.1.1 Modelo Experimental para o cravo.....	68
2.3.1.2 Modelo Experimental para a canela.....	70
2.3.1.3 Modelo Experimental para a pimenta dedo-de-moça.....	73
2.3.2 Atividade sequestrante do radical livre DPPH e ABTS ^{•+}	75
2.4 Conclusão.....	77
Referências.....	78
3 USO DE EXTRATOS DE ESPECIARIAS E SEU EFEITO NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÓLEO DE SOJA.....	85
Resumo.....	85
Abstract.....	85
3.1 Introdução.....	86
3.2 Material e Métodos.....	87
3.2.1 Óleo de soja.....	87
3.2.2 Preparo das especiarias.....	87

3.2.3 Processo de extração e determinação do teor de compostos fenólicos totais.	88
3.2.4 Teste acelerado em estufa.....	89
3.2.5 Armazenamento.....	90
3.2.6 Índice de peróxido.....	90
3.2.7 Índice de acidez.....	91
3.2.8 Absortividade na faixa do ultravioleta (UV).....	91
3.2.9 Estabilidade oxidativa em Rancimat.....	92
3.2.10 Análise Sensorial.....	92
3.2.11 Análise Estatística.....	94
3.3 Resultados e discussões.....	94
3.3.1 Teste acelerado em estufa.....	94
3.3.2 Estabilidade oxidativa em Rancimat.....	101
3.3.3 Armazenamento.....	102
3.3.4 Análise Sensorial.....	115
3.4 Conclusões.....	121
Referências	122
4 Considerações Finais.....	125

RESUMO

Potencial antioxidante de extratos de especiarias em sistemas modelo e na estabilidade oxidativa do óleo de soja

A degradação oxidativa dos lipídeos é um fator preponderante que limita a vida útil dos alimentos, reduzindo suas qualidades nutricionais e organolépticas. A utilização de antioxidantes durante o processo de fabricação pode diminuir consideravelmente a extensão da oxidação lipídica, desencadeada pela reação de radicais livres. A crescente preocupação pelo consumo de alimentos mais saudáveis e livres de aditivos sintéticos tem recebido maior atenção pelas indústrias, que atualmente tem procurado por alternativas mais naturais, como o uso de antioxidantes provenientes de especiarias, como uma forma promissora de substituição dos compostos sintéticos. O objetivo deste trabalho foi estudar as condições de obtenção de extratos hidroalcoólicos de cravo (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum verum*) e pimenta dedo-de-moça (*Capsicum annuum*) e sua aplicação em óleos de soja refinado, armazenado em embalagens de vidro, em comparação com amostras adicionadas de antioxidante sintético TBHQ e amostras livres de antioxidantes (controle), durante sete meses, simulando a comercialização em supermercados. Foram verificados também as propriedades antioxidantes dos extratos de especiarias produzidos nas condições selecionadas através das metodologias de DPPH e ABTS. O estudo do efeito da temperatura de extração e do grau de hidratação do etanol sobre o rendimento de compostos fenólicos totais dos extratos destas especiarias foi realizado com aplicação de planejamento experimental e metodologia de superfícies de resposta. As condições para uma extração eficiente dos compostos fenólicos do cravo, da canela e da pimenta foram o emprego de etanol a 49,5 % (v/v). As melhores temperaturas estiveram entre 45 a 50 °C para o cravo e canela, e 60 °C para a pimenta. Os extratos de cravo, canela e pimenta dedo-de-moça preparados nas condições otimizadas, foram adicionados nas proporções de 50 mg kg⁻¹, 100 mg kg⁻¹, 150 mg kg⁻¹ e 200 mg kg⁻¹ às amostras de óleo de soja refinado e submetido a um teste acelerado em estufa a 65 °C juntamente com amostras adicionadas nas mesmas proporções de TBHQ e amostras isentas de antioxidantes (controle), para verificação da concentração mais eficiente no retardar a oxidação. Em seguida, após os resultados do teste de estufa, os óleos adicionados de 100 mg kg⁻¹ de extratos, TBHQ, e isento de antioxidantes foram acondicionados em embalagens de vidro transparente de 250 mL e armazenados sob condições de comercialização (incidência de luz fluorescente por 15 horas / 24 horas e 331,71 Lux). Os resultados de Índice de Peróxido, Acidez e Absortividade na faixa do ultravioleta evidenciaram que os extratos foram capazes de oferecer proteção antioxidante ao óleo de soja refinado em diferentes níveis, sendo que o tratamento adicionado de extrato de cravo foi o que mais se destacou na inibição da oxidação lipídica do óleo de soja, seguido do extrato adicionado de canela e pimenta (p<0,05).

Palavras-chave: Oxidação lipídica; Antioxidantes naturais; Compostos fenólicos; Metodologia de Superfície de Resposta; Armazenamento

ABSTRACT

Antioxidant activity of spices extracts in model systems and in the oxidative stability of soybean oil

Lipid deterioration is a major cause of shorter food shelf life, reducing its nutritional and organoleptical quality. The use of antioxidants during the manufacturing process can significantly decrease the extent of lipid oxidation reactions triggered by free radicals. The growing concern about the consumption of healthier foods and free from synthetic additives has received increased attention by the industry, which is currently looking for more natural alternatives, such as the use of antioxidants from herbs and spices, as a promising replacement of synthetic compounds. The objective of this work was to study the conditions for obtaining hydroalcoholic extracts of cloves (*Syzygium aromaticum*), cinnamon (*Cinnamomum verum*) and red pepper (*Capsicum annuum*) and its application in soybean oil refined, stored in glass containers, compared with samples added of synthetic antioxidant TBHQ and samples free antioxidant (control) during 7 months simulating marketing conditions in supermarkets. Extracts were analyzed by DPPH and ABTS methods. The study of the effect of extraction temperature and the degree of hydration of ethanol on the yield of total phenolic compounds of the extracts of these spices was carried out with application of experimental design and response surface methodology. The best solvent concentration for efficient extraction of phenolic compounds from clove, cinnamon and pepper was 49.5% ethanol (v / v). The best temperatures were between 45 and 50°C for cloves and cinnamon, and 60 ° C for pepper. The extracts of clove, cinnamon and red pepper prepared under optimized conditions were added in concentration of 50 mg kg⁻¹, 100 mg kg⁻¹, 150 mg kg⁻¹ and 200 mg kg⁻¹ to samples of refined soybean oil and subjected to an accelerated storage test at 65°C with samples containing the same concentrations of TBHQ and samples free of antioxidant (control) in order to check the most efficient concentrations to slow the oxidation. The best extracts concentration 100 mg kg⁻¹ from the Schaal oven test was added to oil packed in glass containers against oil with 100 mg kg⁻¹ of TBHQ, and oils free of antioxidants and stored under normal commercialization conditions (fluorescence light exposure for 15 hours / 24 hours and 333,71 Lux). Peroxide, acid values and absorptivity in the ultraviolet range showed that the extracts were able to offer antioxidant protection to soybean oil at different levels. Clove extract, showed the best performance in the inhibition soybean oil oxidation, followed by cinnamon and pepper (p<0,05).

Keywords: Lipid oxidation; Natural Antioxidants; Phenolic compounds; Response Surface Methodology; Storage

1 INTRODUÇÃO

Oxidação de lipídeos, que pode ocorrer durante a armazenagem de matérias primas, processamento térmico, e subsequente estocagem dos produtos finais, é uma das principais causas de rancidez em produtos alimentares. Este processo é iniciado pelo calor, radiações ionizantes, luz, metais de dupla valência, e leva a uma perda significativa do valor nutricional dos alimentos, uma vez que envolve perda de vitaminas e ácidos graxos essenciais. Também pode afetar a qualidade sensorial do alimento através de mudanças de cor, textura e sabor - o que reduz sua vida útil e pode resultar na rejeição por parte dos consumidores. Na indústria de alimentos, a taxa de auto-oxidação é reduzida através de refrigeração, congelamento, embalagem sob um gás inerte, embalagem impermeável ao oxigênio e embalagem a vácuo. Nos casos em que esses métodos não são, nem econômicos, nem práticos do ponto de vista nutricional e tecnológico, é altamente desejável a adição de antioxidantes na menor quantidade possível, com a finalidade de inibir ou controlar a oxidação lipídica nos alimentos. No entanto, os resultados de inúmeras pesquisas sobre as propriedades antioxidantes das diferentes substâncias ainda não identificaram qualquer composto que pode ser ativo em todos os produtos alimentares. Tal característica resulta de muitos fatores, como por exemplo, a estabilidade no tempo de processamento, capacidade de mistura e atividade nos diferentes sistemas lipídicos. Os antioxidantes sintéticos amplamente utilizados em alimentos são hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), galato de propila (PG) e tetrabutylhidroquinona (TBHQ). No entanto, devido à sua natureza instável, a maioria destes é muito sensível e volátil às altas temperaturas (VALENZUELA; NIETO, 1995), existe a preocupação acerca da sua segurança e eficiência (DAPKEVICIUS et al., 1998). Por conseguinte, tem ocorrido um interesse crescente na busca e utilização de antioxidantes naturais (DASTMALCHI et al., 2005): (a) numerosos estudos clínicos e epidemiológicos demonstraram que o consumo de frutas e vegetais está associado com redução do risco de ocorrência de doenças crônicas como câncer, cardiovasculares, distúrbios e diabetes: (b) potenciais efeitos nocivos do consumo crônico de antioxidantes sintéticos em alimentos e bebidas e: (c) a percepção dos consumidores de que os antioxidantes naturais são mais seguros do que seus análogos sintéticos. O resultado tem sido um crescente interesse em especiarias, plantas aromáticas e

medicinais como potenciais fontes de antioxidantes naturais para substituir antioxidantes sintéticos.

Desde o trabalho de Singh e colaboradores em 2005, muitos vegetais tem sido estudados como fontes de antioxidantes naturais. Dentre estes, muitas plantas aromáticas e especiarias têm se mostrado eficazes em retardar o processo de peroxidação lipídica (KULISIC et al., 2004). Essa ação deve-se principalmente aos compostos fenólicos existentes em sua composição, aumentando o interesse de se extraí-los para avaliar sua ação antioxidante em alimentos lipídicos.

Uma ferramenta muito útil no planejamento de experimentos para definir as melhores condições para obter extratos eficientes no retardamento oxidativo são os métodos estatísticos. Quanto mais eficiente se recuperarem os compostos fenólicos, melhor será sua caracterização e definição do seu emprego.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia de produção de extratos hidroalcoólicos de especiarias produzidos nas condições selecionadas através da metodologia de superfície de resposta, encontrar o melhor antioxidante natural dentre as estudadas e dosagem mais eficaz no teste de estufa para posterior armazenamento por 7 meses.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Óleo de soja e oxidação lipídica

Em 2012, o Brasil foi responsável por aproximadamente 29% da produção mundial de soja em grão, sendo o segundo maior produtor e exportador mundial de soja, depois dos Estados Unidos, o que torna o óleo de soja um dos mais produzidos e consumidos no país (ABIOVE, 2012; THE AMERICAN SOYBEAN ASSOCIATION, 2012). Em 2013, pela primeira vez, o Brasil será o maior produtor mundial de soja em grão (ABIOVE, 2013).

Os óleos vegetais são compostos principalmente de triacilgliceróis (TAG), além de tocoferóis, esteróis e vitaminas lipossolúveis, podendo apresentar também componentes que influenciam suas propriedades físicas e químicas como os diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG) e ácidos graxos livres (AGL) (CHEN et al., 2011). O óleo de soja possui em sua constituição, uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados como o oléico, linoléico (em maiores proporções) e linolênico (em menores proporções) (Tabela 1.1). Segundo REGITANO D'ARCE (2006), quanto mais insaturações presentes em óleos vegetais e alimentos lipídicos,

mais predisposto à oxidação, pois as duplas ligações simbolizam pontos reativos ao oxigênio.

Tabela 1.1 – Composição média em ácidos graxos do óleo de soja

Ácidos graxos	Nomenclatura	Composição (g/100g)
C<14		< 0,1
C 14:0	Mirístico	< 0,5
C 16:0	Palmítico	7,0 – 14,0
C 16:1	Palmitoléico	< 0,5
C 18:0	Estearico	1,4 – 5,5
C 18:1	Oléico	19,0 – 30,0
C 18:2	Linoléico	44,0 – 62,0
C 18:3	Linolênico	4,0 – 11,0
C 20:0	Araquídico	< 1,0
C 20:1	Eicosenoico	< 1,0
C 22:0	Behênico	< 0,5

ND – não detectável, $\leq 0,05\%$

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

A oxidação lipídica é a causa de maior importância na deterioração dos óleos e alimentos lipídicos (FRANKEL, 1998), catalisada tanto por enzimas como pela exposição à luz, radiações ionizantes, calor, íons metálicos (DAKER et al., 2008). Tal processo resulta em perda significativa de vitaminas e ácidos graxos essenciais, além de afetar a qualidade sensorial do alimento, através da mudança de cor, textura e sabor, reduzindo sua vida útil e provocando rejeição por parte dos consumidores (FERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2008) (Figura 1.1). Os produtos primários de oxidação compreendem os compostos de baixo peso molecular, que são voláteis indesejáveis (JUNG et al., 1998; LEE; MIN, 1998).

Figura 1.1 - Efeitos da oxidação lipídica sobre a qualidade dos alimentos

Fonte: Adaptado de Kolakowska (2003)

Na indústria de alimentos, a velocidade de auto-oxidação é reduzida através da refrigeração, congelamento, embalagem sob gás inerte, embalagens impermeáveis ao oxigênio e embalagem a vácuo (DAKER et al., 2008). Nos casos em que estes métodos não são nem economicamente nem nutricionalmente práticos no ponto de vista tecnológico, é de extrema importância controlar a oxidação através do uso de antioxidantes (GRAMZA et al., 2006).

O início da oxidação ocorre na ligação carbono-hidrogênio próxima à dupla ligação da cadeia de carbono e pode ocorrer através da ação de enzimas, ou por fotoxidação, termoxidação e auto-oxidação (ADAMS, 1999).

1.1.1.1 Auto-oxidação

O processo de auto-oxidação, se baseia na teoria de formação de radicais livres a partir dos ácidos graxos insaturados na ausência de antioxidantes que impeçam a perda de um íon hidrogênio de um carbono próximo à dupla ligação. É o principal mecanismo de deterioração lipídica podendo ser explicada através de três fases, sendo elas: iniciação, propagação e término, segundo modelo sugerido por Farmer (1942) e Belitz e Grosch (1999):

- Iniciação:

- Propagação:

- Término:

em que: RH – Ácido graxo insaturado

R• – Radical livre

ROO• – Radical peróxido

Figura 1.2 – Esquema geral da auto-oxidação lipídica

Fonte: Regitano-d'Arce (2006) adaptado de Farmer (1942), Bolland (1945), Belitz e Grosch (1999).

Graças à ação do calor ou de metais de dupla valência, o processo se inicia com a abstração de um átomo de hidrogênio da molécula do ácido graxo (radical livre). Na fase de propagação, há formação do radical livre peróxido, que ao reagir com outra molécula insaturada forma um hidroperóxido juntamente com um radical livre, sendo capaz de prosseguir a reação em cadeia. No término, ocorre a formação de espécies não-radicaais estáveis, através das reações dos radicais livres entre si. É nesta fase que o aroma característico de ranço nos alimentos lipídicos é produzido, devido à formação dos aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos e alcoóis (ALLEN; HAMILTON, 1994).

1.1.1.2 Fotoxidação

A fotoxidação é provocada pela presença de oxigênio em sua forma ativada a um estado energético mais alto.

A oxidação fotossensibilizada é uma reação direta da luz - ativa sobre pigmentos fotossensíveis que transferem a energia absorvida ao oxigênio tripleto, transformando-o em oxigênio singleto que reage diretamente sobre os ácidos graxos insaturados formando hidroperóxidos (Figura 1.3). Raws e Van Santen (1970)

demonstraram que o oxigênio singlete é formado na presença de um sensibilizador, como a clorofila ou feofitinas em óleos, e mioglobina nas carnes (LOVE, 1985). O sensibilizador tipo I serve como iniciador fotoquímico ativador de radical livre, e o sensibilizador do tipo II no estado triplete interage com o oxigênio por meio de transferência de energia para formar o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) que reage ainda com lipídeos insaturados. Sob condições de oxidação fotossensibilizadora, a reação dos lipídeos insaturados com o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) conduz rapidamente à formação de hidroperóxidos (FRANKEL, 1998; BRADLEY; MIN, 1992)

Onde:

${}^1\text{S}$ = sensibilizador no estado singlete

${}^1\text{S}^*$ = sensibilizador no estado singlete, excitado

${}^3\text{S}^*$ = sensibilizador no estado triplete, excitado

${}^3\text{O}_2$ = oxigênio triplete, estado basal

${}^1\text{O}_2^*$ = oxigênio singlete, estado excitado

Figura 1.3 - Oxidação induzida pela luz (fotoxidação)

Fonte: Regitano-d'Arce (2006) adaptado de Love (1985)

Como não há a formação de radicais livres, dificilmente o processo pode ser controlado pela adição de antioxidantes. Outros artifícios tecnológicos que barrem a exposição à luz UV, na presença desses pigmentos devem ser considerados.

1.1.2 Antioxidantes

Em alimentos lipídicos, os antioxidantes atuam com a finalidade de inibir o início da oxidação dos radicais livres. Estas substâncias podem estar presentes naturalmente nos alimentos, mas também ser deliberadamente adicionada aos produtos ou formada durante o processamento. Sua função não é melhorar a qualidade dos alimentos, mas sim mantê-la. Os antioxidantes para uso no processamento de alimentos devem ser de baixo custo, eficazes em baixas

concentrações, estáveis e capazes de resistir ao processamento, além de não interferir na cor, sabor e odor do produto final. A escolha do antioxidante é uma função da sua compatibilidade com o produto seguindo as normas regulamentares (GIESE, 1996).

Os antioxidantes não apenas prolongam a vida útil do produto, mas também reduzem o desperdício de matéria-prima, minimizam as perdas nutricionais e aumentam a gama de lipídios que podem ser usado em produtos específicos.

Os antioxidantes podem ser agrupados de acordo com seu mecanismo de ação: primários ou de quebra de cadeia e secundários ou preventivos.

Os antioxidantes primários possuem em sua constituição um núcleo fenólico, com diversas permutações no anel, e agem sobre os radicais livres. Pelo fato de serem melhores doadores de hidrogênio do que as moléculas lipídicas insaturadas, os antioxidantes primários doam átomos de hidrogênio aos radicais livres ($\text{ROO}\cdot$, $\text{RO}\cdot$ e $\text{R}\cdot$), o que os torna indisponíveis para a propagação da reação em cadeia. Assim, espécies inativas são geradas. O radical oriundo do antioxidante é estabilizado por ressonância e, devido a isso, apresentam reatividade baixa ($\text{A}\cdot$) (Figura 1.4). Exemplos dessa classe são os antioxidantes sintéticos butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propila (PG), e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) (RAMALHO; JORGE, 2006; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002).

Figura 1.4 - Mecanismo da atividade do antioxidante primário (AH é uma molécula de antioxidante)

Fonte: Wanasundara e Shahidi, 2005

Os radicais antioxidantes $\text{A}\cdot$ podem reagir $\text{A}\cdot + \text{A}\cdot$ formando dímeros AA (REISCHE et al., 1998).

Por não terem a capacidade de reverter a oxidação de óleos rançados, os antioxidantes para terem uma boa eficiência, devem ser adicionados o mais rápido

possível ao óleo ou ao processo (DORKO, 1994). Adicionar antioxidantes primários a um lipídeo que já apresenta grandes quantidades de peróxido pode representar perda da atividade antioxidante (BUCK, 1984).

Os antioxidantes secundários também são classificados como preventivos, e oferecem sua atividade antioxidante através de vários mecanismos a fim de retardar as reações de oxidação (Figura 1.5). A principal diferença em relação aos antioxidantes primários é que os secundários não convertem os radicais livres em moléculas estáveis. Eles agem como quelantes de metais pró-oxidantes desativando-os, doadores de átomos de hidrogênio a antioxidantes primários, desativadores do oxigênio singlete, supressores de oxigênio, absorvedores da radiação ultravioleta e são capazes de decompor hidroperóxidos em espécies não radicais. Frequentemente melhoram a atividade antioxidante dos antioxidantes primários (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992).

Os agentes sinérgicos são compostos que melhoram a ação dos antioxidantes primários. Podem ser compostos orgânicos e inorgânicos e, geralmente, possuem caráter ácido. Estes antioxidantes abrangem os ácidos cítrico, fosfórico, ascórbico e fosfolipídeos, e regeneram os antioxidantes primários, inativando íons metálicos pró-oxidantes ou inibindo a degradação dos hidroperóxidos, o que os torna eficientes por um tempo maior (LUNDBERG, 1962).

Figura 1.5 - Oxidação lipídica e a ação de antioxidantes

Fonte: Adaptado de Reische et al., 2002

1.1.2.1 Antioxidantes Sintéticos

Os antioxidantes sintéticos são usados pelas indústrias para estabilizar óleos, gorduras e alimentos lipídicos, e são principalmente compostos de natureza fenólica, sendo os mais utilizados o BHA, BHT, PG E TBHQ (Figura 1.6), podendo ou não ser usados em combinação (ESKIN; PRZYBYLSKI, 2001).

Muitos compostos são ativos como antioxidantes, porém, apenas alguns são incorporados em alimentos devido aos rígidos regulamentos de segurança. Geralmente, estes derivados fenólicos podem conter mais que um grupo hidroxila ou

metoxila. O etoxiquim é o único composto heterocíclico, sendo usado sobretudo em rações animais, cuja função é proteger os carotenóides (REISCHE et al., 2002). Em sua maioria são fenóis mono ou polihídricos com várias substituições no anel. A presença de uma estrutura de anel conjugado e grupos hidroxila permitem aos compostos fenólicos a capacidade de inibir e estabilizar os radicais livres (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992)

Figura 1.6 - Estruturas químicas de antioxidantes sintéticos

Fonte: Regitano-d'Arce (2006)

Por ser resistente a temperaturas altas e ser menos volátil no vapor do que o BHT e BHA, o TBHQ é o antioxidante primário mais eficiente, sendo muito bom para os processos de frituras (NAWAR, 1985; COPPEN, 1994; VALENZUELA; NIETO, 1996; REISCHE et al., 2002). Porém, devido à toxicidade dos antioxidantes sintéticos e à crescente preocupação por parte dos consumidores em adquirir alimentos que possuam apelos nutricionais e funcionais, a indústria de alimentos tem optado pelo uso de antioxidantes naturais como várias especiarias, ervas e suas frações isoladas.

Dentro deste cenário, a identificação de novas fontes de antioxidantes naturais e o isolamento de compostos vegetais de sementes, frutas, folhas e raízes têm sido observadas em trabalhos de diversos pesquisadores e cientistas nos últimos anos (CHANG et al., 1977; CHEVOLLEAU, et al., 1992; NAKATANI, 1992; PRATT, 1992; HETTIARACHCHY, et al., 1996; NAKATANI, 1997; XING; WHITE, 1997; MANCINI-FILHO et al., 1998; WETTASINGHE; SHAHIDI, 1999; SHAHIDI, 1994; MIRANDA; SATO; MANCINI-FILHO, 2001; RACANICCI et al., 2004; TRINDADE et al., 2005; PINO, 2009; RAVELLI, 2011; SHIMANO, 2012).

1.1.2.2 Antioxidantes Naturais

A prática do uso de partes de plantas (cascas, folhas, sementes) e seus extratos para conservar e evitar o desenvolvimento do sabor de ranço já vem sendo realizada desde a época pré-histórica (TSUJIMOTO, 1988; PRATT, 1995). Durante as últimas décadas, pesquisas intensivas têm sido realizadas com compostos antioxidantes naturais de fontes diferentes. O principal motivo destas pesquisas é a redução do uso de antioxidantes sintéticos devido aos seus potenciais efeitos negativos à saúde e maior conscientização e demanda dos consumidores por alimentos mais saudáveis.

Cravo-da-índia, canela, pimentas, alecrim, orégano, gengibre, sálvia, tomilho, manjerição, manjerona, menta, dentre muitos outros, têm sido estudados e sua eficácia na prevenção da oxidação lipídica é consequência da presença de diferentes compostos fenólicos na composição destas plantas. Tais compostos apresentam propriedades antioxidantes comprovadas em diversos sistemas-modelo, atuando na remoção de radicais livres, na quebra da cadeia da oxidação lipídica e também regenerando outros antioxidantes pela ação sinérgica (ANDERSEN et al., 2003). Além de possuir uma significativa capacidade antioxidante, a ingestão de muitos desses fitoquímicos está associada à baixa incidência de câncer (ZENG; WANG, 2001). Contudo, a composição dessas plantas pode variar de acordo com as condições de ambiente, solo, temperatura entre outros.

1.1.2.2.1 Compostos Fenólicos

Quimicamente, os compostos fenólicos podem ser definidos como substâncias que possuem a presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila, conferindo-lhe propriedades

antioxidantes. São sequestradores de radicais e, ocasionalmente, agem como quelantes de metais, atuando na etapa de iniciação e propagação do processo oxidativo. São classificados em ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos e cumarinas que são derivadas do ácido cinâmico (SHAHIDI et al., 1992).

Os compostos fenólicos de fontes vegetais se dividem em dois grupos, sendo eles os flavonóides e os não flavonóides, e ambos são metabólitos secundários presentes em vegetais (BURNS et al., 2001).

Os flavonóides possuem em sua composição as antocianinas, catequinas, flavonas, flavonóis, isoflavonas e proantocianidinas, e são produtos secundários do metabolismo das plantas. Vários flavonóides têm sua atividade antioxidante relacionada com sua capacidade de quelar metais. Também atuam como antioxidantes primários e sequestradores do ânion superóxido (ANDERSSON, 1996). Estes compostos são responsáveis pela atividade antioxidante encontrada em muitas plantas e extratos de especiarias. Compostos fenólicos são estruturalmente relacionados com flavonóides e servem como precursores de sua biossíntese (RAMIREZ, 1987).

Vegetais são excelentes fontes de compostos fenólicos, pois apresentam efeitos benéficos à saúde, como a redução da pressão arterial e incidências de redução de doenças cardiovasculares e câncer (AMES et al., 1993; ASCHERIO et al., 1992; BLOCK et al., 1992). Alguns compostos fenólicos são exclusivos para determinadas frutas, como por exemplo, os ésteres de ácido tartárico e cinâmico nas uvas (SIMON et al., 1992) e a flavanona glicosilada em frutas cítricas (LOUCHE et al., 1998; MARINI; BALESTRIERI, 1995; MOULY et al., 1994; OOGHE; DETAVERNIER, 1997).

1.1.2.2 Especiarias e sua atividade antioxidante

Estudos realizados em 1930 sobre as propriedades antioxidantes de vários tipos de especiarias mostraram que algumas inibiram a formação de peróxido em óleo de amendoim. A primeira patente para especiarias como antioxidante foi aprovada em 1938, especificando que seus óleos, tais como óleo de cravo, poderia evitar a oxidação em óleos comestíveis (MAVESTY, 1938).

A partir dos primeiros trabalhos de Chipault et al. (1952), que analisaram mais de 70 especiarias e ervas, o interesse em relatar suas atividades antioxidantes vêm aumentando consideravelmente, ampliando informações sobre os compostos e

mecanismos envolvidos. A Tabela 1.2 ilustra a importância do substrato utilizado para a avaliação da atividade antioxidante dos aditivos.

Tabela 1.2 - Eficácia antioxidante relativa de especiarias e ervas, avaliadas em diferentes substratos

Especiarias, ervas, chá	Substrato	Eficácia antioxidante relativa	Referências
Manjerona, noz-moscada, pimenta branca, alecrim, sálvia, coentro, pimenta preta	Banha de porco	Alecrim>sálvia> >noz-moscada >pimenta branca >manjerona	PALITZSCH et al., 1969
32 diferentes	Banha de porco	Alecrim>sálvia> >orégano>noz-moscada>tomilho	CHIPAULT et al., 1952
19 diferentes	Emulsão óleo em água	Cravo>canela> >sálvia>orégano	BISHOV et al., 1977
32 diferentes	Emulsão óleo em água	Cravo>açafrão> >pimenta>alecrim	CHIPAULT et al., 1955
10 diferentes	Emulsão óleo em água	Cravo>pimenta> >canela>noz-moscada>gengibre	AL-JALAY et al., 1987
Pimenta, páprica vermelha, segurelha, manjerona, pimenta preta, pimenta branca, coentro	Salsicha	Pimenta>pimentão vermelho>segurelha> >manjerona>pimenta preta	PALITZSCH et al., 1993
15 diferentes	Salsicha	Sálvia>alecrim> páprica>manjerona	GERHARDT & BÖHM, 1980
12 diferentes	Carne de frango moída	Manjerona>cominho> >pimenta>cravo	ABD EL-ALIM et al., 1999

Fonte: Yanishlieva et al., 2006

O alecrim e a sálvia foram os antioxidantes mais eficazes em banha (CHIPAULT et al., 1955; CHIPAULT et al., 1956; AGGARWAL et al., 2002). No entanto, em emulsão óleo-em-água, o cravo foi a especiaria mais eficiente

(CHIPAULT et al., 1955; BISHOV et al., 1977; AL-JALAY et al., 1987). De modo geral, os fatores de estabilização promovidos pelas especiarias em emulsões foram maiores do que na banha, indicando uma maior eficácia contra o processo oxidativo na emulsão (MADSEN, 1955).

Shahidi et al. (1995) relataram que a atividade antioxidante de cravo, gengibre, orégano, sálvia e tomilho em carne foi dependente da concentração adicionada destas especiarias, porém o cravo foi o mais eficaz, seguido pela sálvia e alecrim. O gengibre e o tomilho exerceram um efeito antioxidante menor.

Existem inúmeros estudos que confirmam a propriedade antioxidante dessas especiarias, e em alguns casos, comparável aos antioxidantes sintéticos (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000; LI et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; SHAN et al., 2005; SINGH et al., 2006; WONG; LEONG; KOH, 2006; SZABO et al., 2010).

1.1.2.2.2.1 Cravo (*Syzygium aromaticum*)

A espécie *Syzygium aromaticum*, pertence à família *Myrtaceae*, é uma planta arbórea, perene, uma copa de coloração bem verde, atingindo cerca de 12 – 15 m de altura, apresentando uma forma cônica quando jovem, tornando-se posteriormente cilíndrica. Suas folhas são ovais, persistentes e de coloração verde brilhante. Possui flores brancas agrupadas em inflorescências do tipo cacho e seus botões são colhidos quando sua cor muda de verde para carmim, sendo cuidadosamente dessecadas ao sol. Seu fruto é do tipo baga com formato alongado. Desenvolve-se em clima tropical e a propagação é feita através das sementes, preferindo solos ricos em nutrientes e matéria orgânica, úmidos e bem drenados. A árvore pode viver por até 100 anos, existindo registros de plantas que chegaram a 150 anos (HENDERSON, 1949; TIDBURY, 1949; PURSEGLOVE, 1968).

É nativa das ilhas Molucas, sendo conhecida no Brasil como craveiro, craveiro-da-índia e cravo (ROBBERTS, 1997; NEGRAES, 2003).

Figura 1.7 - Inflorescência (A) e botões florais secos (B) do *Syzygium aromaticum*

Segundo Robbers (1997) seu óleo é volátil e contém mais de 85% (v/v) de substâncias fenólicas totais, preponderando eugenol (70 a 95%) (Figura 1.8), acetato de eugenila e β -cariofileno, possuindo coloração incolor ou amarelo-claro, classificado como aromatizante, sendo muito utilizado nos casos de dispepsia, bronquite crônica e tratamentos dentários.

Ozcan e Arslan (2011) estudaram os efeitos antioxidantes dos óleos essenciais do cravo, canela e alecrim adicionados aos óleos de avelã e papoula armazenados a 50 °C no escuro. A atividade antioxidante aumentou em paralelo à concentração dos óleos essenciais, sendo que após 14 dias o cravo a 0,25% foi o que produziu o melhor resultado, seguido da canela com concentração de 0,50% e alecrim a 0,25%. Os óleos essenciais destas especiarias foram efetivos a 50 °C em comparação com o óleo sem adição de antioxidantes, porém quando comparados ao BHA (0,02%) os efeitos foram mais limitados.

A atividade antioxidante de algumas especiarias sobre o ácido linoléico emulsionado em fase aquosa foram investigadas por Farag et al. (1989a). O efeito antioxidante do cravo foi maior, seguido do tomilho, alecrim, cominho e sálvia.

Farag et al. (1989b) reportaram a atividade antioxidante de óleos essenciais de cravo e tomilho sobre o óleo de caroço de algodão, sendo que o cravo exibiu efeito superior em relação ao tomilho.

Figura 1.8 - Estrutura química do Eugenol

Fonte: PEREIRA, 2006

1.1.2.2.2 Canela (*Cinnamomum verum*)

A canela está entre as primeiras especiarias conhecidas utilizadas pela humanidade, sendo frequentemente relatada em escrituras pré e pós-bíblicas. Pertencente à família Lauraceae, a canela é nativa do Sri Lanka onde é cultivada em grande escala e exportada, sendo comercialmente usada a casca interna seca da árvore *Cinnamomum verum*. Foi largamente usada como mistura de embalsamento no Egito antigo, estando entre um dos materiais mais caros na Grécia e Roma antiga. Era componente de medicamentos recomendados para tosse, dor no peito, dor de cabeça e problemas de digestão e gases. Atualmente é encontrada no Continente asiático, Ilhas do Pacífico e na América Tropical (RAVINDRAN et al., 2004).

Cinnamon verum é uma árvore perene, que atinge uma altura de 8-17m, sendo que a casca e as folhas são fortemente aromáticas (figura 1.9) (PURSEGLOVE et al., 1981)

(A)

(B)

Figura 1.9 - (A) Árvore de *Cinnamon verum* e (B) casca seca de *Cinnamon verum*

A oleoresina da canela é obtida por extração com solvente e possui uma coloração marrom escuro, extremamente concentrado e viscoso, possuindo cerca de 50% ou mais de óleo volátil.

Sua disponibilidade ao longo do ano torna a canela ainda mais popular, sendo que sua casca ultimamente tem sido relatada por possuir potentes antioxidantes (SINGH et al., 2007; CHAN et al., 2012a), comparável ao dos antioxidantes sintéticos (MATHEW; ABRAHAM, 2006), com potencial promissor para melhorar a estabilidade oxidativa dos alimentos.

Chan et al. (2012) estudaram o potencial antioxidante da canela em almôndegas de frango em comparação com antioxidantes sintéticos (BHA e BHT) e ao ácido ascórbico. Tanto os valores de Índice de Peróxido quanto TBARS durante 12 dias de armazenamento refrigerado mostraram que o extrato aquoso da canela tem grande potencial em substituir antioxidantes sintéticos em modelos almôndegas de frango, sem afetar as propriedades sensoriais. O óleo essencial pode ser obtido das cascas, sendo rico em aldeído cinâmico (55%) (Figura 1.10) e eugenol (12%) e, das folhas, onde o eugenol (94%) é o componente marjoritário (FREIRE, 2008).

Figura 1.10 Estrutura química do Aldeído Cinâmico

Fonte: Freire, 2008

Além da capacidade antioxidante, o óleo da casca possui efeito antiespasmódicos, antisséptico, anti-inflamatório, antibacteriano, sedante e anti-hipertensivo (FREIRE, 2008).

1.1.2.2.3 Pimenta dedo-de-moça (*Capsicum annuum*)

Mais de 200 cultivares de *Capsicum* são cultivadas em todo o mundo, sendo consumidas como fruta fresca (Figura 1.11) ou em conserva, assim como as especiarias e os condimentos (CONTRERAS-PADILLA; YAHIA, 1998).

(A)

(B)

Figura 1.11 (A) Cultivar de pimenta dedo-de-moça (B) fruto pimenta dedo-de-moça

O conteúdo total de fenólicos solúveis na pimenta é entre 1180 e 3849 mg de ácido clorogênico equivalentes/Kg de peso fresco. Os flavonóides e os capsaicinóides são os fenólicos predominantes encontrados na pimenta (LEE et al., 1995; RACCHI et al., 2002). Pequenas quantidades de ácidos fenólicos tais como, protocatecuíco, ácidos clorogênicos, cumárico e ferúlico são também detectados. (CONTRERAS-PADILLA; YAHIA, 1998; ESTRADA et al., 2000).

O teor total de ácidos fenólicos diminui muito durante a maturação, de 215 mg/kg (14 dias após a maturação) a 73 mg/kg (42 dias após a floração) de peso seco (ESTRADA et al., 2000). Esta diminuição tem sido associada ao aumento do conteúdo de capsaicinóide (CONTRERAS-PADILLA; YAHIA, 1998).

A quercetina e luteína são os principais flavonóides encontrados nos frutos de pimenta (*Capsicum sp*), estando na forma glicosídica conjugada (IORIZZI et al., 2001; SUKRASNO; YEOMAN, 1993).

O gênero *Capsicum* contém um único grupo de compostos fenólicos, conhecido como capsaicinóides (figura 1.12), responsáveis pelo desencolvimento de pungência na fruta de pimenta, e sua qualidade é afetada pela sua cor, aroma e pungência (KIRSCHBAUM-TITZE et al., 2002a, b).

Figura 1.12 Estrutura química de alguns capsaicinóides

Fonte: Shahidi e Naczki, 2004

O conteúdo total de capsaicinóides nos frutos de pimenta varia de 189 a 778 mg/kg de peso fresco (CONTRERAS-PADILLA; YAHIA, 1998; KIRSCHBAUM-TITZE et al., 2002a, b; ROWLAND et al., 1983), sendo afetada pela espécie, época de crescimento, amadurecimento, e fatores ambientais como a luz, temperatura, além da suplementação de fertilizantes e o processamento após a colheita (CONTRERAS-PADILLA; YAHIA, 1998; ESTRADA et al., 1997, 1998, 1999a, b, 2000; GOVINDARAJAN, 1986; IWAI et al., 1979; JURENITSCH et al., 1979).

Guil – Guerrero et al. (2006) avaliaram a capacidade antioxidante de 10 variedades de pimentas, e concluíram que a atividade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•) mostrou que a capacidade antioxidante dos extratos de algumas variedades são comparáveis aos antioxidantes utilizados comercialmente.

Gorinstein et al. (2009) investigaram a capacidade antioxidante das pimentas verde e vermelha (*Capsicum annuum* L.), alho cru (*Allium sativum* L), cebolas branca, amarela e vermelha (*Allium cepa* L) e repolho branco (*Brassica oleracea* var. capitata f. alba) através das análises de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), CUPRAC (Copper Reducing Antioxidant Capacity) e ABTS (ácido 6-[2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolinil)] sulfônico). Concluíram que os extratos de cebola vermelha foram os que apresentaram maior

atividade antioxidante, seguido de cebola branca e vermelha, pimenta vermelha, alho e pimenta verde, que foram semelhantes e por fim o repolho branco.

Por ser um condimento muito utilizado no mundo todo, as pimentas têm sido objeto de estudo de diversos pesquisadores (SUN et al., 2007; OBOH et al., 2007; RAFFO et al., 2008; VEGA-GÁLDEZ et al., 2009; PARRILLA et al., 2011; PARK et al., 2012).

1.1.3 Métodos de quantificação extração

Efeitos nutricionais e sensoriais dos compostos fenólicos de alimentos tornaram-se alvo de estudos nos últimos anos. Porém, não existe nenhum método confiável para a quantificação de todos os compostos fenólicos que possam ser aplicados a todos os produtos alimentares. Além disso, nem todos os compostos fenólicos presentes em alimentos são de interesse nutricional e sensorial, pois, apesar de geralmente possuírem efeitos benéficos à saúde, eles podem também reduzir a disponibilidade de proteínas e minerais na dieta e afetar o sabor e cor dos alimentos.

Vários métodos de pesquisa para compostos fenólicos foram desenvolvidos e um grande número de resultados publicados (ANTOLOVICH et al., 2000; DESHPANDE et al., 1986; HAGERMAN et al., 1997; JACKMAN et al., 1987; MAKKAR, 1989; MARKHAM, 1975; PORTER, 1989; SCALBERT et al., 1989; SCALBERT, 1992; TEMPEL, 1982). Tais métodos podem determinar o conteúdo fenólico total ou quantificar um grupo específico ou classe de compostos fenólicos (SALUNKHE et al., 1989). A extração de compostos polifenólicos é influenciada pela sua natureza química, método utilizado, condição da amostra, o tempo e as condições de armazenamento, bem como o método de ensaio, seleção de padrões e presença de substâncias interferentes, tais como, ceras, óleos, terpenos e clorofilas. A solubilidade dos polifenóis é regulada pelo tipo de solvente (polaridade) utilizado, do grau de polimerização da interação com outros componentes alimentares e da formação de complexos insolúveis. Os solventes utilizados para a extração dos compostos polifenólicos incluem o metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila, propanol, dimetilformamida e suas combinações (ANTOLOVICH et al., 2000).

Diversos autores têm estudado a importância dos solventes na extração de compostos fenólicos. Em um estudo realizado com 32 ervas tradicionais chinesas os

extratos aquoso e etanólico (50%) foram os mais ricos em compostos fenólicos, identificados através dos métodos FRAP e ABTS, que melhor desempenho tiveram na determinação da atividade (LI et al., 2007).

Shimano (2012) estudou o efeito da temperatura e do grau de hidratação do etanol sobre o rendimento em compostos fenólicos totais dos extratos de alecrim, orégano, sálvia e tomilho. O alecrim e tomilho apresentaram uma extração eficiente dos compostos fenólicos com a utilização de etanol a 50 % e temperatura entre 45 a 50°C; o extrato de orégano, através do uso de etanol 40-50% e temperatura de 30 a 60°C, e o extrato de sálvia com etanol a 50% e temperatura de 57,5 a 60 °C.

O etanol e a água são os solventes mais aceitos pela indústria de alimentos, pois são mais seguros do que o metanol, acetona e outros solventes orgânicos (OKTAY; GÜLÇİN; KÜFREVIÖĞLU, 2003). Segundo Melo (2010), solventes mais polares, como por exemplo a água e o etanol, ou sua combinação, são muito eficientes na extração de compostos fenólicos.

1.1.4 Metodologias de avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

Vários métodos têm sido descritos e utilizados com base no fato de que os antioxidantes são sequestradores de radicais nas fases aquosa e lipídica. Os radicais utilizados não necessariamente precisam ser originados da oxidação lipídica. De um modo geral, duas abordagens são utilizadas: uma envolve a geração de uma espécie de radicais livres e a medição direta da sua inibição causada pelo composto em teste, tais métodos não requerem um substrato a ser oxidado; a outra utiliza sistemas de ensaio que envolvem a oxidação de um substrato, que é acoplado com os radicais livres gerados, o que é na verdade uma medição indireta. A capacidade de um composto em inativar os radicais livres que são gerados em um sistema modelo é extrapolada para o seu potencial como antioxidante em lipídeos e alimentos contendo lipídeos. Estes métodos são amplamente utilizados como triagem e comparação de pesquisas de prospecção de antioxidantes naturais, além de serem muito eficazes, fáceis e simples, porém devem ser interpretados com cautela (ANTOLOVICH et al., 2002).

Os métodos disponíveis para medida da capacidade antioxidante são vários, porém neste presente trabalho foram utilizados os métodos de DPPH• e ABTS^{•+}.

1.1.4.1 Radical DPPH•

É dos métodos mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante. Consiste em avaliar a atividade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), de coloração púrpura, que absorve em comprimento de onda de 516 nm (OLIVEIRA et al., 2009).

Blois et al. (1958) demonstraram que o radical α,α -difênil- β -picrilhidrazila (DPPH•) pode ser usado para determinar a atividade antioxidante do ácido ascórbico, tocoferol e quinonas. O DPPH em etanol mostra forte banda de absorção a 517 nm, além de ser um radical estável de coloração violeta escuro. O radical DPPH aceita um elétron ou um radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável, sendo reduzido perante a presença de antioxidantes e assumindo coloração amarela (Figura 1.13). Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica no comprimento de onda de 517 nm, que desaparece à medida que ele vai sendo reduzido pela molécula de hidrogênio que foi doada por um antioxidante (MENSOR et al., 2001).

Embora o DPPH seja um radical livre relativamente estável à temperatura ambiente, não é solúvel em água e o mecanismo de reação entre o antioxidante e o radical DPPH depende da conformação estrutural do antioxidante (BONDET, 1997).

Figura 1.13 - Reação química do radical DPPH e um antioxidante

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

1.1.4.2 Método ABTS^{•+}

O método ABTS^{•+} pode ser usado para avaliar a capacidade antioxidante de bebidas e alimentos (BENAVENTE-GARCÍA et al., 2000; VAN DEN BERG et al.,

2000). Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar a relação existente entre a capacidade antioxidante e a concentração de polifenóis (CASTILLO et al., 2000).

A metodologia ABTS, ácido 6-[2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolinil)] sulfônico , baseia-se na inibição, pela adição de antioxidantes, do cátion-radical $ABTS^{++}$, caracterizada pela absorção máxima de uma banda em 417 nm e absorções secundárias à 660, 734 e 820 nm. Para a medição da atividade antioxidante total (AAT) podem ser utilizados diferentes métodos que se baseiam na descoloração ou inibição da formação do cátion-radical $ABTS^{++}$.

Miller et al. (1993) foram os primeiros a sugerir a utilização deste método em testes de amostras biológicas, e atualmente é utilizada uma modificação deste método original, que foi proposto por Re et al. (1999), na qual o cátion-radical $ABTS^{++}$ é gerado pela adição de persulfato de potássio/amônio. Em seguida, o radical é misturado com o antioxidante, sendo que a porcentagem de inibição da absorbância a 734nm é calculada em função da concentração dos antioxidantes. O grau de inibição obtido tem relação com o produzido por referências de concentração conhecida de um análogo sintético da vitamina E (ácido (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-cromonil) fórmico) ou Trolox. Esta comparação permite rotular o método de "TEAC"- Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Trolox.

O radical $ABTS^{++}$ pode ser dissolvido em água ou em soluções de etanol, portanto pode ser usado na medição da atividade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos. A ação do cátion-radical $ABTS^{++}$ sobre os antioxidantes pode ocorrer pela doação de átomos de hidrogênio, pela transferência de elétron ou pela combinação destes dois mecanismos (RICE-EVANS et al., 1996).

1.1.5 Métodos para medição da Oxidação

Existem diversas metodologias disponíveis para medir a oxidação lipídica em alimentos. As alterações nas propriedades químicas, físicas ou organolépticas de óleos e gorduras durante a oxidação podem ser monitoradas para avaliar a extensão da deterioração lipídica. No entanto, não existe um método uniforme e padrão para detectar todas as modificações oxidativas nos alimentos. Os métodos disponíveis para monitorar a oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos podem ser divididos em dois grupos. O primeiro grupo mede as alterações oxidativas primárias (Valor de Peróxido, Oxigênio Ativo e Dienos Conjugados), e o segundo determina as

alterações secundárias que ocorrem em cada um dos sistemas (Valores de TBARS, Índice de Estabilidade do Óleo – Método Rancimat, Valor Oxirano, Valor de p-Anisidina, Valor Totox, Carbonilas, Hidrocarbonetos e produtos fluorescentes).

1.1.5.1 Índice de Peróxido

O método clássico para a quantificação de hidroperóxidos é a determinação do valor de peróxido. O teor de hidroperóxido, geralmente referido como valor de peróxido, é determinado por um método iodométrico. Este método se baseia na redução do grupo hidroperóxido (ROOH) com o íon iodeto (I^-). A quantidade de iodo (I_2) liberada é proporcional à concentração de peróxido presente. O iodo liberado é avaliado por titulação com uma solução padrão de tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$), utilizando um indicador de amido.

As principais desvantagens deste método são a absorção do iodo no local das insaturações do ácido graxo e a liberação de iodo do iodeto de potássio pelo oxigênio presente na solução a ser titulada (GRAY, 1978). Os resultados também podem ser afetados pela estrutura e reatividade dos peróxidos, bem como a temperatura e tempo da reação. O método iodométrico para determinação do valor de peróxido é apropriado a todos os óleos e gorduras, mas é razoavelmente empírico, e qualquer modificação na conduta pode prejudicar os resultados. Apesar disto, é um método oficial da AOCS.

1.1.5.2 Dienos Conjugados

A oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados é acompanhada por um aumento na absorção ultravioleta do produto. Lipídeos contendo dienos não conjugados ou polienos mostram mudança na posição da dupla ligação durante a oxidação, devido à isomerização e à formação do conjugado (LOGANI; DAVIES, 1980). Os dienos conjugados resultantes apresentam intensa absorção em 234 nm, similarmente trienos conjugados absorvem em 268 nm. Farmer e colaboradores (1942) detectaram que o aumento da absorção devido à formação de dienos e trienos conjugados é proporcional ao consumo de oxigênio e formação de peróxidos durante as fases iniciais de oxidação. Shaihidi et al. (1994) e Wanasundara et al. (1995) reportaram boa correlação entre dienos conjugados e o valor de peróxido de óleos vegetais durante sua oxidação. Estes autores concluíram que o método de dieno conjugado pode ser usado como índice da estabilidade dos lipídeos no lugar

ou juntamente com o valor de peróxido. No entanto, óleos que contêm carotenóides podem atribuir elevado valor de absorbância a 234-236 nm, devido à presença de duplas ligações na estrutura conjugada dos carotenóides. Este método é mais rápido e simples do que a determinação do índice de peróxido, pois não depende de reações químicas ou do desenvolvimento de cor, e requer menor tamanho da amostra. Porém, compostos que absorvem na mesma região podem interferir com as tais determinações.

Vieira e Regitano-d'Arce (2001) relataram comportamento semelhante em relação à boa correlação entre os resultados de dienos conjugados e os valores de peróxido em óleo de canola. Almeida-Doria e Regitano-d'Arce (2000) haviam observado esta mesma tendência ao submeter ao teste de estufa óleo de soja adicionado de extrato de especiarias.

1.1.5.3 Determinação da estabilidade oxidativa pelo Rancimat[®]

A determinação da estabilidade oxidativa pelo Rancimat[®] é um método acelerado comumente usado para avaliar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. Este método baseia-se no princípio de que o envelhecimento e rancificação de um óleo ou gordura é acelerada pelo oxigênio a uma temperatura elevada constante. Neste método, o ar é borbulhado constantemente através da amostra a temperatura de 98 °C – 110 °C, e compostos de segunda quebra dos peróxidos (ácido fórmico) são quantificados indiretamente pela mudança na condutividade da água. Colocados em gráfico contra o tempo, o período de indução é determinado a partir da tangente da curva em início de processo de aceleração (KRISTOTT, 2000).

A Figura 1.14 representa o esquema do Rancimat[®]

Figura 1.14 - Rancimat®

Fonte: Adaptado de Jain e Sharma (2010)

1.1.5.4 Índice de Acidez

Por definição, o índice de acidez é o número de miligramas de hidróxido de potássio para neutralizar os ácidos graxos livres em um grama de óleo, sendo um parâmetro comum nas especificações de óleos e gorduras (MEHLENBACHER, 1960). Um aumento na quantidade de ácidos graxos livres em uma amostra de óleo ou gordura indica que o triglicerídeo sofreu hidrólise, na ligação de éster entre glicerol e ácido graxo. Essa reação ocorre devido à presença de água e calor ou da enzima lipase, indicando processamento ou condições de armazenamento desfavoráveis à manutenção da integridade da molécula. Além dos ácidos graxos livres, a hidrólise dos triglicerídeos produz glicerol e compostos intermediários da quebra total, como mono e diacilgliceróis (KRISHNAMURTY, 1982; MEHLENBACHER, 1960).

O método oficial para determinar ácidos graxos livres em óleos e gorduras é baseado na titulação em solução alcoólica, utilizando fenolftaleína como indicador, sendo o resultado expresso em % de ácidos graxos livres (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY – AOCS, 2003).

As desvantagens desta metodologia são semelhantes aos métodos que utilizam solventes orgânicos (em volume e toxicidade), como a necessidade de aquecer os meios de reação, a solubilidade incompleta do óleos/gordura, a necessidade de pré-neutralização do solvente etanol, a grande quantidade de amostras a ser usada, e a possibilidade de erro em detectar o ponto de viragem da cor do indicador (KARDASH; TUR'YAN, 2005).

1.1.6 Embalagem

A qualidade do óleo pode ser fortemente influenciada pela luz, oxigênio, temperatura e presença de metais pesados, sendo importante levar em consideração estes fatores para selecionar os materiais de embalagem.

A maioria dos estudos de vida útil tem sido avaliações comparativas entre o tipo de óleo e diferentes materiais. Portanto, a estabilidade do óleo pode ser melhorada pelo emprego de embalagens adequadas. Óleos de girassol armazenados no escuro tiveram vida útil duas vezes maior do que os expostos à luz constante por 12 horas diárias (RAMIREZ et al., 2001)

É fundamental que a embalagem para óleo vegetal comestível atue no controle dos parâmetros que afetam a estabilidade oxidativa, sendo boa barreira ao oxigênio, à umidade e à radiação, especialmente na faixa do ultravioleta. Também é importante que a tampa da embalagem impeça o vazamento do produto, garantindo ao sistema de embalagem ao menos a mesma barreira ao oxigênio concedida pelo corpo da embalagem, além da resistência à carga vertical e ao colapso, que pode vir a ocorrer devido ao consumo de oxigênio residual no interior da embalagem (OLIVEIRA, 2006)

1.1.6.1 Embalagem de vidro

Os recipientes de vidro são amplamente utilizados para o engarrafamento de azeites em particular. Isto é devido não somente aos requisitos de comercialização, mas também porque os recipientes de vidro previnem a permeação das moléculas de O₂ para o interior da garrafa, diminuindo a taxa de oxidação. No entanto, vidros transparentes levam à fotoxidação do óleo e redução de sua vida útil. O uso de frascos de vidros de cor previne o processo de oxidação, como por exemplo, as garrafas verdes, que protegem o óleo da ação nociva da luz em comprimentos de onda de 300 a 500 nm (KIRISTAKIS et al., 2002). Rastrelli et al. (2002) constataram

que o α -tocoferol é a molécula primeiramente consumida quando ocorre a auto-oxidação do óleo de oliva extra virgem armazenados em garrafas transparentes meio vazias por 12 meses de armazenamento à temperatura ambiente e sob luz difusa. Detectou-se redução superior a 90% do teor de α -tocoferol em frascos claros totalmente cheios. Resultados relativos ao estudo do efeito do armazenamento no conteúdo de tocoferol e da atividade antioxidante de monovarietal de azeite de oliva extra virgem mostraram que, apesar da degradação de antioxidantes, os óleos com elevado teor de antioxidantes mantiveram-se excelentes após 240 dias de armazenamento a 40 °C em embalagens escuras fechadas. Estes dados levaram à conclusão de que as propriedades benéficas dos azeites extra-virgem, devido à atividade antioxidante, pode ser mantidas durante toda a sua vida comercial se o produto for devidamente embalado em frascos escuros e armazenado em locais que estejam com pouca incidência de luz (LAVELLI et al., 2006).

O vidro é um material de embalagem que proporciona barreira quase total à passagem da umidade e gases. O termo “praticamente” é usado pois, estas embalagens requerem um fecho que incorpora outros materiais tais como compostos vedantes poliméricos, através da qual pode facilmente permear o oxigênio e promover a oxidação (OLIVEIRA et al., 2001).

A vida útil dos óleos embalados em recipientes de vidro não transparentes pode ser considerada como o produto-dependente, pois as reações são função da estabilidade intrínseca do produto, e não só por fatores ambientais ou de embalagem (LEE et al., 2008d). Em outras palavras, a estabilidade intrínseca é ditada pela qualidade inicial do óleo, as condições de processamento e operações de enchimento.

Este tipo de embalagem apresenta características que o difere dos demais materiais, além da impermeabilidade aos gases, vapor d'água e aromas, relativamente inerte aos produtos, ela é totalmente reciclável, permitindo sua reutilização. Outras vantagens são a versatilidade de formatos e cores da embalagem final e a apresentação visual que confere ao produto. Porém, vidros transparentes e translúcidos apresentam limitações quanto à barreira à luz e proteção do alimento contra a fotoxidação (HANLON et al., 1998).

Referências

- ABD EL-ALIM, S.S.L.; LUGASI, A.; HOVARI, J.; DWORSCHAK, E. Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. **Journal Science Food Agriculture**, Easton, v.79, p. 277–285, 1999.
- ABIOVE. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. Disponível em: <<http://www.abiove.com.br/>>. Acesso em: 01 mar. 2013.
- AGGARWAL, B.B.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H. Spices as potent antioxidants with therapeutic potential. CADENAS, E.; PACKER, L.(Ed.). **Oxidative stress and disease**. New York:Academic Press; Marcel Dekker, 2002. . p. 437–472. (Handbook of Antioxidants,8).
- AL-JALAY, B.; BLANK, G.; MCCONNEL, B.; AL-KHAYAT, M.: Antioxidant activity of selected spices used in fermented meat sausages. **Journal Food Protection**, Des Moines, v.50, p. 25–27, 1987.
- ALMEIDA-DORIA, R.F.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Antioxidant activity of Rosemary and orégano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.20, n.2, p.197-203, 2000.
- ALVAREZ-PARRILLA, E.; de la ROSA, L.A.; AMAROWICZ, R; SHAHIDI, F. Protective effect of fresh and processed Jalapeño and Serrano peppers against food lipid and human LDL cholesterol oxidation. **Food Chemistry**, Barking, v.133, p. 827–834, 2012.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official and tentative methods**. 3 th ed. Champaign2003. v.1.
- ANDERSSON, L.B. Genes and obesity. **Annals of Internal Medicine**, New York, v.28, p.5, 1996.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K.; RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits. **Analyst**, Cambridge, v. 125, p.989–1009, 2000.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, Cambridge, v. 127, p. 183-198, 2002.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. 2nd ed. Berlin; Springer Verlag, 1999. p.215-223; 693-715.

BENAVENTE-GARCÍA, O.; CASTILLO, J.; LORENTE, J.; ORTUÑO, A.; DEL RIO, J.A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, Barking, v.68, n.4, p.457-462, 2000.

BISHOV, S.J.; MASUOKA, Y.; KAPSALIS, J.G. Antioxidant effect of spices, herbs and protein hydrolyzates in freeze-dried model systems: Synergistic action with synthetic phenolic antioxidants. **Journal of Food Processing and Preservation**, Oxford, v.1, p.153–166, 1977.

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

BOLLAND, J.L., KOCH, H.P. The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds. IX. The Primary Thermal Oxidation Products of Ethyl Linoleate. **Journal of the Chemical Society**, Champaign, v.1945, p.445, 1945.

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

BRADLEY, D.G.; MIN, D.B. Singlet oxygen oxidation of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v.31, n.3, p.211-236, 1992.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC n° 270, de 22 de setembro de 2005. Aprova “REGULAMENTO TÉCNICO PARA ÓLEOS VEGETAIS, GORDURAS VEGETAIS E CREME VEGETAL”. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 set. 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

BUCK, D.F. Food antioxidants: applications and uses in snack foods. **Cereal Foods World**, St. Paul, v.29, n.5, p.301-303, 1984.

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**, Chicago, v.49, n. 12, p. 5797-5808, 2001.

CASTILLO, J.; BANAVENTE-GARCIA, O.; LORENTE, J.; ALCARAZ, M.; REDONDO, A.; ORTUNOI, A.; DEL RIO, J.A. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Chicago, v.48, p.1738-1745, 2000.

CHAN K.W. IQBAL S. KHONG N.M.H.;, CH'NG S.E. BABJI A.S. Preparation of clove buds deodorized aqueous extract (CDAE) and evaluation of its potential to improve oxidative stability of chicken meatballs in comparison to synthetic and natural food antioxidants. **Journal Food Quality**, Oxford, v.35, n.3, p.190–199, 2012a.

CHAN, K.W.; NICHOLAS M.H.; KHONG,.; SHAHID I.; CH'NG, S.E.; YOUNAS, U.; BABJI, A.S. Cinnamon bark deodorised aqueous extract as potential natural antioxidant in meat emulsion system: a comparative study with synthetic and natural food antioxidants. **Journal Food Science Technology**, Oxford, DOI:007/s13197-012-0818-5, 2012b.

CHANG, S.S.; OSTRIC-MATIJESEVIC, B.; HSIEH, O.A.L.; HUAN, C.L. Natural antioxidants from rosemary and sage. **Journal of Food Science**, Oxford, v.42, n.4, p.1102-1106, 1977.

CHEN, B.; McCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Minor Components in Food Oils: A Critical Review of their Roles on Lipid Oxidation Chemistry in Bulk Oils and Emulsions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 51, p.901-916, 2011.

CHEVOLLEAU, S.; MALLET, J.F.; UCCIANI, E.; GAMISANS, J.; GRUBER, M. Antioxidant activity in leaves of some Mediterranean plants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.69, n.12, p.1269-1271, 1992.

CHIPAULT, J.R.; MIZUNO, G.R.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O.: The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, Toronto, v.17, p. 46–55, 1952.

CHIPAULT, J.R.; MIZUNO, G.R.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O.: Antioxidant properties of spices in oil-in-water emulsion. **Food Research**, Toronto, v. 20, p. 443–448, 1955.

CHIPAULT, J.R.; MIZUNO, G.R.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O: The antioxidant properties of spices in food. **Food Technology**, Oxford, v.10, p. 209–211, 1956.

CODEX ALIMENTARIUS (FAO/WHO). Codex Standard for Named Vegetables Oils, CODEX STAN 210-1999. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org>>. Acesso em: 23 mar 2013.

CONTRERAS-PADILLA, M. AND YAHIA, E.M. Changes in capsinoids during development, maturation, and senescence of Chile peppers and relation with peroxidase activity. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Easton, v. 46, p.2075–2079, 1998.

COPPEN, P.P. The use of antioxidants. In: ALLEN, J.C. HAMILTON, R.J. (Ed.). **Rancidity in Foods**. New York: Applied Science Publishers, 1983. 67p.

DAKER, M.; ABDULLAH, N.; VIKINESWARY, S.; GOH, P.C.; KUPPUSAMY, U.R. Antioxidant from maize and maize fermented by *Marasmiellus* sp. as stabiliser of lipid-rich foods. **Food Chemistry**, Barking, v. 107, p.1092-1098, 2008.

DECKER, E.A. Antioxidant Mechanisms. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. (Ed.) **Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 535-560.

DESHPANDE, S.S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D.K. Tannin analysis of food products. **Critical Reviews Food Science and Nutrition**, London, v. 24, p. 401–449, 1986.

DORKO, C. Antioxidants used in food. **Food Technology**, Oxford, v.48, n.4, p.33, 1994.

ESKIN, N.A.M.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidants and shelf life of foods. In: ROBINSON, D.S.; ESKIN, N.A.M. (Ed.). **Food shelf life stability: chemical, biochemical and microbiological changes**. Boca Raton: CRC Press, 2000. p.175-209. ESTRADA, B.; POMAR, F.; DIAZ, Z.; MERINO, F.; BERNAL, A. Evolution of capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. var. annuum cv. Padron at different growth stages after flowering. **Capsicum Eggplant Newsletter**, Turin, v. 16, p.60–64, 1997.

ESTRADA, B.; POMAR, F.; DIAZ, Z.; MERINO, F.; BERNAL, A. Effects of mineral fertilizer supplementation on fruit development and pungency level of Padron pepper fruits. **Capsicum Eggplant Newsletter**, Turin, v. 73, p. 493–497, 1998.

ESTRADA, B.; POMAR, F.; DIAZ, J.; MERINO, F.; BERNAL, A. Pungency level in fruits of the Padron pepper with different water supply. **Science Horticulture**. Amsterdam, v. 81, p.385–396, 1999a.

ESTRADA, B.; BERNAL, M.A.; DIAZ, J.; POMAR, F.; MERINO, F. Fruit development in *Capsicum annuum*. Changes in capsaicin, lignin, free phenolics, and peroxidase patterns. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Easton, v.48, p.6234–6239, 2000.

FARAG, R.S.; BADEI, A.Z.M.A.; HEWEDI, F.M.; EL-BAROTY, G.S.A. Antioxidant activity of some spice essential oils on linolenic acid oxidation in aqueous media. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.66, v.6, p. 792-799, 1989a.

FARAG, R.S.; BADEI, A.Z.M.A.; EL-BAROTY, G.S.A. Influence of thyme and clove essential oils on cotton-seed oil oxidation. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.66, p. 800-804, 1989b.

FARMER, E.H; BLOOMFIELD, G.F.; SUNDARALINGAM, A.; SUTTON, D.A. The course and mechanism of autoxidation reactions in olefinic and polyolifinic substances including rubber. **Transactions of the Faraday Society**, London, v.38, p.348-356, 1942.

FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; VIUDA-MARTOS, M.; SENDRA, E.; SAYAS-BARBERÁ, E.; NAVARRO, C.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A. Orange Fibre as Potential Functional Ingredient for Dry- cured Sausages. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 226, n. 1/2, p. 1-6, 2007.

FRANKEL, E.N. **Lipid Oxidation**. West Ferry, Dundee: The Oily Press, 1998.p.13, 79, 115, 129;167.

FREIRE, J.M. **Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: caracterização química e atividade biológica sobre *Staphylococcus áureos*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasíticus***. 2008. 68p. Tese (Mestrado em Agroquímica) Lavras: Universidade Federal de Lavras – UFLA, 2008.

GIESE, J. Antioxidants: Tools for preventing lipid oxidation. **Food Technology**, Oxford, v.50, n.11, p.72,1996.

GORINSTEIN, S.; PARK, Y.-S.; HEO, B.-G.; NAMIESNIK, J.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; HAM K.-S.; CHO, J.-Y.; KANG, S.-G. A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables. **Europe Food Research Technology**, Berlin, v. 228, p. 903-911, 2009.

GUIL-GUERRERO, J.L.; MARTÍNEZ-GUIRADO, C.; REBOLLOSO-FUENTES, M.M.; CARRIQUE-PÉREZ, A. Nutrient composition and antioxidant activity of 10 pepper (*Capsicum annuum*) varieties. **Europe Food Research Technology**, Berlin, v.224, p.1-9, 2006.

GUTIERREZ, E.M.R.; REGITANO-D ARCE, M.A.B.; RAUEN-MIGUEL, A.M.O. Estabilidade oxidativa do óleo bruto da castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*). **Ciências Tecnologia Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 22-27, 1997.

GERHARDT, U.; BÖHM, T. Redox behavior of spices in meat products. **Fleischwirtschaft**, Germany, v. 60, p.1523–1526, 1980.

GOVINDARAJAN, V. *Capsicum* production, technology, chemistry, and quality. III. Chemistry of the color, aroma, and pungency stimuli. **Critical Reviews Food Science and Nutrition**, London v. 25, p. 245–355, 1986.

GRAMZA, A.; KHOKHAR, S.; YOKO, A.; GLISZCZYNSKA-SWIGLO, M.; HES, J. KORCZAK. Antioxidant activity of tea extracts in lipids and correlation with polyphenol content. **European Journal Lipid Science Technology**, Berlin, v.108, p.351-362, 2006.

GRAY, J.I. Measurement of lipid oxidation. **Journal American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 55, p.539–546, 1978.

HAGERMAN, A.E.; ZHAO, Y.; JOHNSON, S. Methods for determination of condensed and hydrolyzable tannins, In: SHAHIDI, F.(Ed.) **Antinutrients and Phytochemicals in Food**. Washington, D.C.: American Chemical Society, 2002. p.209–222. (ACS Symposium Series, 662).

HAMILTON, R.J. The chemistry of rancidity in foods. In: ALLEN, J.C. ; HAMILTON, R.J. **Rancidity in foods**. 3rd.ed. London: Blackie Academic Prof., 1994. p.1-21.

HANLON, J.F.; KELSEY, R.J.; FORCINIO, H.E. **Handbook of package engineering**. 3rd ed. RC Press. 1998. p.698. Disponível em: <http://books.google.com/books>. Acesso em: março, 2013.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ .**Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos**. 4.ed. ZENEBON, O.; PASCUET, N.S.(Coord.) In: cap.6:Análise sensorial. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005. 1020p.

IORIZZI, M.; LANZOTTI, V.; DE MARINO, S.; ZOLLO, F.; BLANCO-MOLINA, M.; MACHO, A.; MUNOZ, E. New glycosides from *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*. Isolation, structure determination, and biological activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.49, p.2022–2029, 2001.

IWAI, K.; SUZUKI, T.; FUJIWAKE, H. Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different stages after flowering. **Agriculture Food Chemistry**, Easton, v. 43, p. 2493–2498, 1979.

JACKMAN, R.L.; YADA, R.Y.; TUNG, M.A. A review: separation and chemical properties of anthocyanins used for their qualitative and quantitative analysis. **Journal Food Biochemistry**, Easton, v. 11, p.279 308, 1987.

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

JUNG, M.Y.; LEE, H.O.; MIN, D.B. Singlet oxygen and ascorbic acid effects on dimethyl disulfide and off-flavor in skim milk exposed to light. **Journal Food Science**, Oxford, v.63, p. 408 – 412, 1998.

JURENITSCH, J.; KUBELKA, W. JENTZSCH, K. Identification of cultivated taxa of *Capsicum*. Taxonomy, anatomy, and composition of pungent principle. **Planta Medica**, New York, v. 35, p. 174–183, 1979.

KARDASH, E.; TUR'YAN, Y. I. Acid value determination in vegetable oils by Indirect titration in aqueous-alcohol media. **Croatica Chemica Acta**, New York, v.78, n.1, p.99-103, 2005.

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

KIRSCHBAUM-TITZE, P., HIEPLER, C.; MUELLER-SEITZ, E.; PETZ, M. Pungency in paprika (*Capsicum annuum*). 1. Decrease of capsaicinoid content following cellular disruption. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Easton, v.50, p.1260–1263, 2002a.

KIRSCHBAUM-TITZE, P.; MUELLER-SEITZ, E.; PETZ, M. Pungency in paprika (*Capsicum annuum*). 2. Heterogeneity of capsaicinoid content of individual fruit from one plant. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Easton, v.50, p.1264–1266, 2002b.

KOŁAKOWSKA, A. Lipid oxidation in food systems. In: SIKORSKI, Z.E.; KOŁAKOWSKA, A. (Ed.). **Chemical and Functional Properties of Food Lipids**. Boca Raton: CRC, 2003. chap. 8, p. 133–166.

KRISHNAMURTY, R.G. Cooking oils, salad oils, and salad dressings. In: SWERN, D. **Bailey's industrial oil and fat products**. 4th ed. New York: Wiley-Interscience, 1982. v.2, p.320-326.

KRISTOTT, J. Fats and oils. In: KILCAST, D.; SUBRAMANIAM, P. (Ed.). **The stability and shelf-life of food**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2010. chap.12, p.279-310.

LAVELLI, V.; FREGAPANE G.; SALVADOR D.M. Effect of storage on secoiridoid and tocopherol contents and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, p. 3002–3007, 2006.

LEE, E.C.; MIN, D.B. Quenching mechanism of β -carotene on the chlorophyll sensitized photooxidation of soybean oil. **Journal Food Science**, Oxford, v. 53, p.1894–1895, 1988.

LEE D.S.; YAM K.L.; PIERGIOVANNI L. Metal packaging. In: _____ **Food Packaging Science and Technology**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2008. p. 197–242.

LEE, Y.; HOWARD, L.R.; VILLALON, B. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars. **Journal Food Science**, Oxford, v.60, p. 473–476, 1995.

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

LOGANI, M.K.; DAVIES, R.E. Lipid oxidation: Biological effects and antioxidants. **Lipids**, Champaign, v. 15, p.485–495, 1980.

LOUCHE, L.M.M.; GAYDOU, E.M.; LESAGE, J.C. Determination of phlorin as peel marker in orange (*Citrus sinensis*) fruits and juices. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Easton, v,46, p. 4191-4192, 1998.

LOVE, J. Factors affecting lipid oxidation. In: MIM, D.B.; SMOUSE, T.H. (Ed.) **Flavor chemistry of fats and oils**. Champaign: AOCS, 1985. p.61 – 78. 1985.

LUGASI, A.; HÓVÁRI, J.; DWORSCHÁK, E.; NESZLÉNYI, K.; LEBOVICS, V.; ZSINKA, Á. J. N. Effect of UV irradiation on lipid peroxidation in edible fats. **Acta Alimentaria**, Budapest, v.24, n.3, p.269-276. Sept. 1995.

LUNDBERG, W.O. Mechanisms. In: SCHULTZ, H.W. **Symposium on foods, lipids and their oxidation**. Westport:AVI, 1962. 130p.

MATHEW S.; ABRAHAM ,T.E. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various in vitro models. **Food Chemistry**, Barking, v. 94, p, 520–528, 2006.

MADSEN, H.L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science Technology**, Barking, v.6, p. 271–277, 1995.

MARINI, D; BALESTRIERI, F. Multivariate analysis of flavanone glycosides in citrus juices. **Journal Food Science**, Oxford, v.3, p.255-264, 1995.

MARKHAM, K.R. **Isolation techniques for flavonoids**. In: HARBORNE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. (Ed.) **The Flavonoids**. London: Chapman & Hall, 1975. p.31.

MEHLENBACHER, V.C. **The analysis of fats and oils**. Champaign: Garrard Press, 1960. p.96; 189-224.

MIRANDA, M.S.; SATO, S.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga *Chlorella vulgaris* cultered on special conditions. **Bolletino Chimico Farmaceutico**, Milano, v.140, n.3, p.156-168, 2001.

MOLINEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant. Songklanakarin **Journal of Science and Technology**, Oxford, v.26, n.2, p.211-219, 2004.

MOULY, P.P.; ARZOUYAN, C.R.; GAYDOU, E.M.; ESTIENNE, J.M. Differentiation of citrus juices by factorial discriminant analysis using liquid chromatography of flavanone glycosides. **Journal Agriculture Food Chemistry, Easton**, v.42, p.70-79, 1994.

NAKATANI, N. Antioxidants from spices and herbs. In: SHAHIDI, F. **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications**. The American Oil Chemist's Society, 1997. p.64-75.

NEGRAES, P. **Guia A-Z de plantas: condimentos**. São Paulo: Bei Comunicação, 2003. 267p.

OBOH, G.; TOCHA, J.B.T. Polyphenols in red pepper (*Capsicum annuum* var. *aviculare* (Tepin) and their protective effect on some pro-oxidants induced lipid peroxidation in brain and liver. **Europe Food Research Technology**, Berlin, v. 225, p. 239-247, 2007.

OLIVEIRA, L.M. **Requisitos de proteção de produtos em embalagens plásticas rígidas**. Centro de tecnologia de alimentos – Campinas: ITAL, 2006. 328p.

OOGHE, W.C.; DETAVERNIER, C.M. Detection of the addition of *Citrus reticulada* and hybrids of *Citrus sinensis* by flavonoids. **Journal Agriculture Food Chemistry, Easton**, v.45, p.1633-1637, 1997.

OZCAN, M.M.; ARSLAN, D. Antioxidant effect of essential oils of Rosemary, clove and cinnamon on hazelnut and poppy oils. **Food Chemistry, Barking**, v.129, p.171-174, 2011.

PALITZSCH, A.; KRIZANEC, D.; DIKANOVIC-LUCAN, Z. The antioxidant properties of spices in dry-fermented sausages. **Fleischwirtschaft, Germany**, v.73, p.670–672, 1993.

PALITZSCH, A.; SCHULTE, H.; METZL, F.; BAAS, H. Effect of natural spices, spice extracts, essential oils, extraction residues, and synthetic antioxidants on the decomposition of pork fat and model lipids. I. Effect of natural spices and spice extracts on pork fat. **Fleischwirtschaft, Germany**, v.49, p. 1349–1354, 1969.

PARRILLA, E.A.; DE LA ROSA, L.A.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant Activity of Fresh and Processed Jalapeño and Serrano Peppers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry, Easton**, v.59, p.163-173, 2011.

PARK, J.-H.; JEON, G.-I.; KIM, J.-M.; PARK, E. Antioxidant activity and antiproliferative action of methanol extracts of 4 different colored bell peppers (*Capsicum annuum* L.). **Food Science Biotechnology**, Korea, v.21, n.2, p. 543-550, 2012.

PEREIRA, A.A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos**. Universidade Federal de Lavras, 2006. 58p.

PINO, L.M. **Influência da ração com extratos naturais na qualidade e estabilidade oxidativa da carne de frangos**. 2009. 118p. Tese (Doutorado em Nutrição Humana Aplicada) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PORTER, L.J. **Tannins**, in **Methods in Plant Biochemistry**, HARBORNE, J.B. (Ed.) San Diego:Academic Press, 1989. v.1 p.389–420.

PURSEGLOVE, J.W.; BROWN, E.G.; GREEN, C.L.; ROBBINS, S.R.J. **Spices**. WRIGLEY, G. (Ed.). Longman Scientific & Technical, 1981. v.1. p. 106-108.

PRATT, D.E. Natural antioxidants from plant material. In: HUANG, M.T.HO, C.T. LEE, C.Y. **Phenolic compounds in food and their effects on health**. II. Antioxidants and Cancer Prevention. Washington: American Chemical Society, 1992. 402p.

PRATT, D.E.; HUI, Y.H. (Ed.). **Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Edible Oil and Fat Products, Products and Application Technology**. 5th ed. New York: Wiley, 1995. 523p.

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

RACCHI, M.; DAGLIA, M.; LANNI, C.; PAPETTI, A.; GOVONI, S.;GAZZANI, G. Antiradical activity of water soluble components in common diet vegetables. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Easton, v.50, p.1272–1277, 2002.

RAFFO, A.; BAIAMONTE, I.; PAOLETTI, F. Changes in antioxidants and taste-related compounds content during cold storage of fresh-cut red sweet peppers. **Europe Food Research Technology**, Berlin, v. 226, p. 1167-1174, 2008.

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

RAMIREZ, I. Feeding a liquid diet increases energy intake, weight gain and body fat in rats. **Journal Nutrition**, Bethesda, v. 117, p. 2127, 1987.

RANNEY, M.W. **Antioxidants Recent Developments**. Park Ridge, New Jersey: Noys Data Corporation 1979. 1v.

RASTRELLI, L.; PASSI S.; IPPOLITO F.; VACCA G.; de SIMONE F. Rate of degradation of a-tocopherol, squalene, phenolics, and polyunsaturated fatty acids in olive oil during different storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 5566–5570, 2002.

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

RAVINDRAN, P.N.; NIRMAL BABU, K.; SHYLAJA, M. **Cinnamon and Cassia. The genus *Cinnamomum***. Flórida: Ed. CRC Press, 2004. 329p.

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**, v.26, p.1231-1237, 1999.

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R. Antioxidants. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. (Ed.). **Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology** | 2nd ed. New York:Marcel Dekker, 2002. p.507-534.

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

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372p.

ROVELLINI, P.; CORTESI, N.; FEDELI, E. Ossidazione dei lipidi. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, Milano, v. 74, n.5, p.181-189, 1997.

ROWLAND, B.J.; VILLALON, B.; BURNS, E.E. Capsaicin production in sweet bell and pungent Jalapeno peppers. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Easton, v. 31, p.484–487, 1983.

SALUNKHE, O.K.; CHAVAN, J.K.; KADAM, S.S. **Dietary Tannins: Consequences and Remedies**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1989. p.537.

SCALBERT, A. **Quantitative methods for estimation of tannins in plant tissues**. In: HEMINGWAY, R.W.; LAKS, P.S. (Ed.). **Plant Polyphenols: Synthesis, Properties, Significance**. New York: Plenum Press, 1992. p. 259–280.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, 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. **Food Research**, v.27, p. 555–562, 1994. SHAHIDI, F.;

SHAHIDI, F.; PEGG, R.B.; SALEEMI, Z.O. Stabilization of meat lipids with ground spices. **Journal Food Lipids**, Dordrecht, v.2, p. 145–153, 1995.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. Flórida: Ed. CRC Press, 2004. 556p.

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. 113p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SINGH G.; MAURYA S.; DELAMPASONA M.; CATALAN C.A.N. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food Chemistry Toxicology**, Kansas, v. 45, p.1650–1661, 2007.

SUKRASNO, N.; YEOMAN, M.M. Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. **Phytochemistry**, New York, v. 32, p. 839–844, 1993.

SUN, T.; XU, Z.; WU, C.-T.; JANES, M.; PRINYAWIWATKUL, W.; NO, H.K. Antioxidant Activities of Different Colores Sweet Bell Peppers (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Food Science**, Chicago, v.72, n.2, p.98-102, 2007.

TEMPEL, A.S. Tannin-measuring techniques. A review. **Journal of Chemistry Ecology**, New York, v. 8, p.1289–1298, 1982.

TRINDADE, R.A.; SALUM, D.C.; ANDRADE-WARTHA, E.R.S.; SILVA, M.A., AQUINO, S.; MANCINI-FILHO, JVICENCIO, A.L.C.H. Comparative analysis of antioxidante activity of aqueous extracts of orégano (*Origanum vulgare*) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by beta-carotene/linoleic acid system. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.2, p.1-64, 2005.

VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G.R.M.M.; VAN DEN BERG, H.; VANDER, V.W.; BAST, A. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. **Food Chemistry**, Barking, v. 703, p.391-395, 2000.

VEGA-GÁLDEZ, A.; DI SCALA, K.; RODRÍGUES, K.; LEMUS-MONDACA, R.; MIRANDA, M.; LÓPEZ, J.; PEREZ-WON, M. Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties, antioxidant capacity, colour and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annuum*, L. var. Hungarian). **Food Chemistry**, Barking, v.117, p.647-653, 2009.

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

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M.S.; TRANCOSO, A.M.; GARCÍA-PARRILLA, M.C. The antioxidant activity of wines determined by the ABTS (+) method: influence of sample dilution and time. **Talanta**, London, v.64, n.2, p. 501-509, 2004.

WANASUNDARA, P.K.J.P.D.; SHAHIDI, F. Antioxidants: science, technology, and applications. In: SHAHIDI, F. (Ed.) **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 6 th Ed. John Wiley, 2005. 6v. 463p.

WANASUNDARA, U.N.; AMAROWICZ, R. Natural antioxidants from pungency mustard flour. **Food Research International**, Toronto, v.27, p. 489-493, 1994.

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

WETTASINGHE, M.; SHAIDI, F. Antioxidant and free radical-scavenging properties of ethanolic extracts of defatted borage (*Borago officinalis* L.) seeds. **Food Chemistry**, Barking, v.67, n.4, p.399-414, 1999.

YANISHLIEVA, V.N.; MARINOVA, E.; POKORNY, J. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal Lipid Science Technology**, Berlin, v.108, p. 776–793, 2006.

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

2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CRAVO, CANELA E PIMENTA DEDO-DE-MOÇA NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÓLEO DE SOJA

Resumo

O estudo das condições de extração de compostos fenólicos totais de especiarias foi baseado no efeito do solvente e da temperatura e realizado com planejamento experimental e análise de superfícies de resposta. As variáveis explanatórias estudadas foram o grau de hidratação do etanol e temperatura (30 a 60 °C), e a variável dependente foi o teor de compostos fenólicos totais, expresso em mg de equivalentes ao ácido gálico/g especiaria seca. Foi aplicado um delineamento fatorial completo, do tipo rotacional central do tipo 2^2 para identificação da melhor temperatura e grau de hidratação do etanol para a máxima extração de compostos fenólicos de cada especiaria. Os resultados obtidos demonstraram que o processo de extração é fortemente dependente do teor de água no etanol. Os compostos fenólicos de frutos secos de cravo e casca de canela podem ser eficientemente extraídos com etanol 49,5% (v/v), na faixa de 45 a 50 °C, enquanto que para a pimenta é possível observar que o total de compostos fenólicos aumenta com a elevação da temperatura e quando o etanol está a 49,5% (v/v) ($p < 0,05$). Os extratos hidroalcoólicos das três especiarias apresentaram atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS, porém o extrato de cravo foi que apresentou melhores resultados, seguido da canela e pimenta ($p < 0,05$).

Palavras-chave: Especiarias; MSR; ABTS; DPPH

Abstract

The study of the conditions of extraction of phenolic compounds from spices was based on the effect of solvent and the temperature of extraction and performed with experimental design and response surface analysis. The explanatory variables were the degree of hydration of ethanol and temperature (30 to 60 °C), and the dependend variable was the total phenolic content, expressed as mg gallic acid equivalent to / g dry spices. A factorial and a 2^2 type central rotational design was applied to identify the best temperature and degree of hydration of ethanol for maximum phenolics yield. The results showed that the extraction process is strongly dependent on the water content in ethanol. Phenolic compounds in clove fruits and cinnamon barks extracts can be efficiently extracted with 49.5% ethanol (v / v) in the temperature range 45 to 50 °C, while for pepper, phenolic compounds content increases with increasing temperature, when ethanol is 49.5% (v / v) ($p < 0,05$). The extracts of the three spices showed antioxidant DPPH and ABTS activity, clove achieved the best results, followed by cinnamon and pepper ($p < 0,05$).

Keywords: Spices; RSM; ABTS, DPPH

2.1 Introdução

Tem havido um crescente interesse em antioxidantes naturais encontrados em plantas devido à preocupação da população com hábitos mais saudáveis e a tendência mundial para o uso de aditivos naturais em alimentos. As ervas e especiarias são um dos materiais mais comuns para pesquisar os antioxidantes naturais do ponto de vista histórico e de segurança alimentar (HOHMANN et al., 1999; TRIANTAPHYLLOU et al., 2001; EXARCHOU et al., 2002; DORMAN et al., 2003; OLZCAN, 2003; TSAI et al., 2005).

O mecanismo pelo qual estes antioxidantes podem exercer seus efeitos depende da composição dos alimentos. Além disso, os efeitos benéficos do consumo de alimentos naturais para a saúde têm sido atribuídos, em parte, à presença de compostos fenólicos, os quais estão associados ao menor risco de incidência de doenças cardiovasculares, câncer e cataratas, dentre tantas outras doenças degenerativas (SHAHIDI; NACZK, 2004). Os fitoquímicos responsáveis pela ação antioxidante se evidenciam no campo alimentício por apresentarem ação antioxidante e devido à alegada toxicidade dos antioxidantes sintéticos utilizados pela indústria (DORMAN; HILTUNEN, 2004).

Diversas pesquisas em extratos de especiarias tem evidenciado a ação protetora destes contra a oxidação lipídica em diversos alimentos (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000; BANDONIENÉ et al., 2002; PINO, 2009; GRAMZA-MICHALOWSKA et al., 2011; RACANICCI et al., 2004, RAVELLI, 2011; SHIMANO, 2012), sendo os compostos fenólicos presentes em cravo, canela, pimenta dedo-de-moça um exemplo das diversas especiarias investigadas. O principal composto fenólico encontrado no fruto do cravo é o eugenol (PEREIRA, 2006), na casca da canela, o aldeído cinâmico (FREIRE, 2006) e no fruto da pimenta dedo-de-moça, a quercetina e luteína (LORRIZZI et al., 2001; SUKRASNO; YEOMAN, 1993).

Os solventes como o etanol, acetona, éter, água e metanol são comumente utilizados para extração de compostos existentes em vegetais (CHIRINOS et al., 2007; PINELO et al., 2007). Do ponto de vista toxicológico, etanol e água são solventes, além de eficientes na extração de compostos fenólicos (MELO, 2010), são mais seguros que acetona, metanol e outros solventes orgânicos e, devido a isto, são mais aceitos pela a indústria de alimentos (OKTAY; GÜLÇİN; KÜFREVIÖGLU, 2003).

Considerando a diversidade na composição das fontes naturais de polifenóis, bem como a estrutura e propriedades físico-químicas destes compostos, não existe um protocolo a ser seguido para sua extração, e os processos específicos devem ser delineados e otimizados para cada fonte de composto fenólico (ESCRIBANO-BAILON; SANTOS-BUELGA, 2003; PINELO et al., 2005). Além disso, a co-extração de compostos indesejáveis, tais como os açúcares, lipídeos, terpenos ou pigmentos, deve ser evitada, tendo que ser levada em conta durante a otimização do processo. Parâmetros, como tipo do solvente de extração, temperatura, tempo, tamanho de partícula e a relação erva/especiaria:solvente, podem afetar o processo de extração, de forma independente ou apresentando interações entre si (JUNTACHOTE et al., 2006).

Estudos clássicos de otimização utilizam a abordagem de um-fator em-um-tempo, em que apenas um fator é a variável de cada vez, enquanto todos os outros são mantidos constantes. Neste método, os possíveis efeitos de interação entre variáveis não podem ser avaliadas e conclusões errôneas podem ser tomadas. A metodologia de superfície de resposta (RSM) pode superar estas dificuldades, uma vez que permite a contabilização de possíveis efeitos de interação entre as variáveis (KHURI; CORNELL, 1996; MONTGOMERY; RUNGER, 2003). Se usado adequadamente, esta metodologia pode fornecer as condições ótimas que melhoram um processo de extração (BAS; BOYACI, 2007).

Assim sendo, o objetivo desta pesquisa foi aplicar a abordagem RSM para obter o maior rendimento de fenólicos totais através da otimização das condições de extração (proporção de etanol/água e temperatura) para cravo, canela e pimenta dedo-de-moça, além de avaliar a capacidade antioxidante destas especiarias através dos métodos de DPPH e ABTS^{•+}.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Preparo das especiarias

O cravo (fruto) e a canela (casca) foram adquiridos já desidratados, e a pimenta-dedo-de-moça (fruto) foi adquirida na forma *in natura* no Mercado Municipal de Piracicaba. A pimenta foi seca em estufa de circulação de ar (marca Fanem, modelo 315SE) a 63 °C. As especiarias foram trituradas até apresentarem característica de pó e armazenadas em frasco âmbar e sob refrigeração até o momento de sua utilização.

2.2.2 Processo de extração

Em erlenmeyers 3,0 g de cada especiaria seca foram pesados, adicionados de 30 mL da mistura de solvente etanol:água (v/v) seguindo o grau de hidratação da Tabela 2.2, submetidos a banho termostático sob agitação. A relação etanol:água e as temperaturas foram estabelecidas através do planejamento experimental. Foi fixado o tempo de extração de 50 minutos, baseados em ensaios preliminares. Posteriormente, os extratos foram centrifugados a 2057G por 20 minutos e em seguida filtrados em papel filtro do tipo Whatman n.2. Os extratos foram armazenados sob refrigeração a 7 °C em frascos âmbar por até 5 dias.

2.2.3 Determinação do teor de compostos fenólicos

Foi utilizado o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999), utilizando ácido gálico como padrão. O reagente de Folin-Ciocalteu é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W. A 0,5 mL dos extratos diluídos transferido para tubos de ensaio com tampa rosca foram adicionados 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (marca Dinâmica Química Contemporânea):água 1:10 (v/v). Os tubos foram agitados em vórtex e deixados em repouso por 5 minutos e posteriormente adicionados de 2 mL de carbonato de sódio 4% (m/v), submetidos novamente à agitação em vórtex e deixados em repouso por 2 horas ao abrigo de luz. Após 2 horas, foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-1203 (Shimadzu) a 740 nm. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições e os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico com base em uma curva de calibração de ácido gálico com concentração variando de 5 a 100 µg/mL.

2.2.4 Atividade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

A determinação da atividade antioxidante por DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVIER; BERSET, 1995) foi realizada em extratos etanólicos produzidos nas condições selecionadas de cravo, canela e pimenta dedo-de-moça. Os extratos foram diluídos e uma alíquota de 500 µL de cada amostra diluída foi transferida para um tubo de vidro. Em seguida foram adicionados 3 mL de etanol juntamente com 300 µL de DPPH. Os tubos foram submetidos à agitação no vórtex e guardados ao

abrigo de luz por 45 minutos. A leitura de absorbância foi realizada em 515 nm e os resultados obtidos foram expressos como capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC) com base em uma curva de calibração de Trolox com concentração variando de 5 a 50 µL.

2.2.5 Atividade antioxidante pelo método ABTS (ácido 6-[2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolinil)] sulfônico)

A determinação da atividade antioxidante por ABTS (RE et al., 1999; de CAMARGO et al., 2012) foi realizada em extratos etanólicos produzidos nas condições selecionadas de cravo, canela e pimenta dedo-de-moça. 20 µL das amostras diluídas foram transferidos para cubetas de quartzo e completadas com 2,00 mL de solução ABTS. A reação ocorreu dentro do espectrofotômetro por 6 minutos. A leitura de absorbância foi realizada em 734 nm e os resultados foram expressos em capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC) com base em uma curva de calibração de Trolox.

2.2.6 Delineamento experimental e análise estatística

Um planejamento composto central rotativo foi aplicado para determinar os efeitos da concentração de etanol (%) e temperatura de extração no teor de fenólicos totais de especiarias secas. As duas variáveis explanatórias foram relação etanol:água (% etanol, v/v) e temperatura (30 a 60 °C). A Tabela 2.1 apresenta as faixas de estudo das condições de preparo dos extratos das especiarias e seus níveis. O delineamento experimental incluindo os níveis superior e inferior, os pontos axiais e repetições do ponto central para estimar o erro puro são apresentados na Tabela 2.2. O estudo do efeito dos parâmetros na extração foi realizado pelo teste de t-student ($p \leq 0,05$). Foi aplicada análise de regressão múltipla e ajuste de modelos matemáticos com o objetivo de definir as condições ótimas de extração dos compostos fenólicos presentes nas especiarias, através do ajuste do modelo matemático, incluindo os termos lineares, quadráticos e as interações entre as variáveis explanatórias. Os modelos obtidos foram avaliados com base no coeficiente de determinação (R^2) e no teste F, realizado por meio da análise de variância com auxílio do programa Statistica 11.0 (StatSoft, Inc. 2011). A fórmula geral do modelo é representada pela Equação 2.1:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad (2.1)$$

Em que:

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 2.1 - Faixas de estudo das condições de preparo de extratos de especiarias e níveis das variáveis explanatórias.

Níveis	-1,41	-1	0	1	1,41
Grau de hidratação do etanol (% de Etanol)	0	14,4	49,5	84,6	99
Temperatura (°C)	30	34,4	45	55,6	60

Tabela 2.2 - Delineamento experimental para o estudo do efeito das variáveis mistura etanol:água e temperatura sobre o teor de compostos fenólicos totais dos extratos de especiarias.

Ensaio	Variáveis explanatórias			
	Mistura etanol:água (% etanol)		Temperatura (°C)	
	Valor codificado	Valor real	Valor codificado	Valor real
1	-1	14,4	-1	34,4
2	+1	84,6	-1	34,4
3	-1	14,4	+1	55,6
4	+1	84,6	+1	55,6
5	-1,41	0	0	45
6	+1,41	99	0	45
7	0	49,5	-1,41	30
8	0	49,5	+1,41	60
9	0	49,5	0	45
10	0	49,5	0	45
11	0	49,5	0	45
12	0	49,5	0	45

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Superfície de resposta (MSR)

O MSR foi aplicada visando encontrar as melhores condições para obter elevados teores de compostos fenólicos em extratos de cravo, canela e pimenta dedo-de-moça, submetidos a diferentes temperaturas e grau de hidratação do etanol. A Tabela 2.3 apresenta os resultados do teor de compostos fenólicos totais dos extratos produzidos em cada ensaio.

Tabela 2.3 - Teor de compostos fenólicos totais dos extratos de especiarias (n=2).

Ensaio	Variáveis explanatórias		Teor de compostos fenólicos totais (mg AG/g amostra)*		
	Etanol:água (%etanol, v/v)	Temperatura (°C)	Cravo	Canela	Pimenta dedo-de- moça
1	14,4	34,4	103,63	76,28	69,13
2	84,6	34,4	178,66	62,21	65,81
3	14,4	55,6	118,27	31,50	72,09
4	84,6	55,6	166,98	29,34	76,57
5	0	45	109,47	34,58	74,01
6	99	45	168,50	57,81	50,89
7	49,5	30	194,25	120,84	51,97
8	49,5	60	212,57	133,48	77,09
9	49,5	45	212,57	145,08	59,13
10	49,5	45	209,85	151,92	60,53
11	49,5	45	223,45	133,52	60,43
12	49,5	45	219,61	134,52	63,31

*valores expressos como média das duplicatas

O teor de compostos fenólicos variou para cada especiaria. Os extratos de cravo seguidos da canela foram as especiarias de maior teor de compostos fenólicos, em média.

Os extratos de pimenta dedo-de-moça apresentaram a menor concentração destes compostos, em média, o que pode ser atribuído à presença de um único grupo de compostos fenólicos, conhecido como capsaicinóides, sendo que o conteúdo total deste composto pode ser afetado pela temperatura (CONTRERAS-PADILLA; YAHIA, 1998; ESTRADA et al., 1997, 1998, 1999a, b, 2000; GOVINDARAJAN, 1986; IWAI et al., 1979; JURENITSCH et al., 1979).

O teor de compostos fenólicos encontrados nos extratos de cada ensaio está de acordo com Buissa et al. (2007). Estes autores encontraram uma concentração de 251,62 mg AG/g para cravo, 13,50 mg AG/g para canela e 2,46 mg AG/g para pimenta vermelha em extração aquosa.

2.3.1.1 Modelo Experimental para o cravo

A Tabela 2.4 apresenta as estimativas dos efeitos sobre o teor de compostos fenólicos para o extrato de cravo.

Tabela 2.4 – Estimativa dos efeitos das variáveis explanatórias sobre o rendimento de compostos fenólicos nos extratos de cravo

	Efeito	Erro padrão	Nível descritivo (p)
Média	216,4564	3,130127	0,000007*
(1) % Etanol (L)	51,8975	4,433306	0,001339*
% Etanol (Q)	-92,5426	4,969885	0,000338*
(2) Temperatura(°C)(L)	7,2193	4,433306	0,201921
Temperatura (°C)(Q)	-27,7319	4,969885	0,011363*
1L x 2L	-13,1600	6,260309	0,126309

*Fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p \leq 0,05$)

L = linear

Q = Quadrático

Para a especiaria cravo, o valor p ($p \leq 0,05$) mostra que todos os efeitos quadráticos tiveram significativa influência sobre a extração de compostos fenólicos e somente a concentração do etanol apresentou efeito linear significativo. A interação entre a temperatura e o grau de hidratação não foi significativa sobre a extração dos compostos fenólicos em cravo (Tabela 2.4).

Os termos lineares positivos indicam o aumento do teor de compostos fenólicos e os negativos a sua redução quando aumenta a variável em questão. Os parâmetros não significativos ($p > 0,05$) foram ignorados.

O grau de hidratação do etanol apresentou a maior influência na extração de compostos fenólicos, em que aumentou 51,90 mg AG/g (24%) quando a concentração etanólica passou de 14,4 para 84,6%. O efeito quadrático também foi significativo e o sinal negativo indica que houve passagem pelo ponto máximo.

O efeito da temperatura foi significativo e positivo, indicando que o aumento de 34,4 °C para 55,6 °C promoveu, em média, aumento de 7,21 mg AG/g.

Portanto, para obter elevados teores de compostos fenólicos em extratos de cravo, temperaturas entre 35 e 55 °C , mas menores de 60 °C e concentração de etanol a partir de 50% devem ser aplicados.

O modelo quadrático codificado ajustado após a análise de efeitos está representado pela Equação 2.2 e foi utilizado para obter as superfícies de resposta e gráfico de contorno (Figura 2.1)

$$\text{Fenólicos totais (mg AG/g amostra)} = 216,454 + 25,948 \times (\% \text{ etanol}) - 46,272 \times (\% \text{ etanol})^2 - 13,865 \times (\text{temperatura})^2 \quad (2.2)$$

O modelo quadrático ajustado explicou 89,1% da variação para esta especiaria. O valor $F_{\text{calculado}}$ da regressão foi três vezes maior que o F_{tabelado} , ao nível de significância de 95%.

A falta de ajuste foi significativa estatisticamente, pois o $F_{\text{calculado}}$ foi maior que o F_{tabelado} . Portanto, considerando o coeficiente de determinação alto, com o teste F de regressão (Tabela 2.5), pode-se considerar que o modelo foi válido.

Tabela 2.5 - Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais de extratos de cravo

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F
Regressão	19108,181	3	6369,394	21,803
Resíduo	2337,052	8	292,132	
Falta de ajuste	2219,48	5	443,896	11,326
Erro puro	117,57	3	39,191	
Total	21445,23	11		
$R^2 = 0,891$				

$F_{\text{tabelado } 0,95;3;8} = 4,07$; $F_{\text{tabelado } 0,95;5;3} = 9,01$

Assim, optou-se por utilizar o modelo para seleção das melhores condições de obtenção de extratos com alto teor de compostos fenólicos mesmo com a falta de ajuste sendo significativa.

A partir do modelo quadrático foi possível obter a superfície de resposta e avaliar as melhores condições de temperatura e hidratação etanólica que levaram a maior extração dos compostos fenólicos (Figura 2.1).

Figura 2.1 – Superfície de resposta e gráfico de contorno do efeito da % hidratação do etanol e da temperatura sobre o teor de compostos fenólicos totais em extrato de cravo

Caminhando pela superfície, observou-se que a temperatura de 45 °C e 49,5% de etanol foram as melhores condições aplicadas para obter quantidade de compostos fenólicos. Os extratos produzidos nas condições citadas alcançaram até 223,45 mg AG/g de compostos fenólicos, o qual foi maior do que o encontrado por Liu et al. (2007), em que extraíram 194,5 mg AG/g de cravo a uma temperatura de 30 °C e etanol a 100%.

Posteriormente, os extratos hidroalcoólicos de cravo contendo 223,45 mg AG/g foram aplicados em óleo de soja isento de antioxidante para determinação da sua capacidade antioxidante.

2.3.1.2 Modelo Experimental para a canela

Para a especiaria canela, o valor de p ($p \leq 0,05$) mostra que somente os efeitos quadráticos tiveram significativa influência sobre a extração de compostos fenólicos. Os efeitos lineares e a interação entre a temperatura e o grau de hidratação não foram significativos sobre a extração dos compostos fenólicos nesta especiaria (Tabela 2.6).

Tabela 2.6 – Estimativa dos efeitos das variáveis explanatórias sobre o teor de compostos fenólicos nos extratos de canela

	Efeito	Erro padrão	Nível descritivo (p)
Média	141,369	4,411718	0,000067*
(1) % Etanol (L)	4,143	6,248468	0,554662
% Etanol (Q)	-114,111	7,004742	0,000503*
(2) Temperatura(°C)(L)	-15,002	6,248468	0,095803
Temperatura (°C)(Q)	-32,661	7,004742	0,018618*
1L x 2L	5,955	8,823514	0,548097

*Fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p \leq 0,05$)

L = linear

Q = Quadrático

O grau de hidratação etanólico foi o parâmetro de maior influência na extração de compostos fenólicos da canela. A análise dos pontos axiais mostram que com o aumento da concentração de 0 para 99% há redução no teor de compostos fenólicos de 114, 11 mg AG/g (80,78%), quando a temperatura foi mantida no ponto central.

A influência da temperatura sobre a extração de compostos fenólicos para canela mostrou que houve redução de 32,66 mg AG/g (23,12%) quando houve um aumento de 30 para 60 °C, mantendo-se a porcentagem etanólica no ponto central.

Isso indica que o ponto ótimo para máxima extração do total de compostos fenólicos está no ponto central.

Os coeficientes não estatisticamente significativos a 95% de confiança foram excluídos e foi ajustado o modelo (2.3).

A Equação 2.3 relaciona o teor de compostos fenólicos em função das variáveis codificadas:

$$\text{Fenólicos totais (mg AG/g amostra)} = 141,369 - 57,056 \times (\% \text{ etanol})^2 - 7,500 \times (\text{temperatura}) - 16,330 \times (\text{temperatura})^2 \quad (2.3)$$

O modelo quadrático ajustado explicou 82,9% da variação. A análise de variância do modelo de regressão quadrática para canela mostrou-se significativo ($p > 0,05$) em que o valor de $F_{\text{calculado}}$ da regressão foi três vezes maior que o F_{tabelado} .

Assim como o cravo, a falta de ajuste foi significativa, com o valor de $F_{\text{calculado}}$ maior que o F_{tabelado} .

Tabela 2.7 - Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais de extratos de canela

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F
Regressão	21280,599	3	7093,533	12,914
Resíduo	4394,415	8	549,302	
Falta de ajuste	4160,85	5	832,170	10,689
Erro puro	233,56	3	77,854	
Total	25675,01	11		
$R^2 = 0,829$				

$F_{\text{tabelado } 0,95;3;8} = 4,07$; $F_{\text{tabelado } 0,95;5;3} = 9,01$

A partir do modelo quadrático ajustado, foi possível obter a superfície de resposta para analisar as melhores condições de temperatura e hidratação etanólica que levaram a maior extração dos compostos fenólicos desta especiaria. A Figura 2.2 mostra que os compostos fenólicos da canela podem ser eficientemente extraídos com etanol a 45% e temperaturas entre de 45 °C, embora seja possível o emprego de temperaturas mais baixas.

Figura 2.2 – Superfície de resposta e gráfico de contorno do efeito da % hidratação do etanol e da temperatura sobre o teor de compostos fenólicos totais em extrato de canela

O extrato de canela alcançou aproximadamente 10 vezes mais compostos fenólicos (151,9 mg AG/g) utilizando etanol a 49,5% e temperatura de 45 °C (Tabela 2.3)

O total de compostos fenólicos de pimenta preta, noz-moscada, rosa mosqueta, canela e orégano em folhas foi determinado por Su et al. (2007) através da extração a 80% metanol ou 50% acetona. Dentre as especiarias estudadas, a canela foi a que apresentou maior concentração em compostos fenólicos totais tanto com o uso de acetona (18,56 mg AG/g) quanto com metanol (14,82 mg AG/g), seguida pelo orégano (5,48 mg AG/g) em acetona, rosa mosqueta (5,09 mg AG/g) em acetona e (2,68 mg AG/g) em metanol, noz – moscada (2,62 mg AG/g) em acetona e (2,68 mg AG/g) em metanol e a pimenta preta (1,32 mg AG/g) em acetona e (0,91 mg AG/g) em metanol.

2.3.1.3 Modelo Experimental para a pimenta dedo-de-moça

Para a pimenta dedo-de-moça, o valor p ($p \leq 0,05$) mostra que todos os efeitos quadráticos e lineares tiveram influência significativa sobre a extração de compostos fenólicos. A interação entre o grau de hidratação etanólica e temperatura não foi significativa (Tabela 2.8).

Tabela 2.8 – Estimativa dos efeitos das variáveis explanatórias sobre o teor de compostos fenólicos nos extratos na pimenta dedo-de-moça

	Efeito	Erro padrão	Nível descritivo (p)
Média	60,82800	0,879803	0,000007*
(1) % Etanol (L)	-7,88325	1,246095	0,007985*
% Etanol (Q)	5,35080	1,396914	0,031351*
(2) Temperatura(°C)(L)	12,32146	1,246095	0,002200*
Temperatura (°C)(Q)	7,44325	1,396914	0,012918*
1L x 2L	3,90000	1,759621	0,113424

*Fatores estatisticamente significativos a 95% de confiança ($p \leq 0,05$)

L = linear

Q = Quadrático

O efeito linear da temperatura linear apresentou maior influência na extração de compostos fenólicos, com aumento de 12,32 mg AG/g (15,98%) quando a temperatura passou de 34,4 para 55,6 °C, em média.

O grau de hidratação do etanol demonstrou menor influência sobre a extração dos compostos fenólicos.

Portanto, para obter elevados teores de compostos fenólicos de pimenta dedo-de-moça, temperaturas acima de 55,6 °C e soluções etanólicas a partir de 85%

devem ser preferencialmente utilizados visando a aplicação em óleo. Caso contrário, enfrenta-se o problema de trabalhar com extratos aquosos em sistemas lipídicos.

A ANOVA demonstra que o $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi menor que o F_{tabelado} e a falta de ajuste significativa, o que permite concluir que o modelo quadrático não é considerado válido (Tabela 2.9). Além disso, o R^2 de apenas 61,6% evidencia que cerca de 30% da variação não pode ser explicada pelo modelo. Por este motivo, a seleção das condições de extração de compostos fenólicos a partir da pimenta se baseou apenas na análise dos efeitos.

Tabela 2.9 - Análise da variância (ANOVA) para o teor de fenólicos totais de extratos de pimenta dedo-de-moça

Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F
Regressão	539,461	4	134,865	2,804
Resíduo	336,708	7	48,101	
Falta de ajuste	327,419	4	81,855	26,438
Erro puro	9,289	3	3,096	
Total	876,169	11		
$R^2 = 0,616$				

$F_{\text{tabelado } 0,95;4;7} = 4,12$; $F_{\text{tabelado } 0,95;4;3} = 9,12$

Portanto, novos experimentos deverão ser realizados para determinar as melhores condições de extração de compostos fenólicos de pimenta dedo-de-moça. Devido a isto, não foi possível representar o modelo matemático.

Apesar disso, foi considerado que os ensaios 4 e 8 com 76,57 e 77,09 mg AG/g amostra, respectivamente, foram os maiores valores de fenólicos totais alcançados (tabela 2.3).

A Figura 2.3 mostra a superfície de resposta construída a partir do modelo quadrático não válido.

Figura 2.3 – Superfície de resposta e gráfico de contorno do efeito da % hidratação do etanol e da temperatura sobre o teor de compostos fenólicos totais em extrato de pimenta dedo-de-moça

Para a pimenta dedo-de-moça, o teor de compostos fenólicos chegou a 77,09 mg AG/g quando extraídos com teor de etanol a 49,5% e temperatura de até 60°C, evitando a degradação destas moléculas.

Alvarez-Parrilla et al. (2011) avaliaram a capacidade antioxidante de pimentas, sendo que a extração alcoólica resultou em variação de 5,68 mg AG/g a 10,28 mg AG/g dependendo da variedade da espécie avaliada.

Devido à diversidade de métodos para a extração e determinação de compostos fenólicos totais, além da diferença de cultivar, clima, a comparação de resultados com diferentes estudos torna-se muito difícil.

2.3.2 Atividade sequestrante do radical livre DPPH e ABTS^{•+}

Neste estudo, o extrato de cravo foi que apresentou a maior atividade antioxidante, seguida da canela e por fim da pimenta. Comportamento semelhante foi relatado por Hossain et al. (2008) ao estudarem a capacidade antioxidante de 30 especiarias através da análise de ABTS^{•+}: o cravo apresentou maior capacidade antioxidante seguido da canela. A pimenta caiena, da mesma família da pimenta dedo-de-moça (Família Solanaceae) apresentou capacidade antioxidante moderada, ficando atrás do cravo, canela e outras 15 especiarias. Viuda-Martos et al. (2009), ao analisarem a capacidade antioxidante de cravo, orégano, tomilho, alecrim e sálvia através do método DPPH, encontraram melhor resposta com o cravo, superando inclusive o ácido ascórbico e o BHT, nas quatro concentrações estudadas (5, 10, 20 e 50 g/L). A correlação de Pearson entre fenólicos e ABTS^{•+} e fenólicos e DPPH,

juntamente com as respectivas atividades antioxidantes encontram-se na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Correlação de Pearson para o teor de fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos de cravo, canela e pimenta dedo-de-moça (n=3)

	Cravo	Canela	Pimenta dedo-de-moça
Atividade antioxidante DPPH ($\mu\text{mol Trolox/g amostra}$)	185,80 $\pm$ 1,83a	131,76 $\pm$ 0,53b	58,90 $\pm$ 0,24c
Atividade antioxidante ABTS ⁺⁺ ($\mu\text{mol Trolox/g amostra}$)	1711,55 $\pm$ 5,83a	808,71 $\pm$ 43,40b	62,54 $\pm$ 2,62c
Fenólicos Totais X DPPH	0,9462*	0,9912**	0,9825**
Fenólicos Totais X ABTS ⁺⁺	0,9514*	0,9868**	0,9901**

**significativo ($p < 0,01$); *significativo ($p < 0,05$)

Médias seguidas pela mesma letra dentro da mesma linha não são significativamente diferentes de acordo com o teste de comparações múltiplas de Tukey

Su et al. (2007) ao estudarem a capacidade antioxidante de canela, pimenta preta, noz-moscada, rosa mosqueta e orégano, encontrou na canela o melhor desempenho pelos métodos ABTS (1064 $\mu\text{mol Trolox/g}$) e DPPH, dado este condizente e comparável com os encontrados neste estudo. Os autores também relatam desempenhos mais fracos para pimenta preta. Gallo et al. (2010) investigaram a capacidade antioxidante das especiarias canela, coentro, cominho e açafrão, relatando que tanto para o método DPPH quanto para o ABTS⁺⁺, a canela foi a que apresentou melhor resultado. Alvarez- Parrilla et al. (2011) detectaram atividade antioxidante em todas as variedades de pimentas estudadas pelo método DPPH, sendo que os valores variaram de 20,18 a 44,01 $\mu\text{mol Trolox/g amostra}$ dependendo da variedade. Um estudo comparativo das atividades antioxidantes de sete vegetais constatou que a pimenta vermelha foi a que obteve melhor resultado (23 $\mu\text{mol Trolox/g amostra}$) pelo método de DPPH, seguido da cebola vermelha, cebola branca e cebola amarela (que não apresentaram diferença significativa entre si), repolho branco (16,18 $\mu\text{mol/g amostra}$), pimenta verde (11,81 $\mu\text{mol Trolox/g amostra}$) e alho (7 $\mu\text{mol Trolox/g amostra}$). Com a metodologia de ABTS⁺⁺, a cebola vermelha e amarela obtiveram melhores resultados (e não apresentaram diferença significativa entre si), seguidas da cebola branca (39,27 $\mu\text{mol Trolox/g amostra}$), pimenta vermelha, pimenta verde e alho (não diferindo entre elas) e, por fim, repolho branco (10,50 $\mu\text{mol Trolox/g amostra}$) (GORINSTEIN et al., 2009).

Neste estudo, o comportamento das especiarias estudadas está de acordo com relatado por Hossain et al. (2008), Su et al. (2007) e Alvarez- Parrilla et al. (2011), confirmando o mais alto valor para o cravo, seguido da canela e pimenta. É possível que os fatores abióticos como altitude, e composição do solo possam explicar as diferenças de valores na capacidade antioxidante. Até onde se sabe, não há muitos trabalhos que quantifiquem a capacidade antioxidante do cravo com o padrão Trolox, o que dificulta a comparação dos resultados. O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi aplicado para medir o grau da correlação linear entre Fenólicos X DPPH e Fenólicos e ABTS^{•+} pois reflete a intensidade da relação linear entre eles. Os valores deste coeficiente “ r ” variam entre -1 (correlação negativa perfeita entre duas variáveis, ou seja, se uma aumenta a outra diminui) e 1 (correlação positiva entre as duas variáveis). O conteúdo de fenólicos totais dos extratos das três especiarias em estudo foi significativamente correlacionada pelo coeficiente de Pearson tanto para o método DPPH quanto para o ABTS^{•+}, conforme demonstrado na tabela 2.5, indicando que o conteúdo de compostos fenólicos neles existentes podem ser utilizados como um indicador importante da sua capacidade antioxidante. As três especiarias testadas demonstraram ação antioxidante em suas diferentes concentrações. Os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade da pesquisa para avaliar o poder antioxidante de substâncias isoladas das espécies estudadas.

2.4 Conclusão

A metodologia de superfície de resposta foi muito útil para avaliar a eficiência do processo de extração. O teor de compostos fenólicos nos extratos sofreu grande influência do solvente empregado no processo, com consequência distinta para cada especiaria em estudo. Temperaturas mais altas e etanol a 49,5% foram as mais eficientes na extração de compostos fenólicos das especiarias estudadas.

O cravo foi a especiaria que apresentou maior atividade antioxidante pelos métodos de DPPH e ABTS, seguido da canela e da pimenta, podendo ser considerado uma fonte promissora de antioxidante para substituição dos antioxidantes sintéticos usados pelas indústrias.

Referências

- ALMEIDA-DORIA, R.F.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 197-203, 2000.
- ALVAREZ-PARRILLA, E.; DE LA ROSA, L.A.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of fresh and processed jalapeño and serrano peppers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n.1, p.163-173, 2011.
- BANDONIENÉ, D.; VENSKUTONIS, P.R.; GRUZDIENÉ, D.; MURKOVIC, M. Antioxidative activity of sage (*Salvia officinalis* L.), savory (*Satureja hortensis* L.) and borage (*Borago officinalis* L.) extracts in rapeseed oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Frankfurt, v.104, n.5, p. 286-292, 2002.
- BAS, D.; BOYACI, I.H. Modeling and optimization I: usability of response surface methodology, **Journal Food Engineering**, London, v. 78, p. 836–845, 2007.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n.1, p. 25-30, 1995.
- BUISSA, R. ; RACANICCI, A.M.C. ; ALENCAR, S.M. Atividade Antioxidante de especiarias e condimentos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 15., 2007, Pirassununga - SP. **Anais...**São Paulo, v. 1. p. 1-1, 2007. 1 CD-ROM.
- CHIRINOS, R.; ROGEZ, H.; CAMPOS, D.; PEDRESCHI, R.; LARONDELLE, Y. Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz & Pavón) tubers. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v.55, n.2, p.217-225, 2007.
- CONTRERAS-PADILLA, M.; YAHIA, E.M. Changes in capsinoids during development, maturation, and senescence of Chile peppers and relation with peroxidase activity. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Easton, v. 46, p.2075–2079, 1998.
- DE 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 Molecular Science**, Salt Lake, v. 13, p. 3073-3084, 2012.

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

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

ESCRIBANO-BAILON, M.T.; SANTOS-BUELGA, C. Polyphenol extraction from foods. In: SANTOS-BUELGA, C.; WILLIAMSON, G. (Ed.). **Methods in Polyphenol Analysis**, United Kingdom, v.3, p. 1–16, 2003.

ESTRADA, B.; POMAR, F.; DIAZ, Z.; MERINO, F.; BERNAL, A. Evolution of capsaicinoids in *Capsicum annuum* L. var. annuum cv. Padron at different growth stages after flowering. **Capsicum Eggplant Newsletter, Capsicum Eggplant Newsletter**, Turin, v. 16, p.60–64, 1997.

ESTRADA, B.; POMAR, F.; DIAZ, Z.; MERINO, F.; BERNAL, A. Effects of mineral fertilizer supplementation on fruit development and pungency level of Padron pepper fruits. **Capsicum Eggplant Newsletter, Capsicum Eggplant Newsletter**, Turin v. 73, p. 493–497, 1998.

ESTRADA, B.; POMAR, F.; DIAZ, J.; MERINO, F. BERNAL, A. Pungency level in fruits of the Padron pepper with different water supply. **Science Horticulture**, Amsterdam, v. 81, p.385–396, 1999a.

EXARCHOU, V.; NENADIS, N.; TSIMIDOU, M.; GEROTHANASSIS, I. P.; TROGANIS, A.; BOSKOU, D. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 5294–5299, 2002.

FREIRE, J.M. **Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: caracterização química e atividade biológica sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus***. 2008. 68p. Tese (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras – UFLA, Lavras , 2008.

GALLO, M.; FERRACANE, R.; GRAZIANI, G.; RITIENI, A.; FOGLIANO, V. Microwave assisted extraction of phenolic compounds from four different spices. **Molecules**, Switzerland, v.15, p. 6365-6374, 2010.

GORINSTEIN, S.; PARK, Y.-S.; HEO, B.-G.; NAMIESNIK, J.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; HAM, K.-S.; JA-YONG CHO, J.-Y.; KANG, S.-G. A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 228, p.903–911, 2009.

GOVINDARAJAN, V. *Capsicum* production, technology, chemistry, and quality. III. Chemistry of the color, aroma, and pungency stimuli. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v.25, p.245-355, 1986.

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

HOHMANN, J.; ZUPKA, I.; REDU, D.; CSANYI, M.; FALKAY, G.; MATHE, I.; JANICSÁK, G. Protective effects of the aerial parts of *Salvia officinalis*, *Melissa officinalis*, and *Lavandula angustifolia* and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation. **Planta Medica**, New York, v.65, p.576–578, 1999.

HOSSAIN, M.B.; N.P. BRUNTON, N.P.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A.B.; WILKINSON, M. Antioxidant activity of spice extracts and phenolics in comparison to synthetic antioxidants. **Rasayan Journal of Chemistry**, Kota, v.1, n.4, p.751-756, 2008.

IORIZZI, M.; LANZOTTI, V.; DE MARINO, S.; ZOLLO, F.; BLANCO-MOLINA, M.; MACHO, A.; MUNOZ, E. New glycosides from *Capsicum annuum* L. var. *acuminatum*. Isolation, structure determination, and biological activity. **Journal Agriculture Food Chemistry**, Easton, v.49, p.2022–2029, 2001.

IWAI, K.; SUZUKI, T.; FUJIWAKE, H. Formation and accumulation of pungent principle of hot pepper fruits, capsaicin and its analogues in *Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Karayatsubusa at different stages after flowering. **Agriculture Food Chemistry**, Easton, v. 43, p. 2493–2498, 1979.

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

LIU,H.;QIU,N.; DING,H.; RUIQI YAO,R. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. **Food Research International**, Essex, v. 41, p.363–370, 2008.

KHURI, A.I.; CORNELL, J.A. **Response Surfaces: Designs and Analyses**. 2 nd ed. New York:Marcel Dekker, 1996. p.510p.

MAFART, P.; BÉLIARD, E. **Génie Industriel Alimentaire**. 1992. p. 149-179.,v.2: Techniques Séparatives.

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

MONTGOMERY, D.C. ; RUNGER, G.C. **Applied Statistics and Probability for Engineers**. 3rd ed. New York:Wiley, 2003. 820p.

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

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

OLZCAN, M. Antioxidant activities of rosemary, sage and sumac extracts and their combinations on the stability of natural peanut oil. **Journal Medical Food**, San Diego, v. 6, p. 267–270, 2003.

PEREIRA, A.A. **Efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de bactérias e fungos**. Universidade Federal de Lavras, 2006. 58p.

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 Agriculture Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 2111–2117, 2005.

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

PINO, L.M. **Influência da ração com extratos naturais na qualidade e estabilidade oxidativa da carne de frangos**. 2009. 118p. Tese (Doutorado em Nutrição Humana Aplicada) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

RAVELLI, D. **Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias**: correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial. 2011. 113p. Tese (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**, New York, v.26, n.9/10, p. 1231-1237, 1999.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in Food and Nutraceuticals**. Flórida: Ed. CRC Press LLC. 2004. 543p.

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. 110p. Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

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

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

SUKRASNO, N. ; YEOMAN, M.M. Phenylpropanoid metabolism during growth and development of *Capsicum frutescens* fruits. **Phytochemistry**, New York, v. 32, p. 839–844, 1993.

TRIANAPHYLLOU, K.; BLEKAS, G.; BOSKOU, D. Antioxidative properties of water extracts obtained from herbs of the species Lamiaceae. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v.52, p.313–317, 2001.

TSAI, T.H.; TSAI, P.J.; SU, S.C.: Antioxidant and anti-inflammatory activities of several commonly used spices. **Journal Food Science**, Chicago, v. 70, C93–C97, 2005.

VIUDA-MARTOS, M.; NAVAJAS, Y.R.; ZAPATA,E.S.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. **Flavour and Fragrance Journal**, New York, v. 25, p.13–19, 2010.

3 USO DE EXTRATOS DE ESPECIARIAS E SEU EFEITO NA ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÓLEO DE SOJA

Resumo

A oxidação lipídica é a maior causa de perda de qualidade em alimentos lipídicos. A crescente preocupação da população com hábitos mais saudáveis tem feito com que as indústrias se interessem cada vez mais em encontrar antioxidantes naturais em substituição aos sintéticos para o emprego em produtos alimentícios. As frutas, vegetais e ervas são as maiores fontes destes antioxidantes naturais, o que vêm aumentando consideravelmente as linhas de pesquisa que comprovam uma correlação entre a quantidade total de fenólicos e a atividade antioxidante. O presente trabalho teve como objetivo estudar a estabilidade oxidativa do óleo de soja isento de antioxidante, adicionado de extratos de especiarias com diferentes concentrações (50 / 100 / 150 / 200 mg kg⁻¹ em fenólicos totais), como antioxidantes naturais, além do TBHQ nas mesmas proporções, através de estudos preliminares como o teste de estufa para definição da melhor dose a ser aplicada em posterior armazenamento sob condições ambientes, de comercialização por sete meses. As variáveis estudadas foram índice de peróxido, índice de acidez, absorvibilidade na faixa do ultravioleta nos comprimentos de onda 232 nm e 270 nm e Rancimat[®]. Para finalização, foi conduzida uma avaliação sensorial com provadores treinados a fim de avaliar a aceitação do produto armazenado. O óleo adicionado de extrato de cravo foi o que mais se esteve protegido contra a oxidação lipídica, seguido da canela e pimenta (p<0,05). As amostras adicionadas de TBHQ foram as que mais se conservaram dentre todos os tratamentos, comportamento já esperado (p<0,05). A análise sensorial mostrou que o cravo e o TBHQ foram os tratamentos mais aceitos pelos provadores durante o tempo de armazenamento, seguido de canela, pimenta e controle (p<0,05). Quanto à intenção de compra, os óleos adicionados de extratos de cravo, canela e do antioxidante TBHQ tiveram uma ótima aprovação pelos provadores.

Palavras-chave: Armazenamento; Avaliação Sensorial; Antioxidantes naturais; Odor

Abstract

Lipid oxidation is a major cause of quality loss in lipid foods. The growing concern of the population about healthy and eating habits has caused increasing interest by industries in finding natural antioxidants to replace synthetic ones in food products. Fruits, vegetables and herbs are the major sources of these natural antioxidants, and the massive studies indicate a good correlation between the total amount of phenolics and the antioxidant activity. This present work meant to study the oxidative stability of soybean oil free from antioxidant, added of spice extracts as natural antioxidants in concentrations defined by preliminary results from the Schaal Oven Test in the range 50 to 200 mg kg⁻¹ total phenolic compounds, and subsequently stored at room temperature under normal commercialization conditions for seven months. The parameters studied were peroxide and acid values, absorptivity in the UV

wavelengths 232nm and 270nm and Rancimat[®]. A sensory evaluation was conducted with trained panelists to evaluate the acceptability of the product during 7 months of storage. During the storage period, clove extract showed the best results in delaying lipid oxidation among the extracts added to soybean oil, followed by cinnamon and pepper. Samples added of TBHQ showed the best performance compared to other treatments, which was expected. Sensory analysis showed that clove extract and TBHQ treatments were better accepted by the panel throughout the storage period, followed by cinnamon, pepper and control. The purchase intention revealed oils added of extracts of clove, cinnamon and the antioxidant TBHQ had a highest scores by the panelists.

Keywords: Storage; Sensory Evaluation; Odor; Natural Antioxidants

3.1 Introdução

A oxidação lipídica em alimentos produz efeitos indesejáveis, incluindo a perda dos ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis, além da formação de sabor e odor desagradável, provocando problemas de palatabilidade e rejeição dos alimentos (NAWAR, 1996).

A estabilidade oxidativa pode ser estimada pelo período de indução, baseado em determinações analíticas de índice de peróxido, dienos e trienos conjugados e voláteis de amostras de ensaios de armazenamento à temperatura ambiente ou de testes acelerados. A oxidação ocorre com uma velocidade uniforme durante o chamado período de indução, passando a uma escala próxima à logarítmica no período pós-indução. Os antioxidantes têm sido adicionados em óleos com o objetivo de prolongar o período de indução, e assim, diminuir a velocidade de instalação da deterioração oxidativa. O período de indução pode ser usado como uma medida da estabilidade oxidativa de óleos como um bom índice comparativo da efetiva proteção (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1998).

A utilização de antioxidantes sintéticos está em mudança regulamentar desde a década de 90 (Life Sciences Research Office, 1994), por apresentarem efeitos tóxicos, e devido a isso, a atenção tem se voltado para os antioxidantes naturais. Há um crescente interesse nos estudos com aditivos naturais como potentes antioxidantes. Muitas especiarias e ervas são consideradas fontes potenciais de antioxidantes naturais (GRAY, 1978; KELEN; TEPE, 2008; ERKAN et al., 2008, RACANICCI, 2004, PINO et al., 2005, PINO, 2009; RAVELLI, 2011, SHIMANO, 2012, ALVAREZ-PARRILLA et al., 2012). A atividade antioxidante das especiarias e

de seus extratos é atribuída aos compostos fenólicos que também podem atuar como supressores de radicais livres no organismo reduzindo os riscos de doenças crônicas (GUERRA; LAJOLO, 2005).

Shobana e Akhilender Naidu (2000) estudaram a atividade antioxidante de cravo, canela, pimenta, gengibre, alho, hortelã e cebola. Dentre as especiarias estudadas, o cravo apresentou a maior atividade antioxidante seguido da canela, pimenta, gengibre, hortelã e cebola.

Tomaino et al. (2005) estudaram a capacidade dos óleos essenciais de cravo, canela, tomilho, manjerição, orégano e noz-moscada em proteger o α -tocoferol contido no azeite virgem. Todos os óleos essenciais testados foram capazes de evitar a perda do α -tocoferol durante o aquecimento do óleo a 180°C durante 10 minutos. O óleo essencial mais eficiente foi o do cravo, seguido do tomilho, canela, manjerição, orégano e noz-moscada. Além disso, concluíram que os óleos essenciais em estudo exibiram boa propriedade antioxidante podendo ser utilizados de forma eficiente para controlar a oxidação lipídica durante o processamento de alimentos.

O objetivo do presente trabalho foi estudar o efeito da adição de extratos de especiarias sobre a estabilidade do óleo de soja armazenado, através de estudos preliminares com o método de estufa (Schaal Oven Test) com diferentes concentrações (50 / 100 / 150 / 200 mg kg⁻¹ em fenólicos totais) para definição da melhor dose a ser aplicada e posterior armazenamento sob temperatura ambiente em condições normais de comercialização por sete meses.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Óleo de soja

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

3.2.2 Preparo das especiarias

O cravo (*Syzygium aromaticum*) e a canela (*Cinnamomum verum*) foram adquiridos já desidratados, e a pimenta dedo-de-moça (*Capsicum annuum*) foi adquirida na forma *in natura* no Mercado Municipal de Piracicaba. A pimenta foi seca em estufa de circulação de ar (marca Fanem, modelo 315SE) a 63 °C durante 48

horas. As especiarias foram trituradas até apresentarem característica de pó e armazenadas em frasco âmbar, sob refrigeração até o momento de sua utilização.

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

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

Tabela 3.1 - Condições de preparo dos extratos de especiarias para aplicação em óleo de soja (n=2)

Especiaria	Mistura etanol:água (%etanol)	Temperatura (°C)	Teor de compostos fenólicos (mg AG/g amostra)*
Cravo	49,5	45	223,45
Canela	49,5	45	151,92
Pimenta dedo-de-moça	49,5	60	77,09

*valores expressos como média das duplicatas

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin Ciocalteau descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999), utilizando ácido gálico como padrão. O reagente de Folin Ciocalteau é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W. Foi realizada uma diluição dos extratos e em seguida 0,5 ml desta diluição foi transferida para tubos de ensaio com tampa rosca e adicionados de 2,5 mL de reagente Folin-Ciocalteau:água 1:10 (v/v). Os tubos foram rapidamente agitados em vórtex e deixados em repouso por 5 minutos e posteriormente adicionados 2 mL de carbonato de sódio 4% (m/v), submetidos novamente à agitação em vórtex e deixados em repouso por 2 horas ao abrigo de luz. Após as 2 horas, foi realizada a leitura em espectrofotômetro UV-1203 (Shimadzu) a 740 nm. Uma prova em branco foi conduzida nas mesmas condições e

os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico com base em uma curva de calibração de ácido gálico com concentração, variando de 5 a 100 µg/mL.

3.2.4 Teste acelerado em estufa ou Schaal Oven Test

O teste acelerado foi realizado com óleo de soja refinado, isento de antioxidante (tratamento controle), adicionado de antioxidante sintético TBHQ marca Eastman Chemical Company e de extratos hidroalcoólicos de cravo, canela e pimenta dedo-de-moça em estufa com circulação de ar, à temperatura de $63\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, por 36, 72, 96 horas. Foi feito uma solução estoque em concentração de 200 mg kg^{-1} para 1 L de óleo, sendo que para o cravo foi adicionado 298,35 mL extrato/1L óleo, para a canela foi adicionado 438, 83 mL extrato/1L óleo e para a pimenta 864, 79 mL extrato/1L. A partir desta solução estoque, foram feitas diluições para 50/ 100/ 150 mg kg^{-1} através da Fórmula 3.1:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \quad (3.1)$$

Em que:

C_1 = concentração inicial (estoque)

V_1 = volume da solução inicial (estoque)

C_2 = concentração final desejada

V_2 = volume final desejado

O óleo adicionado dos extratos das especiarias (solução estoque e diluições), assim como o TBHQ adicionado nas concentrações de 50/ 100/ 150 / 200 mg kg^{-1} em fenólicos totais, foram posteriormente colocados em estufa marca Scientific Co. / Thelco / Model 16 de forma aleatória. Para cada tratamento, as amostras foram preparadas em triplicata. Foram determinados o índice de peróxido, índice de acidez e absorvidade em 232 e 270 nm.

Optou-se por fazer a média dos valores encontrados em relação à dose adicionada, independente do tempo (horas) em estufa, pois o objetivo do teste era estabelecer a melhor dose de antioxidante a ser adicionado ao óleo de soja isento de antioxidante, como uma avaliação preliminar, para posterior armazenamento à temperatura ambiente por um período de sete meses.

3.2.5 Armazenamento

As amostras de óleo de soja, isento de antioxidantes, foram adicionadas de antioxidante sintético e dos extratos hidroalcoólicos de cravo, canela e pimenta dedo-de-moça na concentração de 100 mg kg^{-1} de fenólicos (melhor dose estabelecida através do teste preliminar de estufa) a partir de uma solução estoque, em procedimento idêntico ao adotado para o teste de estufa, foram embaladas em garrafas de vidro transparente de 250 mL, fechadas com tampas plásticas e armazenadas durante 7 meses. Mensalmente, foram realizadas análises de índice de peróxido, índice de acidez e absortividade em 232 nm e 270 nm. Todas as análises foram realizadas em duplicata, e o horário de início das análises foi estabelecido para às 7:30 hs da manhã. A iluminação com lâmpadas fluorescentes (potência de 32 W e 333,71 Lux) foi de 15 horas/24 horas dia (7:30 – 22:30 hs). Para garantir a uniformidade da exposição à luz, as amostras foram rearranjadas mensalmente. Durante todo o experimento tanto a temperatura ambiente quanto a Umidade Relativa do ar foram monitoradas e as médias mensais estão apresentadas na Tabela 3.4.

3.2.6 Índice de Peróxido

O índice de peróxido foi realizado segundo método Cd 8b-90 (AOCS, 2003). Foram pesados 3 g da amostra em frasco de iodo de 125 mL. Em seguida, foram adicionados 50 mL de solução de ácido acético/isooctano (3:1) e 0,5 mL de solução de iodeto de potássio saturada, após exatamente 1 minuto e adicionou-se 30 mL de água destilada juntamente com 0,5 mL de solução de amido. Por fim, titulou-se a amostra com solução de tiosulfato de sódio 0,01 N e o volume gasto forneceu a concentração em peróxidos em $\text{meq O}_2/\text{Kg}$ de amostra através da fórmula 3.2:

$$\text{IP} = \frac{N \times (a - b)}{\text{Massa da amostra (gramas)}} \times 1000 \quad (3.2)$$

Em que:

N = normalidade da solução de Na_2SO_3

Va = volume gasto para titular a amostra

Vb = volume gasto para titular o branco

p = peso da amostra

3.2.7 Índice de Acidez

Foi realizado segundo método Cd 3d-63 (AOCS, 2003), com a dissolução de 5g de amostra de óleo em 100 mL de álcool etílico neutralizado juntamente com 2 mL de fenolftaleína para indicação de cor e, posterior aquecimento em mantas aquecedoras até uma temperatura entre 60 - 65°C. Em seguida, foi titulado com solução de hidróxido de sódio padronizada. O resultado foi obtido através da fórmula 3.3:

$$IA = \frac{\text{mL gasto na titulação} \times 56,1 \times N}{\text{Massa da amostra (grama)}} = \text{mg KOH/g óleo} \quad (3.3)$$

Em que:

V = volume gasto para titular a amostra

N = normalidade da solução de NaOH

3.2.8 Absortividade na faixa do ultravioleta (UV)

A absortividade na região do ultravioleta foi determinada segundo a metodologia Ch 5-91 (AOCS, 2003). Foi utilizado o espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV 1203. Os resultados foram calculados através da equação 3.4:

$$E^{1\%}_{1\text{cm}} = \frac{A}{C} \quad (3.4)$$

Em que:

A = absorbância no comprimento de onda

C = concentração da solução de amostra, em g/100 mL

3.2.9 Estabilidade oxidativa em Rancimat®

Foi realizado de acordo com o método Cd 12b-92 da American Oil Chemists' Society (AOCS, 2003), utilizando-se o equipamento Rancimat® 743 (Metrohm AG, CH-9100 Herisau Switzerland). Para a determinação do período de indução (PI), foram utilizados 5 g de óleo sem adição de antioxidantes, adicionados de extratos hidroalcoólicos de especiarias e TBHQ na concentração de 100 mg kg⁻¹ de fenólicos. Os óleos foram aquecidos a 110 °C sob fluxo de ar seco intenso a taxa de 9L/h em duplicata no equipamento Rancimat.

3.2.10 Análise Sensorial

Para a realização da análise sensorial, foram recrutados 20 provadores entre alunos e funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (ESALQ/USP), com idade inferior a 50 anos. Para a etapa de seleção de provadores, foi realizado o teste de sensibilidade para o odor, onde foi utilizado o uso do teste triangular, sendo que cada provador recebeu três amostras de óleo, sendo informados que duas entre as amostras eram iguais. Os provadores foram instruídos a sentir o odor das amostras da esquerda para a direita, identificando qual era a diferente. O teste foi realizado durante 4 dias, no período da manhã e tarde, sendo que só passou da seleção os provadores que obtiveram 100% de acerto (8 provadores).

NOME: _____	IDADE: _____ SEXO: _____
<p>Você esta recebendo 3 amostras codificadas. Duas amostras são iguais e uma é diferente. Por favor, avalie as amostras da esquerda para a direita.</p> <p style="text-align: center;">Circule a amostra DIFERENTE.</p> <p style="text-align: center;">195 426 781</p>	
<p>COMENTÁRIOS: _____</p> <p>_____</p>	

Figura 3.1 - Modelo da ficha do teste Triangula

Após a seleção dos provadores, foi realizado um teste de ordenação com 8 provadores treinados para verificar o grau de oxidação entre os óleos de soja adicionados de extratos hidroalcoólicos de cravo, canela e pimenta dedo-de-moça, do antioxidante sintético TBHQ, todos na proporção de 100 mg kg^{-1} e isento de antioxidante, armazenados durante 7 meses.

O delineamento estatístico utilizado foi o quadrado latino incompleto de acordo com Cochran e Cox 1957, em que t = tratamentos, k = número de amostras dadas por provador, r = número de vezes nas quais uma amostra é apresentada entre os provadores do bloco, b = número de provadores por bloco, λ = número de vezes que dois tratamentos/amostras são servidos juntos.

Foi avaliada a característica sensorial de odor, através da escala de ordenação, em que os óleos foram classificados do menos oxidado para o mais oxidado, além de especificada a intenção de compra para as amostras apresentadas, conforme figura 3.2.

Nome: _____		Data: _____	
<p>Você está recebendo 5 amostras de óleo. Por favor, sinta o aroma das amostras da esquerda para a direita e ordene-as em ordem crescente de odor oxidado.</p>			
- oxidada	_____	_____	+ oxidada
Comentários: _____			
<p>Quanto à intenção de compra, responda para cada amostra: sim, não ou talvez.</p>			
Amostras	Intenção de compra		
_____	_____		
_____	_____		
_____	_____		
_____	_____		
Comentários: _____			

AROMA

CARACTERÍSTICO DE RANÇO – Sensação olfativa associada ao aroma característico óleo que sofreu ação de calor, luz e armazenamento.

Pouco: óleo armazenado por 1 mês por 15 horas de luz à temperatura ambiente.

Muito: óleo armazenado por 7 meses por 15 horas de luz à temperatura ambiente.

Figura 3.2 - Modelo da ficha de análise sensorial utilizando a escala de ordenação

Foram utilizados copinhos plásticos de cor preta, para que a cor da amostra não influenciasse a escolha dos provadores, preenchidos com quantidades iguais de

óleo e etiquetados com números aleatórios de três dígitos. As amostras foram avaliadas a uma temperatura entre 40 – 43 °C, de acordo com Faria et al. (1985). Os dados obtidos da análise sensorial foram analisados estatisticamente.

O projeto de pesquisa não precisou ser avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), pois o atributo utilizado foi somente avaliação do odor, que é o primeiro parâmetro utilizado pelos provadores para identificação de ranço, não apresentando riscos aos provadores.

3.2.11 Análise estatística

A análise estatística dos resultados físico-químicos e sensorial foi realizada através do programa Statistical Analysis System modelo 9.2 (SAS, 2005) e submetidos à análise de variância (ANOVA). O desvio padrão das médias foi calculado e a diferença estatística das médias, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), foi determinada através do teste de Tukey.

3.3 Resultados e discussões

3.3.1 Teste acelerado em estufa

Os extratos de cravo, canela e pimenta dedo-de-moça apresentaram valores médios de compostos fenólicos totais de 223,45; 151,92 e 77,09 mg AG/g amostra, respectivamente. A partir desses resultados, o óleo de soja isento de antioxidantes foi adicionado dos extratos em proporções de 50, 100, 150 e 200 mg kg⁻¹.

A tabela 3.2 apresenta os resultados de ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta UV 232 nm e 270 nm, dos óleos de soja isento de antioxidantes (controle), adicionado de extratos hidroalcoólicos de cravo, canela e pimenta dedo-de-moça e de antioxidante sintético TBHQ, nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 mg kg⁻¹, sob aquecimento a 63°C ± 2 °C. As análises foram realizadas nos tempos 0, 36, 72 e 96 horas. Optou-se por fazer uma média dos valores encontrados em relação à dose adicionada, independente do tempo (horas) em estufa, pois o objetivo do teste era estabelecer a melhor dose de antioxidante a ser adicionado ao óleo de soja isento de antioxidante, como uma avaliação preliminar, para posterior armazenamento à temperatura ambiente por um período de sete meses.

Tabela 3.2 - Ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absorvibilidade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo isento de antioxidantes, adicionados de extratos hidroalcoólicos de especiarias e TBHQ, aquecidos em estufa a 63 °C em diferentes concentrações

Dose de antioxidante usado(mg/kg)	Tratamento	AGL* (% ácido oléico)	IP* (meq O₂/Kg amostra)	UV* (232 nm) (E^{1%}_{1cm})	UV* (270 nm) (E^{1%}_{1cm})
0	Canela	0,103±0,04 ^a	2,688±1,63a	3,865±0,13a	2,829±0,1a
50		0,056±0,02b	2,184±1,28b	3,840±0,08b	2,723±0,13c
100		0,051±0,01e	1,680±0,78d	3,519±0,13e	2,652±0,1d
150		0,053±0,02d	2,016±1,05c	3,648±0,1d	2,750±0,13b
200		0,055±0,02c	2,016±1,05c	3,770±0,28c	2,630±0,16e
0	Cravo	0,103±0,04 ^a	2,688±1,63a	3,865±0,13a	2,829±0,1a
50		0,060±0,03b	1,848±0,84b	3,712±0,13c	2,668±0,08b
100		0,046±0,01d	1,428±0,67d	3,199±0,14e	2,425±0,2e
150		0,050±0,02c	1,764±0,87c	3,571±0,16d	2,613±0,19c
200		0,050±0,02c	1,848±0,84b	3,784±0,2b	2,564±0,2d
0	Pimenta	0,103±0,04 ^a	2,688±1,63a	3,865±0,13a	2,829±0,1a
50		0,060±0,02b	2,520±1,58b	3,746±0,08c	2,787±0,13c
100		0,050±0,01c	2,184±1,2d	3,573±0,11e	2,615±0,12e
150		0,060±0,02b	2,349±1,24c	3,820±0,11b	2,690±0,1d
200		0,060±0,02b	2,349±1,44c	3,733±0,14d	2,803±0,17b
0	TBHQ	0,103±0,04 ^a	2,688±1,63a	3,865±0,13a	2,829±0,1a
50		0,050±0,02b	2,016±1,05b	3,257±0,22b	2,597±0,2c
100		0,050±0,02b	1,680±0,78d	3,212±0,21d	2,467±0,21d
150		0,050±0,02b	1,750±0,87c	3,223±0,22c	2,660±0,62b
200		0,050±0,02b	1,260±0,46e	3,205±0,13e	2,438±0,24e

*Valores das médias das dose adicionadas de antioxidante por tratamento / Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, para cada tratamento, diferem significativamente (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Os óleos adicionados de extratos hidroalcoólicos de canela, cravo e pimenta, na concentração de 100 ppm foram os que apresentaram melhores resultados, ou seja, menores valores de acidez, índice de peróxido e UV a 232nm (Tabela 3.2), porém para o UV 270 nm a canela teve melhor resposta quando adicionado de 200 mg kg⁻¹. Em contrapartida, para o tratamento adicionado do antioxidante TBHQ, os melhores resultados foram observados quando houve adição de 200 mg kg⁻¹, em todas as análises realizadas.

As Figuras 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 mostram a formação de peróxidos, acidez, absorvibilidade no UV em 232 nm e em 270 nm, respectivamente, no óleo de soja isento de antioxidantes (controle), adicionado de extratos hidroalcoólicos de cravo,

canela e pimenta dedo-de-moça nas concentrações de 50, 100, 150 e 200 (mg kg^{-1}), submetidos a aquecimento em estufa à temperatura de 63 °C.

A metodologia mais empregada para avaliar a ocorrência de oxidação tanto para óleos quanto para gorduras é o índice de peróxido.

Figura 3.3 - Média dos valores de peróxido do óleo de soja adicionado de extratos hidroalcoólicos de canela, cravo, pimenta e TBHQ em diferentes concentrações, aquecidos em estufa a 63°C

Legenda: cane 50 – canela 50 mg kg^{-1} ; cane 100 – canela 100 mg kg^{-1} ; cane 150 – canela 150 mg kg^{-1} ; cane 200 – canela 200 mg kg^{-1} ; crav 50 – cravo 50 mg kg^{-1} ; crav 100 – cravo 100 mg kg^{-1} ; crav 150 – cravo 150 mg kg^{-1} ; crav 200 – cravo 200 mg kg^{-1} ; óleo 0 – óleo de soja isento de antioxidante (controle); pime 50 – pimenta 50 mg kg^{-1} ; pime 100 – pimenta 100 mg kg^{-1} ; pime 150 – pimenta 150 mg kg^{-1} ; pime 200 – pimenta 200 mg kg^{-1} ; tbhq 50 – TBHQ 50 mg kg^{-1} ; tbhq 100 – TBHQ 100 mg kg^{-1} ; tbhq 150 – TBHQ 150 mg kg^{-1} ; tbhq 200 – TBHQ 200 mg kg^{-1}

Independentemente do tratamento, o óleo de soja quando adicionado de 100 mg kg^{-1} de antioxidante foi o que apresentou uma melhor resposta, ou seja, menores valores de índice de peróxido. Nenhum dos extratos em estudo conferiu proteção semelhante ao antioxidante sintético (TBHQ), comportamento já esperado. Porém, quando comparado ao tratamento isento de antioxidante (controle), o desempenho foi significativo ($p < 0,05$) conforme relatado na Tabela 3.2, com destaque para o extrato de cravo, que foi a especiaria que resultou em menores valores de índice de

peróxido durante as 96 horas que permaneceram na estufa, seguido da canela e pimenta ($p < 0,05$). Os óleos adicionados de 50 e 200 mg kg⁻¹ de extrato de cravo não diferiram significativamente quanto ao índice de peróxido ($p < 0,05$). Comportamento semelhante ocorreu quando se adicionou 150 e 200 mg kg⁻¹ de extrato de canela e pimenta ao óleo de soja ($p < 0,05$).

Ao agrupar os resultados por tratamento (canela, cravo, pimenta, controle e TBHQ) independentemente das doses, o TBHQ foi o antioxidante que apresentou melhor resposta contra a formação de peróxido, seguido de cravo, canela, pimenta e controle ($p < 0,05$). A pimenta não diferiu estatisticamente do controle nem da canela, já o cravo foi o tratamento que não diferiu estatisticamente do TBHQ, indicando que ele é um antioxidante potente contra a formação de peróxido ($p < 0,05$).

O índice de acidez é capaz de fornecer informações do processamento ou das condições de armazenamento. Analisando os resultados da Tabela 3.2 e a Figura 3.4, o tratamento adicionado de TBHQ foi o único que não apresentou diferenças significativas independentemente da dose de antioxidante adicionada. No cravo, quando adicionado de 150 ou 200 mg kg⁻¹ também não houve diferença significativa. Para a pimenta, a única dose de antioxidante adicionada que diferiu significativamente das demais foi a de 100 mg kg⁻¹, diferentemente quando adicionado de canela, pois todas as doses diferiram estatisticamente entre si nesta especiaria ($p < 0,05$).

Figura 3.4 - Média dos valores de acidez do óleo de soja, adicionados de extratos hidroalcoólicos de especiarias e TBHQ em diferentes concentrações, aquecidos em estufa a 63 °C

Legenda: cane 50 – canela 50 mg kg⁻¹; cane 100 – canela 100 mg kg⁻¹; cane 150 – canela 150 mg kg⁻¹; cane 200 – canela 200 mg kg⁻¹; crav 50 – cravo 50 mg kg⁻¹; crav 100 – cravo 100 mg kg⁻¹; crav 150 – cravo 150 mg kg⁻¹; crav 200 – cravo 200 mg kg⁻¹; óleo 0 – óleo de soja isento de antioxidante (controle); pime 50 – pimenta 50 mg kg⁻¹; pime 100 – pimenta 100 mg kg⁻¹; pime 150 – pimenta 150 mg kg⁻¹; pime 200 – pimenta 200 mg kg⁻¹; tbhq 50 – TBHQ 50 mg kg⁻¹; tbhq 100 – TBHQ 100 mg kg⁻¹; tbhq 150 – TBHQ 150 mg kg⁻¹; tbhq 200 – TBHQ 200 mg kg⁻¹

Apesar de os tratamentos contendo 100 mg kg⁻¹ de canela, cravo e pimenta apresentarem baixos valores de acidez livre, não se pode definir um melhor tratamento com base nesse índice haja vista antioxidantes não impedirem hidrólises.

Os dados quando agrupados por tratamento independentemente da dose adicionada, diferiram estatisticamente ($p < 0,05$) do controle, indicando que a presença dos extratos, de alguma forma, inibiu a formação de ácidos graxos livres.

A absorvibilidade na faixa do ultravioleta (UV) nos fornece indícios quanto à qualidade lipídico-oxidativa. De acordo com Regitano-d'Arce (2006), a análise no UV provê informações, sempre em termos relativos, da ocorrência da auto-oxidação dos ácidos graxos, sendo acompanhada da isomerização *cis*, *trans* ou conjugações, que absorvem em comprimentos de ondas característicos na faixa do ultravioleta, com

picos de máxima para dienos conjugados em 232 nm e de trienos conjugados em 270 nm.

Ao analisar a Tabela 3.2, verifica-se que a adição dos extratos de especiarias protegeu os óleos contra a formação de dienos conjugados quando a dose foi de 100 mg kg⁻¹, diferentemente do TBHQ que teve a melhor resposta com 200 mg kg⁻¹. Todos os resultados, por tratamento, diferiram estatisticamente entre si (p<0,05).

A Figura 3.5 apresenta os dados da Tabela 3.2, ilustrando o comportamento dos antioxidantes adicionados aos óleos de soja em diferentes concentrações.

Figura 3.5 - Média dos valores de Absortividade em 232 nm do óleo de soja adicionado de extratos hidroalcoólicos de especiarias e TBHQ em diferentes concentrações, aquecidos em estufa a 63 °C

Legenda: cane 50 – canela 50 mg kg⁻¹; cane 100 – canela 100 mg kg⁻¹; cane 150 – canela 150 mg kg⁻¹; cane 200 – canela 200 mg kg⁻¹; crav 50 – cravo 50 mg kg⁻¹; crav 100 – cravo 100 mg kg⁻¹; crav 150 – cravo 150 mg kg⁻¹; crav 200 – cravo 200 mg kg⁻¹; óleo 0 – óleo de soja isento de antioxidante (controle); pime 50 – pimenta 50 mg kg⁻¹; pime 100 – pimenta 100 mg kg⁻¹; pime 150 – pimenta 150 mg kg⁻¹; pime 200 – pimenta 200 mg kg⁻¹; tbhq 50 – TBHQ 50 mg kg⁻¹; tbhq 100 – TBHQ 100 mg kg⁻¹; tbhq 150 – TBHQ 150 mg kg⁻¹; tbhq 200 – TBHQ 200 mg kg⁻¹

Quando agrupados por tratamento, independentemente das doses, mostrou que os óleos adicionados de extrato de pimenta e canela não diferiram estatisticamente do controle. O tratamento cravo não diferiu da canela e pimenta. O tratamento TBHQ foi o único apresentou comportamento diferente dos demais.

Figura 3.6 - Média dos absorvância em 270 nm do óleo de soja adicionado de extratos hidroalcoólicos de especiarias e TBHQ em diferentes concentrações, aquecidos em estufa a 63 °C

Legenda: cane 50 – canela 50 mg kg⁻¹; cane 100 – canela 100 mg kg⁻¹; cane 150 – canela 150 mg kg⁻¹; cane 200 – canela 200 mg kg⁻¹; crav 50 – cravo 50 mg kg⁻¹; crav 100 – cravo 100 mg kg⁻¹; crav 150 – cravo 150 mg kg⁻¹; crav 200 – cravo 200 mg kg⁻¹; óleo 0 – óleo de soja isento de antioxidante (controle); pime 50 – pimenta 50 mg kg⁻¹; pime 100 – pimenta 100 mg kg⁻¹; pime 150 – pimenta 150 mg kg⁻¹; pime 200 – pimenta 200 mg kg⁻¹; tbhq 50 – TBHQ 50 mg kg⁻¹; tbhq 100 – TBHQ 100 mg kg⁻¹; tbhq 150 – TBHQ 150 mg kg⁻¹; tbhq 200 – TBHQ 200 mg kg⁻¹

Para os trienos conjugados, cravo e pimenta tiveram melhores resultados quando adicionados de 100 mg kg⁻¹, já para canela e TBHQ a concentração de 200 mg kg⁻¹ teve melhor resposta ($p < 0,05$) contra a formação destes compostos (Tabela 3.2). Todas as concentrações por tratamento diferiram estatisticamente entre si.

Com o agrupamento dos dados, os óleos adicionados de extratos de canela e pimenta não diferiram estatisticamente do controle, porém diferiram do cravo e TBHQ. O controle foi diferente significativamente dos tratamentos cravo e TBHQ ($p < 0,05$). Esses resultados comprovam que o cravo, canela e pimenta são tão bons quanto o TBHQ contra a formação de trienos conjugados no óleo de soja.

Ravelli (2011) ao avaliar a estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos hidroalcoólicos (80% etanol, v/v) de alecrim, orégano, sálvia e tomilho nas concentrações de 100, 250 e 500 mg kg⁻¹, concluiu que as três doses proporcionaram o mesmo efeito antioxidante no óleo de soja. Almeida-Doria e Regitano d'Arce (2000) concluíram que 500 mg kg⁻¹ de extrato de alecrim teve uma

ação protetora comparável a 200 mg kg⁻¹ de BHA+BHT e a 1000 mg kg⁻¹ de extrato de orégano durante 5 dias de estufa a 63°C.

Shimano (2012) avaliou a estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de 100 mg kg⁻¹ de extratos hidroalcoólicos de tomilho, orégano e alecrim por 8 dias em estufa a 60 °C. Somente no sexto dia, as amostras apresentaram diferenças significativas quanto ao índice de peróxido. A absorvidade em 232 nm não diferiu entre as amostras nos seis primeiros dias de análise, enquanto que a 270 nm não houve diferença significativa entre as amostras durante os oito dias, com destaque para o alecrim, que obteve os melhores resultados.

Dos ensaios em estufa, foi escolhida a melhor dosagem de antioxidante a ser adicionada ao óleo de soja para cada especiaria. Coincidentemente, 100 mg kg⁻¹ foi a que promoveu a maior proteção para o óleo para todos os tratamentos. Identificada a concentração de extrato e antioxidante a ser adicionado ao óleo, foi conduzido o ensaio de armazenamento ambiente por um período de sete meses.

3.3.2 Estabilidade Oxidativa em Rancimat®

A Tabela 3.3 apresenta os resultados de período de indução dos óleos de soja, isento de antioxidante (controle), adicionado de 100 mg kg⁻¹ de fenólicos dos extratos hidroalcoólicos de canela, cravo e pimenta dedo-de-moça e do antioxidante sintético TBHQ fornecido pelo Rancimat.

Tabela 3.3 - Período de indução (PI) dos óleos controle e adicionado de diferentes antioxidantes na concentração de 100 ppm de fenólicos em Rancimat®

Amostras	Período de indução (h)*
Controle	7,43 ^c
TBHQ	9,5 ^a
Canela	7,35 ^c
Cravo	8,08 ^b
Pimenta	7,23 ^c

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

Os resultados apresentados na Tabela 3.3 mostraram que o óleo de soja adicionado de extrato de cravo manteve-se mais estável quando comparado ao óleo de soja adicionado das outras especiarias, contudo o mais estável de todos foi o óleo adicionado de TBHQ (p<0,05).

Os extratos de canela e pimenta pouco resistiram à alta temperatura do teste, apresentando um período de indução semelhante ao óleo de soja isento de antioxidante (controle), indicando que seus compostos ativos presentes sejam termolábeis.

Ravelli (2011) avaliou a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de 100 ppm de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, tomilho, orégano, manjerona, louro, cominho e de TBHQ na mesma concentração. Os resultados demonstraram que a adição de extrato de alecrim permitiu manter o óleo estável por um maior período, em relação aos demais extratos, contudo, o TBHQ foi o antioxidante que proporcionou maior estabilidade ao óleo de soja. Shimano (2012) estimou a estabilidade oxidativa do tomilho, alecrim e orégano na mesma concentração e concluiu que o extrato de alecrim proporcionou uma maior estabilidade ao óleo de soja seguido do tomilho e orégano.

Moreira e Mancini Filho (2003) ao avaliarem a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de 100 ppm de extratos alcoólicos de mostarda, canela e erva-doce, verificaram que o óleo adicionado de extrato de erva-doce foi o que resultou em maior tempo de indução seguido de mostarda e por fim canela.

3.3.3 Armazenamento

O armazenamento ao ambiente foi realizado, simulando as condições normais de comercialização de forma a comprovar a proteção dos extratos das especiarias durante 7 meses. Os valores médios da temperatura ambiente e umidade relativa registradas estão apresentados na tabela 3.4.

A partir dos resultados obtidos no teste de estufa, foi adicionado 100 ppm de extratos hidroalcoólicos de cravo, canela e pimenta dedo-de-moça além de TBHQ ao óleo de soja isento de antioxidante. A intensidade luminosa no ambiente em que os óleos foram armazenados foi a mesma encontrada em supermercados.

Tabela 3.4 - Temperatura e umidade relativa durante o período de armazenamento ao ambiente de óleo de soja acondicionado em embalagem de vidro

Período de armazenamento	Temperatura média (°C)	Umidade Relativa média (%)
Setembro (2012)	20,4	62,7
Outubro (2012)	25,1	65,2
Novembro (2012)	24,8	69,4
Dezembro (2012)	26,4	80,2
Janeiro (2013)	24,2	80,0
Fevereiro (2013)	24,9	81,3
Março (2013)	25,3	81,0
Abril (2013)	23,2	79,1

A tabela 3.5 apresenta os resultados de ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta (UV), em 232 e 270 nm, do óleo de soja isento de antioxidante (controle), adicionado de extratos hidroalcoólicos de cravo, canela e pimenta dedo-de-moça e do antioxidante TBHQ, todos na concentração de 100 ppm de fenólicos, armazenados em temperatura ambiente por um período de 7 meses.

Tabela 3.5 - Ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absorvidade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo isento de antioxidantes, adicionados de extratos hidroalcoólicos de especiarias e TBHQ, armazenados durante sete meses (n=3)

(continua)

Amostra	Período de armazenamento (meses)	AGL* (% ácido oléico)	IP* (meq O/kg amostra)	UV* (232 nm) (E1%1cm)	UV* (270 nm) (E1%1cm)
Controle	0	0,036±0a	1,008±0a	3,997±0,46a	2,586±0,23a
TBHQ		0,036±0a	1,008±0a	3,341±0,09a	2,629±0,02a
Cravo		0,036±0a	1,008±0a	3,326±0,40a	2,799±0,14a
Canela		0,036±0a	1,008±0a	3,469±0,12a	2,489±0,15a
Pimenta		0,036±0a	1,008±0a	3,515±0,11a	2,656±0,02a
Controle	1	0,061±0,02 ^a	2,690±0,58a	3,880±0,27a	2,837±0,27a
TBHQ		0,036±0a	1,008±0c	3,236±0,02b	2,701±0,03a
Cravo		0,042±0,01 ^a	1,008±0c	3,235±0,32b	2,718±0,09a
Canela		0,061±0,01 ^a	1,680±0,58cb	3,468±0,12ab	2,701±0,26a
Pimenta		0,061±0,01 ^a	2,016±0ab	3,538±0,11ab	2,826±0,12a
Controle	2	0,073±0a	2,690±0,58a	3,881±0,31a	2,885±0,29a
TBHQ		0,036±0c	1,008±0c	3,338±0,02b	2,633±0,01a
Cravo		0,055±0b	1,344±0,54cb	3,347±0,23b	2,643±0,23a
Canela		0,061±0,01ab	2,016±0abc	3,521±0,13ab	2,732±0,32a
Pimenta		0,067±0,01ab	2,350±0,58ab	3,583±0,14ab	2,845±0,15a
Controle	3	0,097±0,02 ^a	2,352±0,58a	3,621±0,17a	2,728±0,24a
TBHQ		0,042±0,01b	1,008±0b	2,988±0,02c	2,667±0,02a
Cravo		0,061±0,01b	1,008±0b	3,251±0,21bc	2,544±0,13a
Canela		0,068±0,01ab	2,350±0,58ab	3,390±0,02ab	2,570±0,3a
Pimenta		0,073±0ab	2,350±0,58a	3,365±0,13ab	2,746±0,13a
Controle	4	0,097±0,02 ^a	2,350±1,16a	3,792±0a	2,875±0,05a
TBHQ		0,042±0,01b	1,008±0a	3,142±0,01d	2,614±0,01c
Cravo		0,067±0,01ab	1,680±0,58a	3,262±0c	2,684±0bc
Canela		0,073±0ab	2,016±0a	3,754±0b	2,677±0,1bc
Pimenta		0,097±0,02 ^a	2,688±0,58a	3,753±0b	2,782±0,06ab
Controle	5	0,121±0,02 ^a	3,360±0,58a	3,820±0,02a	2,899±0,58a
TBHQ		0,055±0c	1,008±0c	3,393±0,01d	2,650±0,01a
Cravo		0,073±0bc	2,016±0b	3,685±0,01c	2,772±0,01a
Canela		0,097±0,02ab	3,024±0a	3,767±0,01b	2,852±0a
Pimenta		0,109±0a	3,024±0a	3,773±0b	3,111±0,3a
Controle	6	0,170±0,02 ^a	3,696±1,16a	4,225±0a	3,432±0a
TBHQ		0,067±0,01c	1,008±0b	3,252±0,57d	2,792±0d
Cravo		0,097±0,02cb	2,690±0,58ab	3,843±0,1c	2,784±0d
Canela		0,121±0,02ab	3,024±0a	4,059±0,01b	2,880±0,01c
Pimenta		0,133±0,02ab	3,360±0,58a	4,064±0,04b	3,264±0,01b

Tabela 3.5 Ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absorvidade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo isento de antioxidantes, adicionados de extratos hidroalcoólicos de especiarias e TBHQ, armazenados durante sete meses (n=3)

(conclusão)

Amostra	Período de armazenamento (meses)	AGL* (% ácido oléico)	IP* (meq O/kg amostra)	UV* (232 nm) (E1%1cm)	UV* (270 nm) (E1%1cm)
Controle	7	0,219±0a	4,370±0,58a	4,923±0a	3,663±0,01a
TBHQ		0,067±0,01d	1,008±0c	3,176±0d	2,580±0e
Cravo		0,146±0c	3,024±0b	3,784±0,01c	2,698±0,01d
Canela		0,170±0,02bc	3,360±0,58ab	4,839±0,01b	2,872±0,01c
Pimenta		0,182±0b	3,696±0,58ab	4,838±0,01b	3,282±0b

*Valores das médias das triplicatas / Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, para período, diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

No dia zero, as amostras não apresentaram resultados diferentes significativamente, mostrando-se inalteradas quando adicionadas dos extratos hidroalcoólicos das especiarias e do TBHQ, uma vez que a adição destes não deve apresentar diferenças ao produto no momento da aplicação.

A maior diferença entre os tratamentos para a acidez foi observada a partir do segundo mês de armazenamento, quando a degradação hidrolítica teve início. O tratamento isento de antioxidante (controle) diferiu estatisticamente ($p < 0,05$) dos demais desde o segundo mês, sendo que o TBHQ e o cravo apresentaram comportamentos semelhantes na maior parte do tempo. Constata-se que o cravo foi a especiaria que apresentou maior efeito contra a formação de ácidos graxos livres, seguido de canela e da pimenta ($p < 0,05$). O TBHQ foi o antioxidante mais eficiente na proteção do óleo e o controle foi o tratamento que foi mais suscetível à hidrólise, sem que se possa encontrar explicação para tal fato.

De acordo com a Resolução RDC 270, de 22 de setembro de 2005, a acidez para óleos e gorduras refinados o índice de acidez máximo permitido é de 0,6 mg KOH/g e o máxima encontrado neste trabalho foi de 0,219 mg KOH/g de ácido oléico para o controle durante todo o período que permaneceram armazenado.

Vieira (1998) observou que óleos de soja, milho e canola adicionados de antioxidantes sintéticos apresentaram aumentos gradativos e significativos do índice de acidez durante os seis meses de armazenamento. Zácari (2008) ao avaliar a capacidade antioxidante de tomilho e orégano durante seis meses de armazenamento ambiente verificou que o índice de acidez apresentou um leve crescimento, porém sem diferenças significativas, o que foi explicado pelo fato dos

óleos terem sido armazenados em embalagens de vidro, não permitindo troca de vapor de água com o ambiente, dificultando a hidrólise.

A sequência de menor eficácia contra a formação de peróxido durante os sete meses de armazenamento foi TBHQ, cravo, canela, pimenta e controle. De acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação (ANVISA, 2005), observa-se que tanto para os óleos adicionados de extratos hidroalcoólicos e TBHQ quanto para o óleo isento de antioxidante, os valores de peróxidos não ficaram nem próximos ao limite máximo permitido, de 10 meq g/Kg. Comportamento semelhante foi relatado por Siqueira (1998) ao avaliar o comportamento de antioxidantes sintéticos em óleo de soja armazenados em ambiente por seis meses, em que os valores de peróxido aumentaram em níveis muito baixos durante todo o período de armazenamento, permanecendo muito distantes dos estabelecidos pela legislação. Almeida-Doria (1999) adicionou extratos de alecrim e orégano ao óleo de soja relatando que o índice de peróxido apresentou diferença entre os tratamentos no primeiro mês de armazenamento, e nos meses seguintes não houve diferença significativa em nível de 5%. Os dados agrupados para cada tratamento para o índice de peróxido não apresentaram diferenças significativas entre controle e pimenta, sendo que a pimenta não diferiu da canela. O cravo e a canela apresentaram diferenças significativas entre si e entre os demais tratamentos durante o tempo de armazenamento.

A partir do primeiro mês de armazenamento, o controle diferiu dos demais quanto aos valores de absorvidade em 232 nm, sendo que canela e pimenta apresentaram comportamento semelhante durante todo o período de armazenamento. Dentre os antioxidantes estudados, o TBHQ apresentou melhor desempenho, seguido de cravo, canela e da pimenta ($p < 0,05$). Durante o período de armazenamento houve um pequeno incremento nos valores de dienos. Gutierrez (1995), Siqueira (1998), Almeida-Doria (1999) e Zácari (2008) não relataram aumento significativo entre os tratamentos estudados durante o período de armazenamento. Ao agrupar os resultados de cada tratamento para dienos, observou-se que durante os sete meses de armazenamento o controle não diferiu da pimenta e da canela, porém diferiu do TBHQ e do cravo. O cravo não apresentou diferença significativa com a canela.

Para a absorvidade em 270nm, a diferença significativa entre os tratamentos ocorreu a partir do quarto mês de armazenamento, provavelmente devido à

volatilização dos compostos voláteis que são formados devido a quebra dos hidroperóxidos, sendo que o cravo e o TBHQ só diferiram entre si no sétimo mês.

Através do agrupamento dos dados entre tratamentos, observou-se que para 270nm, os tratamentos controle e adicionado de extrato hidroalcoólico de pimenta não diferiram entre si, o mesmo ocorreu entre o cravo, canela e TBHQ durante o período de armazenamento.

Chatterjee e Bhattacharjee (2013) ao compararem a eficácia de extratos de cravo encapsulado e não encapsulado sobre a estabilidade oxidativa do óleo de soja durante 30 dias de armazenamento, concluíram que o extrato de cravo é um excelente antioxidante natural, tendo potencial para substituição de antioxidantes sintéticos, porém o encapsulado alcançou um melhor desempenho, pois foi permitida a liberação controlada de antioxidante, não observando qualquer atividade pró oxidante na fase inicial de armazenamento conforme observado na amostra de óleo com extrato não encapsulado.

Figura 3.7 - Índice de peróxido durante cada um dos sete meses de armazenamento para todos os tratamentos

Índice de peróxido do óleo de soja, em função do tratamento (controle – isento de antioxidante, adicionado de extratos hidroalcoólicos de canela, cravo e pimenta e de TBHQ nas concentrações de 100 ppm) para todos os períodos (7 meses de armazenamento)

A Figura 3.7 mostra a variação do índice de peróxido durante os sete meses de armazenamento para todos os tratamentos. No dia zero, o índice de peróxido

manteve-se o mesmo para todos os tratamentos. O óleo de soja adicionado de extrato hidroalcoólico de cravo foi o que promoveu uma maior proteção ao óleo em relação à formação de peróxido, depois do tratamento adicionado de TBHQ ($p<0,05$). O óleo adicionado de extrato hidroalcoólico de pimenta teve um comportamento inferior ao óleo adicionado de extratos hidroalcoólicos de cravo e canela durante o período de armazenamento, apresentando desempenho semelhante ao do controle ($p<0,05$).

Figura 3.8 - Índice de peróxido do óleo isento de antioxidantes, adicionados de extratos hidroalcoólicos de especiarias e TBHQ, armazenados durante 7 meses

Legenda: cane 0 – canela dia 0; cane 1 – canela 1º mês; cane 2 – canela 2º mês; cane 3 – canela 3º mês; cane 4 – canela 4º mês; cane 5 – canela 5º mês; cane 6 – canela 6º mês; cane 7 – canela 7º mês; crav 0 – cravo dia 0; crav 1 – cravo 1º mês; crav 2 – cravo 2º mês; crav 3 – cravo 3º mês; crav 4 – cravo 4º mês; crav 5 – cravo 5º mês; crav 6 – cravo 6º mês; crav 7 – cravo 7º mês; pim 0 – pimenta dia 0; pim 1 – pimenta 1º mês; pim 2 – pimenta 2º mês; pim 3 – pimenta 3º mês; pim 4 – pimenta 4º mês; pim 5 – pimenta 5º mês; pim 6 – pimenta 6º mês; pim 7 – pimenta 7º mês; tbhq 0 – TBHQ dia 0; tbhq 1 – TBHQ 1º mês; tbhq 2 – TBHQ 2º mês; tbhq 3 – TBHQ 3º mês; tbhq 4 – TBHQ 4º mês; tbhq 5 – TBHQ 5º mês; tbhq 6 – TBHQ 6º mês; tbhq 7 – TBHQ 7º mês; óleo 0 – controle dia 0; óleo 1 – controle 1º mês; óleo 2 – controle 2º mês; óleo 3 – controle 3º mês; óleo 4 – controle 4º mês; óleo 5 – controle 5º mês; óleo 6 – controle 6º mês; óleo 7 – controle 7º mês

A Figura 3.8 mostrou que houve uma tendência crescente quanto à formação de peróxido durante o período de armazenamento. O controle foi o tratamento mais suscetível à oxidação, porém, em contrapartida, o TBHQ foi o que apresentou uma

maior estabilidade oxidativa ($p < 0,05$). Através da Figura, conclui-se que o cravo foi a especiaria mais eficiente em prevenir a formação de peróxidos, seguida de canela e pimenta.

Figura 3.9 - Acidez durante cada um dos sete meses de armazenamento para todos os tratamentos

Acidez do óleo de soja, em função do tratamento (controle – isento de antioxidante, adicionado de extratos hidroalcoólicos de canela, cravo e pimenta e de TBHQ nas concentrações de 100 ppm) para todos os períodos (7 meses de armazenamento).

A Figura 3.9 mostrou o comportamento do óleo de soja isento de antioxidante (controle), adicionado de extratos hidroalcoólicos de cravo, canela e pimenta de doce-moça e de antioxidante TBHQ em relação a acidez durante os sete meses de armazenamento. O tratamento TBHQ não provocou alterações ao longo do período de armazenagem. O óleo de soja adicionado de extrato hidroalcoólico de cravo teve comportamento superior aos óleos adicionados de extratos de canela e pimenta, ou seja, manteve sua acidez sempre em níveis mais baixos, ficando atrás somente do TBHQ. O controle foi o tratamento que apresentou maiores índices de acidez durante todo o armazenamento.

Figura 3.10 - Acidez do óleo isento de antioxidantes, adicionados de extratos hidroalcoólicos de especiarias e TBHQ, armazenados durante 7 meses

Legenda: cane 0 – canela dia 0; cane 1 – canela 1º mês; cane 2 – canela 2º mês; cane 3 – canela 3º mês; cane 4 – canela 4º mês; cane 5 – canela 5º mês; cane 6 – canela 6º mês; cane 7 – canela 7º mês; crav 0 – cravo dia 0; crav 1 – cravo 1º mês; crav 2 – cravo 2º mês; crav 3 – cravo 3º mês; crav 4 – cravo 4º mês; crav 5 – cravo 5º mês; crav 6 – cravo 6º mês; crav 7 – cravo 7º mês; pim 0 – pimenta dia 0; pim 1 – pimenta 1º mês; pim 2 – pimenta 2º mês; pim 3 – pimenta 3º mês; pim 4 – pimenta 4º mês; pim 5 – pimenta 5º mês; pim 6 – pimenta 6º mês; pim 7 – pimenta 7º mês; tbhq 0 – TBHQ dia 0; tbhq 1 – TBHQ 1º mês; tbhq 2 – TBHQ 2º mês; tbhq 3 – TBHQ 3º mês; tbhq 4 – TBHQ 4º mês; tbhq 5 – TBHQ 5º mês; tbhq 6 – TBHQ 6º mês; tbhq 7 – TBHQ 7º mês; óleo 0 – controle dia 0; óleo 1 – controle 1º mês; óleo 2 – controle 2º mês; óleo 3 – controle 3º mês; óleo 4 – controle 4º mês; óleo 5 – controle 5º mês; óleo 6 – controle 6º mês; óleo 7 – controle 7º mês

A Figura 3.10 confirma que durante os sete meses de armazenamento, o cravo foi a especiaria que manteve a acidez mais baixa, ou seja, teve melhor desempenho em proteger o óleo contra o processo oxidativo, seguido de canela e pimenta. O TBHQ teve uma pequena variação, porém foi o tratamento que conseguiu manter o índice de acidez em níveis mais baixos. O controle foi o tratamento mais suscetível à hidrólise.

Figura 3.11 - Absortividade na faixa do ultravioleta (UV) a 232 nm durante cada um dos sete meses de armazenamento para todos os tratamentos

Absortividade na faixa do ultravioleta (UV) a 232 nm do óleo de soja, em função do tratamento (controle – isento de antioxidante, adicionado de extratos hidroalcoólicos de canela, cravo e pimenta e de TBHQ nas concentrações de 100 ppm) para todos os períodos (7 meses de armazenamento)

De acordo com a figura 3.11, o óleo de soja adicionado de TBHQ apresentou o melhor resultado contra a formação de dienos, ou seja, é o tratamento que conseguiu proteger melhor o óleo contra o processo de deterioração durante os sete meses de armazenamento ($p < 0,05$). O controle foi que apresentou maiores valores de absortividade, indicando que um processo oxidativo mais avançado ($p < 0,05$). Quanto aos extratos hidroalcoólicos das especiarias adicionados aos óleos, o cravo foi a especiaria que apresentou maior inibição da formação dos dienos em relação aos demais, seguido da canela e da pimenta ($p < 0,05$).

Figura 3.12 - Absortividade em 232 nm do óleo adicionado de extratos hidroalcoólicos de especiarias e TBHQ, armazenados durante 7 meses

Legenda: cane 0 – canela dia 0; cane 1 – canela 1° mês; cane 2 – canela 2° mês; cane 3 – canela 3° mês; cane 4 – canela 4° mês; cane 5 – canela 5° mês; cane 6 – canela 6° mês; cane 7 – canela 7° mês; crav 0 – cravo dia 0; crav 1 – cravo 1° mês; crav 2 – cravo 2° mês; crav 3 – cravo 3° mês; crav 4 – cravo 4° mês; crav 5 – cravo 5° mês; crav 6 – cravo 6° mês; crav 7 – cravo 7° mês; pim 0 – pimenta dia 0; pim 1 – pimenta 1° mês; pim 2 – pimenta 2° mês; pim 3 – pimenta 3° mês; pim 4 – pimenta 4° mês; pim 5 – pimenta 5° mês; pim 6 – pimenta 6° mês; pim 7 – pimenta 7° mês; tbhq 0 – TBHQ dia 0; tbhq 1 – TBHQ 1° mês; tbhq 2 – TBHQ 2° mês; tbhq 3 – TBHQ 3° mês; tbhq 4 – TBHQ 4° mês; tbhq 5 – TBHQ 5° mês; tbhq 6 – TBHQ 6° mês; tbhq 7 – TBHQ 7° mês; óleo 0 – controle dia 0; óleo 1 – controle 1° mês; óleo 2 – controle 2° mês; óleo 3 – controle 3° mês; óleo 4 – controle 4° mês; óleo 5 – controle 5° mês; óleo 6 – controle 6° mês; óleo 7 – controle 7° mês

O aumento do índice de peróxido com o passar do tempo pode ser correlacionado a um incremento de absorção de energia em faixas específicas do espectro na região do ultravioleta, porém com amplitudes diferentes (GAMBA; MAZZINI, 1982). Almeida-Doria e Regitano-d'Arce (2000), Vieira e Regitano-d'Arce (2001), Ravelli (2011) e Shimano (2012) também comprovaram esta boa correlação entre a absortividade em 232 e o índice de peróxido. Neste estudo também foi possível verificar esta correlação. Durante os sete meses de armazenamento, o comportamento entre os tratamentos foi semelhante, ou seja, houve um crescimento gradativo na formação de dienos, com exceção do TBHQ que manteve-se estável para peróxido, com um leve crescimento na formação de dienos.

Figura 3.13 - Absortividade na faixa do ultravioleta (UV) a 270 nm durante cada um dos sete meses de armazenamento para todos os tratamentos

Absortividade na faixa do ultravioleta (UV) a 270 nm do óleo de soja, em função do tratamento (controle – isento de antioxidante, adicionado de extratos hidroalcoólicos de canela, cravo e pimenta e de TBHQ nas concentrações de 100 ppm) para todos os períodos (7 meses de armazenamento)

Quanto à formação de trienos e voláteis, mais uma vez o tratamento adicionado de TBHQ apresentou-se como melhor antioxidante, ou seja, os valores para este antioxidante foram menores quando comparados aos demais tratamentos ($p < 0,05$). O tratamento isento de antioxidante (controle) foi o que apresentou maior suscetibilidade à oxidação ($p < 0,05$). O óleo adicionado de extrato de cravo teve um comportamento superior quando comparado aos extratos de canela e pimenta durante todo o período de armazenamento.

Figura 3.14 - Absortividade em 270 nm do óleo de soja adicionado de extratos hidroalcoólicos de especiarias e TBHQ, armazenados durante 7 meses

Legenda: cane 0 – canela dia 0; cane 1 – canela 1º mês; cane 2 – canela 2º mês; cane 3 – canela 3º mês; cane 4 – canela 4º mês; cane 5 – canela 5º mês; cane 6 – canela 6º mês; cane 7 – canela 7º mês; crav 0 – cravo dia 0; crav 1 – cravo 1º mês; crav 2 – cravo 2º mês; crav 3 – cravo 3º mês; crav 4 – cravo 4º mês; crav 5 – cravo 5º mês; crav 6 – cravo 6º mês; crav 7 – cravo 7º mês; pim 0 – pimenta dia 0; pim 1 – pimenta 1º mês; pim 2 – pimenta 2º mês; pim 3 – pimenta 3º mês; pim 4 – pimenta 4º mês; pim 5 – pimenta 5º mês; pim 6 – pimenta 6º mês; pim 7 – pimenta 7º mês; tbhq 0 – TBHQ dia 0; tbhq 1 – TBHQ 1º mês; tbhq 2 – TBHQ 2º mês; tbhq 3 – TBHQ 3º mês; tbhq 4 – TBHQ 4º mês; tbhq 5 – TBHQ 5º mês; tbhq 6 – TBHQ 6º mês; tbhq 7 – TBHQ 7º mês; óleo 0 – controle dia 0; óleo 1 – controle 1º mês; óleo 2 – controle 2º mês; óleo 3 – controle 3º mês; óleo 4 – controle 4º mês; óleo 5 – controle 5º mês; óleo 6 – controle 6º mês; óleo 7 – controle 7º mês

A Figura 3.14 mostra que o comportamento do cravo foi semelhante ao TBHQ, indicando que esta especiaria pode ser uma boa opção para substituir os antioxidantes sintéticos ($p < 0,05$). A adição de pimenta foi o tratamento menos efetivo na prevenção da oxidação depois do controle ($p < 0,05$). Entre as três especiarias estudadas, podemos concluir que o cravo foi a melhor de todas, seguido pela canela e pimenta ($p < 0,05$). Embora o TBHQ tenha sido mais eficiente em prevenir a oxidação ($p < 0,05$), a substituição deste pelas especiarias cravo e canela pode ser uma opção promissora.

3.3.4 Análise Sensorial

O teste de ordenação para verificar o grau de oxidação entre os óleos de soja adicionados ou não de extratos hidroalcoólicos foi realizado a partir do primeiro mês de armazenamento, pois o objetivo desta análise era verificar se os extratos adicionados tiveram efeito em relação ao tratamento controle (sem adição de antioxidante) e adicionado de TBHQ contra a oxidação lipídica, além da intenção de compra ao longo dos sete meses de armazenamento. A equipe sensorial era composta por sete pessoas treinadas entre sexo masculino e feminino.

Os resultados do teste de aceitação, com a utilização do teste de ordenação, do óleo de soja demonstraram que, em relação à interação tratamento x período (Tabela 3.6) e (Figuras 3.15, 3.16, 3.17 e 3.18), o óleo adicionado de extrato hidroalcoólico de cravo foi o que apresentou comportamento mais próximo do TBHQ ao longo dos sete meses. O tratamento TBHQ foi o mais bem aceito ($p < 0,05$), como era esperado, por ser um antioxidante sintético muito eficiente. Durante seis meses, o tratamento cravo, canela e TBHQ não diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$). Isso não aconteceu no sétimo mês, quando o tratamento TBHQ foi o único que se diferenciou dos demais ($p < 0,05$). O tratamento com pimenta dedo-de-moça foi o que apresentou o pior desempenho, pois durante os sete meses de armazenamento ele não diferiu do tratamento controle ($p < 0,05$).

Em relação aos tratamentos isolados, o cravo e a canela foram os únicos a apresentarem diferenças significativas durante o armazenamento, sendo que para o cravo, os meses 1 e 3 produziram a mesma resposta, não diferenciando estatisticamente entre si ($p < 0,05$).. Os meses 1 e 7 apresentaram diferença significativa para estes dois tratamentos. Tanto pimenta, controle e TBHQ não tiveram diferenças significativas durante o período de armazenamento ($p < 0,05$)..

Tabela 3.6 - Aceitação através do teste de ordenação do óleo de soja adicionado de extratos hidroalcoólicos de cravo, canela, pimenta dedo-de-moça, isento de antioxidante e adicionado de TBHQ (valores médios, $\pm$ DP, n=9)

Período (meses)	Tratamentos				
	Cravo	Canela	Pimenta	Controle	TBHQ
1	1,67 $\pm$ 1,0Bb	1,78 $\pm$ 0,6 Bb	2,67 $\pm$ 1,41ABc	3,67 $\pm$ 1,12Aa	1,44 $\pm$ 0,73Ba
2	2,11 $\pm$ 1,05ABab	2,56 $\pm$ 0,53ABab	2,89 $\pm$ 1,45Aa	3,44 $\pm$ 0,73Aa	1,33 $\pm$ 0,5Ba
3	1,22 $\pm$ 0,44Bb	2,89 $\pm$ 1,05ABab	3,22 $\pm$ 1,2Aa	3,33 $\pm$ 1,12Aa	1,56 $\pm$ 0,73Ba
4	2,22 $\pm$ 0,97ABab	2,67 $\pm$ 0,87ABab	3,11 $\pm$ 1,36ABa	4,00 $\pm$ 0,87Aa	2,00 $\pm$ 0,87Ba
5	2,33 $\pm$ 1,0BCab	3,33 $\pm$ 0,71ABCab	3,78 $\pm$ 1,3ABa	4,22 $\pm$ 0,83Aa	1,78 $\pm$ 0,83BCa
6	2,67 $\pm$ 1,0ABab	3,33 $\pm$ 1,5Abab	3,67 $\pm$ 1,22Aa	4,22 $\pm$ 0,83Aa	1,68 $\pm$ 0,71Ba
7	3,78 $\pm$ 0,83Aa	3,78 $\pm$ 1,2Aa	4,33 $\pm$ 0,71Aa	4,44 $\pm$ 0,53Aa	1,78 $\pm$ 1,09Ba

Médias com as mesmas letras maiúsculas dentro de uma linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey; médias com as mesmas letras minúsculas dentro de uma coluna não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey.

Quanto ao parâmetro intenção de compra, os óleos adicionados de extrato hidroalcoólico de cravo e TBHQ foram os que tiveram maior aceitação, sendo que 81,3% dos provadores comprariam, 17,2% não comprariam e 1,6% talvez comprassem o óleo com cravo; 92,19% comprariam, 7,81% talvez comprassem o óleo com TBHQ. Para os óleos adicionados de extrato hidroalcoólico de canela, 59,38% comprariam, 23,44% não comprariam e 17,18% talvez comprassem. Os óleos adicionados de extrato hidroalcoólico de pimenta e os óleos isentos de antioxidante foram os que tiveram maior rejeição por parte dos provadores, sendo que 31,25% comprariam, 48,44% não comprariam e 20,31% talvez comprassem o óleo adicionado de extrato de pimenta e 23,44% dos provadores comprariam, 70,31% não comprariam e 6,25% talvez comprariam os óleos isentos de antioxidantes.

Figura 3.15 - Percepção do odor durante cada um dos sete meses de armazenamento para todos os tratamentos

Através da Figura 3.15 podemos observar que, durante os sete meses de armazenamento, o cravo foi o que obteve melhor aceitação, depois do tratamento adicionado com TBHQ, pois apresentou os valores mais baixos de notas para odor (quanto maior o odor, mais os provadores detectaram o odores de ranço no óleo), seguido da canela, pimenta dedo-de-moça e do controle.

Figura 3.16 - Média das notas de odor por tratamento ao 7º mês de armazenamento

A Figura 3.16 nos mostra que a média da nota de odor de oxidado varia para cada tratamento, e que o óleo adicionado do extrato de cravo foi o que obteve menores notas médias para o odor, dentre os tratamentos adicionados de extratos hidroalcoólicos, seguido de canela e pimenta. Porém, o antioxidante TBHQ foi o que manteve o óleo mais aceitável pelo provador, ou seja, foi o tratamento que teve maior capacidade de conservar o óleo. O óleo isento de antioxidante (controle) foi o que alcançou as maiores médias de odor, ou seja, os provadores detectaram mais cheiro de oxidado ao longo dos sete meses. O cravo por ter tido médias tão baixas na avaliação sensorial, pode ser considerado uma boa alternativa natural contra a oxidação lipídica do óleo de soja.

Figura 3.17 - Média das notas de odor por período durante sete meses de armazenamento

A Figura 3.17 representa o comportamento das notas de odores durante o período de armazenamento, sendo que no primeiro mês os provadores detectaram pouco aroma de ranço, com crescimento gradativo ao longo dos sete meses. Independentemente do antioxidante usado, a tendência é que ao longo do período de armazenamento o óleo tenda a oxidar, passando a ser rejeitado pelos consumidores.

Figura 3.18 - Média do odor por tratamento durante os sete meses de armazenamento

Legenda: 1.1 - cravo 1ºmês; 1.2 - cravo 2ºmês; 1.3 - cravo 3ºmês; 1.4 - cravo 4ºmês; 1.5 - cravo 5ºmês; 1.6 - cravo 6ºmês; 1.7 - cravo 7ºmês; 2.1 - canela 1ºmês; 2.2 - canela 2ºmês; 2.3 - canela 3ºmês; 2.4 - canela 4ºmês; 2.5 - canela 5ºmês; 2.6 - canela 6ºmês; 2.7 - canela 7ºmês; 3.1 - pimenta 1ºmês; 3.2 - pimenta 2ºmês; 3.3 - pimenta 3ºmês; 3.4 - pimenta 4ºmês; 3.5 - pimenta 5ºmês; 3.6 - pimenta 6ºmês; 3.7 - pimenta 7ºmês; 4.1 - controle 1ºmês; 4.2 - controle 2ºmês; 4.3 - controle 3ºmês; 4.4 - controle 4ºmês; 4.5 - controle 5ºmês; 4.6 - controle 6ºmês; 4.7 - controle 7ºmês; 5.1 TBHQ 1ºmês; 5.2 TBHQ 2ºmês; 5.3 TBHQ 3ºmês; 5.4 TBHQ 4ºmês; 5.5 TBHQ 5ºmês; 5.6 TBHQ 6ºmês; 5.7 TBHQ 7ºmês

A Figura 3.18 salienta a interação dos tratamentos com o período, sendo que o tratamento adicionado de TBHQ obteve menores médias de odores, mostrando que os provadores praticamente não detectaram odor de ranço nestas amostras durante os sete meses de armazenamento, seguido de cravo, canela, pimenta dedo-de-moça e tratamento controle (isento de antioxidante). Tanto o tratamento adicionado de extrato de pimenta quanto o tratamento controle foram que obtiveram as maiores médias durante o tempo de armazenamento, indicando que os provadores detectaram ranço em estágios mais avançados, e que o extrato de pimenta não teve um bom desempenho como antioxidante contra a oxidação lipídica nesta pesquisa.

Embora os extratos hidroalcoólicos da canela e cravo possam ser considerados uma alternativa para a substituição de antioxidantes sintéticos, eles podem alterar o perfil sensorial do produto, afetando sua aceitação pelo consumidor.

Ravelli (2011) avaliou a preferência dos provadores ao adicionar ao óleo de soja extratos hidroalcoólicos de alecrim, orégano, tomilho, sálvia e antioxidante TBHQ. Para o aroma, os óleos adicionados de TBHQ e de extrato de alecrim ganharam uma maior preferência em relação aos óleos adicionados dos outros extratos estudados.

Farag et al. (1989) determinaram a aceitação de provadores na adição de óleos essenciais de tomilho e do cravo em diferentes concentrações em óleo de algodão como tentativa de retardar a oxidação lipídica. Os resultados indicaram que tanto o óleo essencial de cravo quanto o óleo essencial de tomilho não afetaram o odor do óleo de algodão quando adicionados em concentrações entre 50 e 1200 ppm. Concluíram ainda, que os óleos essenciais dessas duas especiarias são recomendados como antioxidantes naturais em substituição aos sintéticos para prevenir a oxidação lipídica.

3.4 Conclusões

O teste preliminar de estufa indicou que a concentração de 100 mg/kg⁻¹ foi a melhor proporção para retardar a oxidação lipídica, independentemente do extrato utilizado. Durante o armazenamento, o TBHQ foi o que teve melhor desempenho como antioxidante, seguido do cravo, canela e pimenta dedo-de-moça.

Na análise sensorial, tanto os resultados do teste de aceitação quanto o parâmetro intenção de compra concluíram que os óleos adicionados de extrato hidroalcoólico de cravo e TBHQ foram os mais bem aceitos, seguidos de canela, pimenta dedo-de-moça e por fim controle.

Referências

ALMEIDA-DORIA, R.F. **Ação antioxidante de extratos etanólicos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e orégano (*Oreganum vulgare* L.) em óleo de soja submetido à termoxidação e fotoxidação.** 1999. 71p. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

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

ALVAREZ-PARRILLA, E.; DE LA ROSA, L.A.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of fresh and processed jalapeño and serrano peppers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 59, n.1, p.163-173. 2011.

CHATTERJEE, D.; BHATTACHARJEE, P. Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: Shelf-life and frying stability of soybean oil. **Journal of Food Engineering**, London, v. 117, p. 545–550, 2013.

COCHRAN, W.G.; COX, G.M. **Experimental designs**. 2nd ed. New York: John Wiley, 1957. 618p.

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, p. 76-82, 2008.

FARAGA, R.S.; BADEL, A.Z.M.A.; EL BAROTYA, G.S.A. Influence of thyme and clove essential oils on cottonseed oil oxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 66, n.6, p. 800-804, 1989.

FARIA, E.V.; MORI, E.E.M.; YOTSUYANAGI, K. **Técnicas de análise sensorial**. Campinas: Instituto de Imprensa Universitária UFSM, 1999. p. QA-37 7 IAL. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3. ed. São Paulo, 1985. v.1.

GAMBA, P.; MAZZINI, C. Analisi dello spettro U.V. del sego e dello strutto durante il processo di autossidazione. **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, Milano, v.59, n.10, p.467-472, 1982.

GRAY, J.I. Measurement of lipid oxidation: a review. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.55, p.539-546, 1978.

GUERRA, N.B.; LAJOLO, F.M. Ação antioxidante de especiarias face a diferentes atividades de água. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.1, p.45-50, jan-mar, 2005.

GUTIERREZ, E.M.R. **Estabilidade oxidativa do óleo bruto de castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*)**. 1995. 81p. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

KELEN, M.; TEPE, B. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. **Bioresource Technology**, New York, v. 99, p. 4096-104, 2008.

LIFE SCIENCES RESEARCH OFFICE. **Evaluation of evidence for the carcinogenicity of butylated hydroxyanisole (BHA)**.
NAWAR, W.W. In: O.R. FENNEMMA (Ed.). **Food Chemistry**. p. 139-244.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI FILHO, J. Antioxidant activity of mustard, cinnamon and anise in lipidic and aqueous systems. *Nutrir e: rev. Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição* = **Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition** ., São Paulo, SP. v.25, p. 31-46, jun., 2003.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3rd.ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p.225-319.

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

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

SHAHIDI, F., WANASUNDARA, U.N. Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. In: AKOH, C.; MIN, D.B. **Foods lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1998. p. 377-396.

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. 110p. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SHOBANA, S.; AKHILENDER NAIDU, K. Antioxidant activity of selected Indian spices. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Toronto, v.62, n.2, p.107-110, 2000.

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

TOMAINO, A.; F. CIMINO, F.; ZIMBALATTI, V.; VENUTI, V.; SULFARO, V.; DE PASQUALE, A.; A. SAIJA. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, Barking, v.89, p.549-554, 2005.

VIEIRA, T.M.F.S. **Estabilidade oxidativa de óleos vegetais refinados: efeito do aquecimento por microondas**. 1998. 70p. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

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

ZÁCARI, C.Z. **Estabilidade oxidativa de óleo extra virgem de castanha do Pará com ervas aromáticas antioxidantes**. 2008. 111p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A metodologia de superfície de resposta foi uma ferramenta de extrema importância para a determinação das melhores condições de extração dos compostos fenólicos de cravo, canela e pimenta dedo-de-moça.

Nas duas metodologias adotadas para determinação de atividade antioxidante *in vitro*, tanto a DPPH quanto a ABTS, o extrato de cravo foi o mais potente, seguido da canela e pimenta dedo-de-moça.

Através do teste de estufa definiu-se 100 mg/kg^{-1} de compostos fenólicos como a melhor concentração de trabalho para os extratos das especiarias.

O óleo de soja adicionado de extrato hidroalcoólico de cravo teve o melhor desempenho antioxidativo, dentre as especiarias trabalhadas, em ensaio de armazenamento ao ambiente. O TBHQ, contudo, comprovou ser o mais eficiente antioxidante.

Em uma avaliação sensorial quanto ao aroma, detectou-se uma preferência dos provadores pelo óleo de soja adicionado de extrato hidroalcoólico de cravo, seguido da canela. A intenção de compra do óleo de soja adicionado de extrato hidroalcoólico de cravo e TBHQ foi superior à dos óleos adicionados de extratos hidroalcoólicos de canela e pimenta e do controle, indicando que seria um produto aceito no mercado.

O extrato de cravo pode ser considerado uma opção natural para substituir antioxidantes sintéticos no óleo de soja no mercado.