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

**Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos
de especiarias: correlação entre parâmetros físico-químicos
e avaliação sensorial**

Débora Ravelli

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

**Piracicaba
2011**

Débora Ravelli
Engenheira de Alimentos

**Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos
de especiarias: correlação entre parâmetros físico-químicos
e avaliação sensorial**

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

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

**Piracicaba
2011**

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

Ravelli, Débora

Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias:
correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial / Débora Ravelli. - -
Piracicaba, 2011.
113 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Análise sensorial 2. Antioxidantes 3. Compostos fenólicos 4. Condimentos
e especiarias 5. Óleo de soja I. Título

CDD 664.369
R252e

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

Dedico este trabalho à minha querida mãe e, ao mesmo tempo, melhor amiga Vera, exemplo de coragem, força, superação, dedicação e muito amor. De coração, eu te agradeço com todo o meu amor, carinho e gratidão.

Que DEUS a abençoe sempre.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, quem me planejou e me criou. Toda honra, toda glória e todo o meu louvor ao Rei dos Reis e Senhor dos Senhores.

Aos meus pais Odair (*in memoriam*) e Vera, exemplos de dedicação, esforço, honestidade, sinceridade, humildade, amizade e amor. Tenho orgulho de vocês. Amo muito vocês do fundo do meu coração. Saudade eterna do meu querido pai.

Ao meu amado marido e eterno namorado Ricardo pela compreensão, paciência, companheirismo, incentivo, dedicação, amizade, carinho e amor que você demonstra por mim em todos os momentos da minha vida. Eu te amo muito.

À minha orientadora profa. Dra. Marisa Aparecida Bismara Regitano-d'Arce pela oportunidade e incentivo concedidos nos primeiros passos da minha vida científica. Ao longo desses sete anos de orientação não faltaram amizade, carinho e confiança. Apreendi muito com seus ensinamentos e suas experiências.

À minha co-orientadora profa. Dra. Thais Maria Ferreira de Souza Vieira pela colaboração e disponibilidade em me auxiliar nos momentos de dificuldade, pela amizade e todo seu carinho.

À minha tia Dra. Regina Célia Della Modesta, exemplo de profissionalismo. Quero agradecê-la pelo incentivo de iniciar meu primeiro estágio na ESALQ/USP, pela dedicação e apoio à minha carreira profissional e todo seu amor e carinho.

À querida amiga e técnica do laboratório de Óleos e Gorduras Maria Fernanda de Almeida Prado pelo esforço, apoio, dedicação, amizade e muita alegria nas horas extras em que ficamos no laboratório. Quero agradecê-la por tudo que fez por mim.

À amiga e companheira de mestrado Marilis Y. H. Shimano por estar sempre ao meu lado disposta a ajudar. Tenho uma nova amiga, sincera, corajosa e com um coração maravilhoso. Sucesso no desenvolvimento e conclusão de sua pesquisa.

Aos estagiários Joseane, Matheus, Marina, Gabriela, Gisele e Caio por todo esforço, ajuda, perseverança, amizade e dedicação para a realização e o término dessa pesquisa. Agradeço de coração a preciosa colaboração de todos vocês.

Aos irmãos e amigos da Igreja Comunidade Restauração pelo apoio, amizade e união. Em especial, agradeço de coração aos queridos irmãos em Cristo do Grupo de Crescimento e Comunhão (GCC) pelas constantes orações.

À amiga Ana Claudia Sampaio Oliveira, exemplo de sinceridade, perseverança e coragem. Sua amizade estará sempre guardada em meu coração.

Aos companheiros de laboratório Naiane Sangaletti e Adriano Costa de Camargo pelos momentos de descontração e pelas importantes contribuições.

A todos os professores do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, em especial ao professor Dr. Severino Matias de Alencar por ceder seu laboratório e o equipamento espectrofotômetro para a realização das análises.

A todos os funcionários do Depto. de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP, em especial às técnicas do laboratório de Bioquímica Ivani Moreno e Adna Prado por todo auxílio durante a realização das análises, e também aos secretários Fábio B. Rodrigues, Regina C. C. Marafon e Maria Amábile Vendemiatti.

A todos os alunos, funcionários, professores e amigos que gentilmente participaram da análise sensorial.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

**Jesus respondeu: “Eu sou o caminho, a verdade e a vida,
ninguém pode chegar ao Pai a não ser por mim”.**

João 14:6

(Bíblia Sagrada)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	19
2 DESENVOLVIMENTO.....	22
2.1 Revisão bibliográfica.....	22
2.1.1 Processo oxidativo.....	22
2.1.2 Antioxidantes.....	25
2.1.2.1 Antioxidantes sintéticos e naturais.....	27
2.1.2.1.1 Compostos fenólicos.....	30
2.1.3 Métodos de extração e avaliação da atividade antioxidante.....	34
2.1.4 Testes acelerados de oxidação e suas aplicações.....	40
2.1.5 Especiarias.....	46
2.1.6 Legislação.....	50
2.1.7 Análise sensorial.....	50
2.1.7.1 Teste de preferência.....	52
2.2 Material e métodos.....	53
2.2.1 Matérias-primas.....	53
2.2.2 Preparo dos extratos hidroalcoólicos.....	55
2.2.3 Testes acelerados de oxidação.....	56
2.2.3.1 Teste acelerado em estufa ou <i>Schaal Oven Test</i>	56
2.2.3.2 Estabilidade oxidativa em Rancimat.....	58
2.2.4 Análises físico-químicas.....	59
2.2.4.1 Compostos fenólicos totais.....	59
2.2.4.2 Atividade antioxidante.....	60
2.2.4.3 Ácidos graxos livres (AGL).....	61
2.2.4.4 Índice de peróxido (IP).....	61
2.2.4.5 Absortividade na faixa do ultravioleta (UV).....	62

2.2.5 Análise sensorial.....	62
2.2.6 Análise estatística.....	65
2.3 Resultados e discussão.....	65
2.3.1 Matéria-prima.....	65
2.3.2 Compostos fenólicos totais.....	65
2.3.3 Atividade antioxidante.....	69
2.3.4 Testes acelerados de oxidação.....	73
2.3.4.1 Teste acelerado em estufa.....	73
2.3.4.2 Estabilidade oxidativa em Rancimat.....	86
2.3.5 Análise sensorial.....	88
3 CONCLUSÕES.....	91
REFERÊNCIAS.....	92
APÊNDICES.....	111

RESUMO

Estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionado de extratos de especiarias: correlação entre parâmetros físico-químicos e avaliação sensorial

Os antioxidantes são substâncias capazes de inibir a oxidação lipídica, responsável pela produção de compostos de cor, aroma e sabor indesejáveis. Na busca por produtos naturais associada à crescente preocupação com a saúde do consumidor, à vista dos possíveis riscos que o uso irregular dos antioxidantes sintéticos pode acarretar ao homem, torna-se essencial verificar a viabilidade do emprego de compostos naturais, com poder antioxidante, em um óleo cuja suscetibilidade à oxidação é reconhecidamente elevada. Com esse objetivo, o presente trabalho avaliou a proteção antioxidante oferecida por extratos hidroalcoólicos de especiarias ao óleo de soja. Os resultados físico-químicos do teor de compostos fenólicos totais, do sequestro do radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), Trolox, da estabilidade oxidativa, através de teste acelerado em estufa e em Rancimat, e da qualidade oxidativa, como o índice de peróxido e a absortividade na faixa do UV, foram base para a seleção dos extratos de alecrim, sálvia, tomilho e orégano, os quais apresentaram maior potencial antioxidante. Os extratos de alecrim, sálvia e tomilho, adicionados ao óleo de soja, foram igualmente eficientes em sua ação antioxidante no teste acelerado em estufa. O óleo, adicionado destes extratos, foi avaliado sensorialmente para verificar o mais preferido pelos consumidores quanto às características de cor, aroma e sabor. Houve uma preferência pelo óleo de soja adicionado de extrato de alecrim.

Palavras-chave: Oxidação lipídica; Antioxidantes naturais; Óleo vegetal; Análise sensorial

ABSTRACT

Oxidative stability of soybean oil added of spices extracts: correlation between physicochemical parameters and sensory evaluation

Antioxidants are compounds able of inhibiting lipid oxidation, responsible for the production of compounds of undesirable color, aroma and flavor. The search for natural products associated with the growing concern over the health of the consumer, in view of the possible risks that the irregular use of synthetic antioxidants can lead to man becomes essential to checking the feasibility of employing natural compounds with antioxidant power, in oil whose susceptibility to oxidation is high. With this purpose, the present study aimed to evaluate the antioxidant protection offered by hydroalcoholic extracts of spices to soybean oil. Analytical results of total phenol compounds, content of kidnapping free radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrilidrazil) substances, Trolox, oxidative stability, through accelerated test in Schaal oven and Rancimat tests, oxidative status, as the acid value and peroxide and absorptivity in the UV range, had been the basis for the selection of extracts of rosemary, sage, thyme and oregano, which presented the highest antioxidant potential. Rosemary, sage and thyme extracts added to soybean oil were similarly efficient as antioxidant in the Schaal Oven Test. Oil added of these extracts were sensorially evaluated according to their colour and flavor. Based on these sensorial characteristics, consumers preferred soybean oil added of rosemary extract.

Keywords: Lipid oxidation; Natural antioxidants; Vegetable oil; Sensory analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases da auto-oxidação de ácidos graxos.....	23
Figura 2 - Antioxidantes fenólicos.....	29
Figura 3 - Ácido gálico e ácido caféico.....	32
Figura 4 - Estrutura química do radical DPPH e sua reação com um antioxidante.....	37
Figura 5 - Reação entre o radical DPPH e um antioxidante.....	37
Figura 6 - Especiarias: alecrim (A), sálvia (S), orégano (O), manjerona (M), tomilho (T), louro (L), cominho (C) e endro (E).....	55
Figura 7 - Extratos hidroalcoólicos de alecrim, tomilho, sálvia e louro.....	56
Figura 8 - Óleo de soja, sem adição de antioxidantes, adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, tomilho, orégano, manjerona, louro e cominho, acondicionado em estufa a 63°C de forma aleatória.....	57
Figura 9 - Óleo de soja, adicionado de extratos hidroalcoólicos de especiarias, acondicionado em estufa a 63°C por 120 h.....	57
Figura 10 - Equipamento Rancimat.....	59
Figura 11 - Avaliação sensorial da cor de óleo de soja adicionado de extratos hidroalcoólicos de orégano, tomilho, sálvia, TBHQ e alecrim.....	63
Figura 12 - Avaliação sensorial do aroma de óleo de soja adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, orégano, tomilho e sálvia.....	63
Figura 13 - Avaliação sensorial do sabor de óleo de soja adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, orégano, tomilho e sálvia.....	64
Figura 14 - Compostos fenólicos totais dos extratos hidroalcoólicos de especiarias.....	65
Figura 15 - Atividade antioxidante (%) dos extratos hidroalcoólicos de especiarias.....	69
Figura 16 - Atividade antioxidante ($\mu\text{mol trolox/g amostra}$) dos extratos hidroalcoólicos de especiarias.....	71
Figura 17 - Atividade antioxidante e compostos fenólicos totais dos extratos hidroalcoólicos de especiarias.....	72
Figura 18 - Índice de peróxido (IP) do óleo de soja, isento de antioxidantes (CTL), adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de louro (L), cominho (C), alecrim (A), manjerona (M), orégano (O), tomilho (T) e sálvia (S), em função do tempo na estufa.....	75

- Figura 19 - Absortividade específica na faixa do UV (232 nm) do óleo de soja, isento de antioxidantes (CTL), adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de louro (L), cominho (C), alecrim (A), manjerona (M), orégano (O), tomilho (T) e sálvia (S), em função do tempo na estufa.....77
- Figura 20 - Absortividade específica na faixa do UV (270 nm) do óleo de soja, isento de antioxidantes (CTL), adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de louro (L), cominho (C), alecrim (A), manjerona (M), orégano (O), tomilho (T) e sálvia (S), em função do tempo na estufa.....78
- Figura 21 - Índice de peróxido (IP) do óleo de soja, isento de antioxidantes (CTL), adicionado de extratos de alecrim (A250), sálvia (S250) e tomilho (T250), na concentração de 250 mg/kg de fenólicos e adicionado de extratos de alecrim (A500), sálvia (S500) e tomilho (T500), na concentração de 500 mg/kg de fenólicos, em função do tempo na estufa.....83
- Figura 22 - Índice de peróxido (IP) do óleo de soja, isento de antioxidantes, adicionado de TBHQ, nas concentrações de 100 e 200 mg/kg e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, tomilho e sálvia, nas concentrações de 100, 250 e 500 mg/kg de fenólicos, em função do tempo na estufa.....85
- Figura 23 - Preferência dos consumidores pelo óleo de soja adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, orégano, tomilho e sálvia.....89
- Figura 24 - Curva de calibração do ácido gálico.....112
- Figura 25 - Curva de calibração do Trolox.....113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de compostos fenólicos totais nos extratos de especiarias.....	68
Tabela 2 - Ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo de soja, isento de antioxidantes, adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de especiarias, na concentração de 100 mg/kg de fenólicos, aquecido em estufa a 63°C por diferentes tempos.....	73
Tabela 3 - Ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo de soja, isento de antioxidantes e adicionado de extratos hidroalcoólicos de especiarias, na concentração de 250 mg/kg de fenólicos, aquecido em estufa a 63°C por diferentes tempos.....	79
Tabela 4 - Ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo de soja, isento de antioxidantes e adicionado de extratos hidroalcoólicos de especiarias, na concentração de 500 mg/kg de fenólicos, aquecido em estufa a 63°C por diferentes tempos.....	81
Tabela 5 - Ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo de soja adicionado de TBHQ, nas concentrações de 100 e 200 mg/kg, mantido em estufa a 63°C por 36, 72 e 96 horas.....	84
Tabela 6 - Período de indução (PI) dos óleos controle e adicionados de diferentes antioxidantes na concentração de 100 mg/kg de fenólicos.....	86
Tabela 7 - Período de indução (PI) da amostra controle e dos óleos adicionados de diferentes antioxidantes nas concentrações de 100, 200, 250 e 500 mg/kg de fenólicos.....	87
Tabela 8 - Teste de preferência do óleo de soja adicionado de TBHQ e de extratos de especiarias.....	88

1 INTRODUÇÃO

A deterioração lipídica, considerada a segunda maior causa de deterioração em alimentos, superada apenas pela microbiológica, é a grande responsável pela formação de compostos de aroma e sabor indesejáveis que levam à rejeição dos alimentos lipídicos e, com isso, afetam a qualidade físico-química, nutricional e sensorial dos alimentos. Essa oxidação lipídica é favorecida por vários fatores como composição em ácidos graxos, temperatura, tempo de armazenamento, luz, presença de metais de dupla valência e, principalmente, presença de oxigênio, os quais devem ser controlados a fim de retardar o processo oxidativo. Os antioxidantes têm sido utilizados na indústria alimentícia a fim de inibir esse processo, porém, devem ser seguros à saúde do consumidor.

A busca por antioxidantes naturais capazes de retardar a oxidação dos alimentos e de substituir os aditivos alimentares sintéticos tem despertado o interesse dos pesquisadores, de forma que esses compostos naturais têm sido extraídos de frutas, vegetais e especiarias, identificados e avaliados quanto à capacidade de combater e sequestrar os radicais livres.

Uma dieta rica em antioxidantes naturais vem sendo associada à preservação da saúde e à prevenção das doenças degenerativas. Os radicais livres, agentes envolvidos na gênese dessas patologias, presentes tanto nos alimentos quanto nos tecidos, podem reagir com as biomoléculas, lipídeos, proteínas ou mesmo o DNA, comprometendo sua ação fisiológica (GÜLCIN et al., 2003). Os antioxidantes naturais presentes na maioria das plantas têm sua ação comprovada na prevenção dessas reações (BRENNAN; PAGLIARINI, 2001; ZHENG; WANG, 2001) e na redução da incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (DROGE, 2002), prevenindo ou reparando danos ocasionados às células pelas espécies reativas de oxigênio (ERO) (CHANWITHEESUK; TEERAWUTGULRAG; RAKARIYATHAM, 2005).

Os antioxidantes são definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir as reações de oxidação dos compostos lipídicos e podem ser enzimáticos ou não-enzimáticos (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002; CHANWITHEESUK; TEERAWUTGULRAG; RAKARIYATHAM, 2005; WU et al., 2004; LIMA et al., 2006; ANDRADE et al., 2007).

As especiarias são os produtos constituídos de partes (raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes e talos) de uma ou mais espécies vegetais tradicionalmente utilizadas para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas. Condimentos ou temperos são os produtos obtidos da mistura de especiarias e de outros ingredientes, fermentados ou não, empregados para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas (BRASIL, 2005).

As especiarias têm sido pesquisadas devido ao seu teor de compostos fenólicos e, conseqüentemente, ao seu potencial antioxidante. Segundo Moreira e Mancini-Filho (2004), a capacidade antioxidante das especiarias está relacionada aos seus compostos fenólicos. Desta forma, sua ação será semelhante à dos compostos sintéticos, ou seja, interrompendo a cadeia dos radicais livres na etapa de iniciação do processo oxidativo.

Além dos possíveis riscos que o uso irregular ou indiscriminado dos antioxidantes sintéticos pode acarretar ao homem, soma-se a rejeição generalizada do consumidor aos aditivos alimentares sintéticos. Ênfase tem sido dada à identificação e purificação de novos compostos com atividade antioxidante, oriundos de fontes naturais, que possam agir sozinhos ou sinergicamente com outros aditivos, como alternativa para prolongar o tempo de conservação dos alimentos e limitar o uso dos antioxidantes sintéticos, à vista dos efeitos indesejáveis à saúde (MELO; GUERRA, 2002; KULISIC et al., 2004; SHAHIDI; ALASALVAR; LIYANA-PATHIRANA, 2007).

O alto conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) no óleo de soja é muito atraente do ponto de vista nutricional, dados os teores de ácidos graxos essenciais, linoléico (ômega 6) e linolênico (ômega 3), porém preocupantes do ponto de vista tecnológico, dada sua suscetibilidade às reações oxidativas (HUI, 1996).

A preocupação do consumidor com a saúde tem crescido a cada dia e, conseqüentemente, a busca por produtos naturais tem ocorrido de maneira proporcional. Isso tem fundamentado e incentivado os pesquisadores a encontrar substâncias oriundas de fontes naturais, com potencial antioxidante, em substituição aos convencionais antioxidantes sintéticos, cujos malefícios ao organismo foram investigados por Pokorny (2007).

Portanto, o objetivo dessa pesquisa foi determinar o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, orégano, manjerona, tomilho, louro, cominho e endro, avaliar a proteção antioxidante oferecida por estes extratos ao óleo de soja refinado, através da determinação de parâmetros físico-químicos, assim como verificar a preferência por meio da avaliação sensorial.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão bibliográfica

2.1.1 Processo oxidativo

Nos alimentos é sabido que a oxidação lipídica é a responsável pela formação de compostos de cor, aroma e sabor indesejáveis, denominados de ranço, tornando os alimentos impróprios para o consumo, além de provocar outras alterações que afetam não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, como também a integridade e a segurança desses alimentos.

Segundo Allen e Hamilton (1994), a oxidação lipídica é uma das mais importantes causas da deterioração da qualidade dos alimentos, devido à formação de odores e sabores indesejáveis, bem como a formação de substâncias potencialmente tóxicas.

A teoria mais comumente aceita estabelece que a auto-oxidação de substâncias mono e poliinsaturadas ocorre pela formação de radicais livres de ácidos graxos, na qual o átomo de carbono ativado adjacente a uma dupla ligação reage com o oxigênio formando um hidroperóxido em decorrência do que a dupla ligação original entra em ressonância e origina isômeros posicionais e geométricos (ROVELLINI; CORTESI; FEDELI, 1997).

O processo de auto-oxidação nos alimentos divide-se em três fases: iniciação, propagação e término, conforme apresentadas na Figura 1. Na fase de iniciação, o ácido graxo insaturado forma um radical livre, através da abstração de um átomo de hidrogênio de sua molécula, que reage rapidamente com o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) formando um radical peróxido. A fase de propagação envolve a continuação e a aceleração desta reação em cadeia. O término é o estágio em que os radicais livres começam a reagir entre si formando espécies não-radicaais estáveis. A oxidação pode ocorrer também na presença de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), quando do ácido graxo insaturado formar-se um hidroperóxido pela introdução direta em um dos carbonos da dupla ligação (REGITANO-D'ARCE, 2006).

Iniciação:

Ativação

Propagação:

Decomposição do hidroperóxido:

Término:

Em que:

RH = triglicerídeo ou ácido graxo insaturado

OH = grupamento hidroxila

R• = radical livre

RO• = radical alcóxila

ROO• = radical peróxila

ROOH = hidroperóxido

Figura 1 - Fases da auto-oxidação de ácidos graxos
Fonte: Belitz e Grosch (1999).

Durante a oxidação de lipídeos, diversas reações de decomposição ocorrem simultaneamente, levando à formação de misturas complexas de produtos, incluindo aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos. Vários desses produtos são voláteis e,

portanto, contribuem para a formação do aroma característico de ranço nos alimentos lipídicos (ALLEN; HAMILTON, 1994).

O oxigênio molecular e seus radicais são os reagentes mais importantes na bioquímica dos radicais livres nas células aeróbicas. O termo "espécie reativa de oxigênio" (ERO) inclui os radicais livres contendo oxigênio, como o ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($HO\bullet$), o radical peroxila ($ROO\bullet$) e as espécies não radicais como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2), os quais são frequentemente gerados como subprodutos de reações biológicas ou por fatores exógenos (GYAMFI; YONAMINE; ANIYA, 1999; GÜLCIN et al., 2003).

A ERO pode causar um grande número de desordens celulares ao reagir com lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Esta espécie está envolvida tanto no processo de envelhecimento, como também em muitas complicações biológicas, incluindo inflamação crônica, problemas respiratórios, doenças neurodegenerativas, diabetes mellitus, aterosclerose, doenças auto-imune das glândulas endócrinas, carcinogênese e mutagênese (GYAMFI; YONAMINE; ANIYA, 1999; AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002; GÜLCIN et al., 2003; CHANWITHEESUK; TEERAWUTGULRAG; RAKARIYATHAM, 2005).

Os radicais de oxigênio (radicais hidroxila e peroxila) e o ânion superóxido têm um papel importante nas reações bioquímicas e fisiológicas do corpo humano. No entanto, se houver produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos patofisiológicos ou causados por fatores ambientais adversos e não existirem antioxidantes disponíveis *in vivo*, possivelmente ocorrerão doenças e graves danos aos tecidos (SHAHIDI; NACZK, 2003; MOLYNEUX, 2004; HUANG; OU; PRIOR, 2005).

As substâncias com núcleo fenólico, como os tocoferóis, os flavonóides e os ácidos fenólicos, destacam-se como antioxidantes por atuarem como eficientes captadores das espécies reativas de oxigênio, além de reduzirem e quelarem íons férrico que catalisam a peroxidação lipídica (AL-MAMARY; AL-MEERI; AL-HABORI, 2002; NAHAR; SARKER, 2005; DELAZAR et al., 2006). Estas substâncias atuam como antioxidantes primários, promovendo a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante o início ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a essas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (HUANG; OU;

PRIOR, 2005). Já os ácidos ascórbico e cítrico atuam como antioxidantes secundários por mecanismos diversos, que não envolvem a redução direta dos radicais livres, mas que incluem a ligação com íons metálicos, a redução de oxigênio, a conversão de hidroperóxidos a espécies não-radicais, a absorção de radiação ultravioleta ou a desativação do oxigênio singlete (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2001).

De acordo com Rice-Evans, Miller e Paganga (1996), os antioxidantes estão sendo adicionados em óleos, gorduras e alimentos processados a fim de prevenir ou retardar a deterioração oxidativa desses alimentos suscetíveis à oxidação.

Portanto, para evitar a autooxidação há a necessidade de diminuir a incidência de todos os fatores que a favorecem e que são responsáveis pelo desencadeamento do processo de formação dos radicais livres, evitando ao máximo o contato com o oxigênio e bloqueando a formação de radicais livres por meio dos antioxidantes.

2.1.2 Antioxidantes

Os antioxidantes são elementos essenciais a uma dieta saudável. Os pesquisadores descobriram que substâncias presentes nas plantas podem conferir resistência natural a males do organismo como as doenças cardiovasculares e o câncer. Os alimentos ativam as próprias defesas do organismo e demonstram-se capazes até mesmo de retardar o crescimento de tumores. Dentre as fontes naturais de antioxidantes incluem-se: cebola, alho, frutas vermelhas e cítricas, tomate, maçã, brócolis, espinafre, cenoura, nozes, chá-verde, ervas aromáticas, feijão-de-soja, entre outras (MCKEITH, 2009).

Segundo McKeith (2009), uma das teorias mais interessantes e cientificamente aceitas é que o envelhecimento ocorre pelo estresse oxidativo ou oxidante. Embora o oxigênio seja essencial à vida, trata-se de uma substância química altamente reativa no organismo, responsável pela oxidação. Os radicais livres reagem com o DNA promovendo danos celulares e afetando sua multiplicação. Estes danos são um dos principais fatores contribuintes para os sinais visíveis do envelhecimento prematuro, assim como para as doenças crônicas que normalmente acompanham o envelhecimento, como o câncer, as doenças cardíacas, a doença de Alzheimer, a catarata, as infecções do sistema respiratório, entre outras.

Os antioxidantes são substâncias capazes de inibir ou impedir a oxidação dos alimentos. De acordo com Ali et al. (2008), estas substâncias ajudam o organismo a combater o estresse oxidativo, causado às células pelos radicais livres. Estes radicais são espécies químicas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, os quais são extremamente instáveis e responsáveis pela destruição de outras células através da captura de elétrons com a finalidade de alcançar estabilidade.

Os antioxidantes são divididos em duas classes: com atividade enzimática e sem essa atividade. Os antioxidantes enzimáticos, como o superóxido dismutase, a catalase, a glucose oxidase, a glutathione peroxidase e a glutathione reductase, e os não-enzimáticos, como o α -tocoferol (vitamina E), o β -caroteno (precursor da vitamina A), o ácido ascórbico (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos e taninos) são capazes de cercear o início da oxidação, através da remoção das espécies reativas ao oxigênio, interagindo com os radicais (BAILEY, 1996; KOLEVA et al., 2002; HALLIWELL, 2001). Dentre os não-enzimáticos, incluem-se os antioxidantes naturais e os sintéticos (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinérgicos, removedores de oxigênio singlete, agentes quelantes e antioxidantes mistos (BAILEY, 1996).

Os antioxidantes contendo um grupamento fenólico são os mais importantes nos alimentos (BELITZ; GROSCH, 1999) e denominam-se antioxidantes primários (REISCHE, 1998).

Os antioxidantes primários são substâncias fenólicas que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante o início ou a propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo as reações em cadeia. Os antioxidantes primários mais comuns são o butil hidroxianisol (BHA), o butil hidroxitolueno (BHT), o terc-butil-hidroquinona (TBHQ), os galatos de propila (PG) e dodecila e os tocoferóis (GIESE, 1996), além do etoxiquim (1,2-dihidro-6-etoxi-2,2,4-trimetil quinolina) (BELITZ; GROSCH, 1999).

Os sinérgicos são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar ou recuperar a atividade dos antioxidantes primários quando utilizados em combinação adequada com eles. O fenômeno de sinergismo entre os antioxidantes sintéticos se produz quando uma mistura de antioxidantes tem uma

atividade mais acentuada do que a atividade dos antioxidantes individuais. São conhecidos dois tipos de sinergismo, um deles que implica a ação de aceptores de radicais livres misturados e outro que combina a ação de um aceptor de radical livre e um quelante de metais (GUNSTONE; NORRIS, 1983).

Alguns antioxidantes primários quando usados em combinação também podem atuar sinergicamente (KOLEVA et al., 2002). Os antioxidantes sinérgicos podem ser compostos orgânicos e inorgânicos e, geralmente, têm caráter ácido. Neste grupo incluem os ácidos cítrico, fosfórico e ascórbico e os fosfatídeos (GUNSTONE; NORRIS, 1983).

Segundo Lundberg (1962), os sinérgicos agem regenerando antioxidantes primários, ligando íons metálicos pró-oxidantes ou inibindo a decomposição dos hidroperóxidos, tornando-os eficientes por mais tempo.

Os removedores de oxigênio singlete são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis, tornando-o, conseqüentemente, indisponível para atuar como propagador da autooxidação. O ácido ascórbico, seus isômeros e seus derivados são os melhores exemplos desse grupo, atuando também como sinergistas na regeneração dos antioxidantes primários (BELITZ; GROSCH, 1999).

Os agentes quelantes/sequestrantes de metais complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular promove a ação de complexação. Os exemplos mais comuns são o ácido cítrico e seu éster de monoglicerídeo, lipofílico, o ácido fosfórico e seus derivados polifosfatos e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (BAILEY, 1996; KOLEVA et al., 2002).

Os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonóides e derivados do ácido cinâmico (BAILEY, 1996; KOLEVA et al., 2002).

2.1.2.1 Antioxidantes sintéticos e naturais

O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos, presentes na maioria das plantas, os quais inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (DROGE, 2002).

O estresse oxidativo fisiológico ocorre como um desequilíbrio entre o balanço pró-oxidante/antioxidante, em favor da situação pró-oxidante, promovendo um dano potencial para o surgimento de um grande número de doenças crônico-degenerativas (doenças cardiovasculares, câncer e doenças neurológicas) (KIM; JEONG; LEE, 2003).

De acordo com Ordóñez (2005), os antioxidantes adicionados aos alimentos não devem causar efeitos negativos quer sejam tecnológicos ou fisiológicos. Devem ser lipossolúveis, resistentes ao tratamento ao qual seja submetido o alimento, ativos em baixas temperaturas e econômicos.

Os antioxidantes sintéticos e os naturais incluem-se no grupo dos não-enzimáticos (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004). Para serem utilizados nos alimentos, devem ser seguros à saúde (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

Os principais antioxidantes sintéticos, utilizados habitualmente nos alimentos, são os fenóis com várias substituições no anel. A eficácia de um antioxidante está relacionada com muitos fatores, como a energia de ativação, as constantes de velocidade, o potencial de óxido-redução, a facilidade com a qual se pode destruir ou perder o antioxidante e a sua solubilidade. Os antioxidantes fenólicos são excelentes doadores de elétrons ou de hidrogênio e, além disso, seus radicais intermediários são relativamente estáveis devido à falta de posições moleculares apropriadas para serem atacados pelo oxigênio molecular (GOMEZ, 2003).

Segundo Regitano-d'Arce (2006), os antioxidantes sintéticos são utilizados com a finalidade de reduzir a extensão da fase de propagação da reação de oxidação, entretanto, apresentam o inconveniente de serem voláteis e se decomporem em altas temperaturas, com baixo *carry through*, ou seja, baixa estabilidade do produto final.

Os riscos à saúde associados ao consumo crônico desses aditivos alimentares sintéticos merecem atenção (MARTINEZ-TOME et al., 2001). Os antioxidantes BHA e BHT podem apresentar certa toxicidade e eficiência mais baixa que alguns antioxidantes naturais. Já o TBHQ, quando comparado aos demais aditivos alimentares

sintéticos, tem demonstrado alto potencial antioxidante (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1998).

Os antioxidantes sintéticos mais amplamente utilizados pela indústria alimentícia são BHA, BHT e TBHQ. Entretanto, durante o processamento térmico a 185°C, ocorrem volatilização e decomposição desses antioxidantes (HAMAMA; NAWAR, 1991). A Figura 2 apresenta a estrutura molecular dos antioxidantes sintéticos BHA, BHT, TBHQ, etoxiquim e dos galatos de propila e dodecila.

Figura 2 - Antioxidantes fenólicos
Fonte: Regitano-d'Arce (2006).

Dentre os antioxidantes fenólicos apresentados na Figura 2, o TBHQ é o mais eficiente, em especial para óleos vegetais. É resistente a altas temperaturas, menos volátil que o BHA e o BHT e tem *carry through* razoável em produtos assados e excelente em frituras, comparável ao do BHA (NAWAR, 1985; COPPEN, 1994; VALENZUELA; NIETO, 1996; REISCHE, 1998).

Os antioxidantes naturais, com ação quelante, sequestrante do oxigênio singlete, desativador de metais pró-oxidantes, além de preservar os alimentos, prolongando o seu *shelf life*, podem agir como substâncias nutracêuticas, proporcionando benefícios à saúde dos consumidores (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; KAHKONEN et al., 2004).

Frutas e outros vegetais contêm substâncias antioxidantes distintas, cujas atividades têm sido comprovadas nos últimos anos. A presença de compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos, antocianinas, além dos já conhecidos vitaminas C, E e carotenóides, contribuem para os efeitos benéficos desses alimentos (SILVA et al., 2004; AJAIKUMAR et al., 2005). A maioria destes compostos possui uma base molecular semelhante, ou seja, pelo menos um anel aromático e um grupo hidroxila, incluindo os ácidos fenólicos, flavonóides, isoflavonas, ésteres de galato (taninos hidrolisáveis), ligninas, cumarinas, estilbenos, flavononas e protoantocianidinas oligoméricas. Juntos, estes compostos produzem um arranjo de antioxidantes que pode agir por diferentes mecanismos para conferir um sistema de defesa efetivo contra o ataque dos radicais livres (SHAHIDI, 1997).

O número de diferentes substâncias antioxidantes em algumas plantas pode alcançar a casa dos 40 (42 na soja, 36 nos chás, 35 no funcho, 34 no orégano, 32 na cebola e 32 no tomilho). Um alto teor de antioxidantes foi encontrado em nozes, goiaba, coco, dentre outras plantas menos conhecidas (KAHKONEN et al., 2004).

Muitos autores relataram que os extratos de várias sementes oleaginosas possuem propriedades antioxidantes, as quais em alguns casos exercem um melhor efeito que o observado pelos antioxidantes sintéticos nas mesmas concentrações (AMAROWICZ et al., 1993; OOMAH; KENASCHUK; MAZZA, 1995).

Segundo Nakatani (1996), os antioxidantes sintéticos são muito efetivos e estáveis, entretanto, seu uso, como aditivos alimentares, é restrito em muitos países devido à possibilidade de promoverem efeitos indesejáveis às enzimas dos órgãos humanos. Como resultado, há um grande interesse de se encontrar novos compostos que sejam seguros, provenientes de fontes naturais e apresentem potencial antioxidante.

2.1.2.1.1 Compostos fenólicos

Inúmeros compostos naturais encontrados em frutas, cereais e outros vegetais apresentam atividade antioxidante. Entre os mais importantes antioxidantes naturais estão os compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos e taninos), os nitrogenados (alcalóides, aminoácidos, fosfolipídeos, peptídeos, aminas e derivados da clorofila), os

pigmentos carotenóides, os tocoferóis, o ácido ascórbico, o ácido fítico e os esteróis (AMAROWICZ et al., 2004).

Na maioria dos alimentos não processados, os antioxidantes estão presentes naturalmente, conferindo a eles proteção contra o ataque oxidativo. Entre os antioxidantes presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos, tais como os flavonóides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar os radicais livres (DECKER, 1998).

Os compostos fenólicos são essenciais para o crescimento e reprodução vegetal, formando-se em condições de estresse como infecções, ferimentos, radiações ultravioletas, dentre outras, e se caracterizam pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, responsáveis pelas propriedades antioxidantes (FERGUSON; HARRIS, 1999; NACZK; SHAHIDI, 2004).

Os compostos fenólicos podem inibir tanto a lipoxigenase como a cicloxigenase, enzimas da biossíntese dos eicosanóides. Dada a importância antioxidante dos compostos fenólicos para estudos *in vitro* e *in vivo*, devido à implicação destas substâncias na inibição de enzimas de substâncias de resposta inflamatória, questionam-se como essas substâncias fenólicas atuam no metabolismo dos ácidos graxos como, por exemplo, os das séries *n*-3 ou ω -3 e *n*-6 ou ω -6 (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides e os não-flavonóides, ambos metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais (BURNS et al., 2001). Do primeiro grupo fazem parte os flavanóis (taninos, catequina, epicatequina e epigallocatequina), os flavonóis (campferol, quercetina, miricetina e rutina), as flavonas (isoflavonas), as antocianinas e as antoxantinas; ao segundo grupo pertencem os ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxibenzóico (ácidos vanílico, siríngico, gentísico, salicílico, elágico e gálico) e os ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico, tais como os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico (TSANG et al., 2005).

A Figura 3 ilustra dois ácidos fenólicos, um derivado do ácido hidroxibenzóico (à esquerda) e o outro derivado do ácido hidroxicinâmico (à direita), ambos pertencentes ao grupo dos não-flavonóides.

Figura 3 - Ácido gálico e ácido caféico
Fonte: Yanishlieva, Marinova e Pokorny (2006).

Vários efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos aos compostos fenólicos presentes nas frutas, vegetais, chás, vinhos e especiarias. Estudos epidemiológicos, clínicos e *in vitro* indicam múltiplos efeitos biológicos relacionados à ingestão desses componentes, tais como atividades antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica, minimizando os danos oxidativos no organismo animal (DELMAS; JANNIN; LATRUFFE, 2005). Além destas, exibem propriedades antialérgica, antiarteriogênica, antitrombótica, cardioprotetiva e vasodilatadora (YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNY, 2006).

Há evidências de que os compostos fenólicos encontrados em uvas e vinhos tintos podem inibir a oxidação *in vitro* da lipoproteína de baixa-densidade (LDL), assim como é possível seu uso na prevenção da aterosclerose, porém, seu principal efeito tem sido atribuído à sua ação antioxidante em alimentos (FRANKEL; WATERHOUSE; TEISSEDRE, 1995; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Além de potentes antioxidantes, os fenólicos são também conhecidos como antagonistas naturais de patógenos, presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares e proteínas (CATANEO et al., 2008).

Os flavonóides, compostos fenólicos presentes em todas as partes da planta, merecem destaque, sendo responsáveis por diversas ações farmacológicas, como a ação antioxidante, minimizando o efeito dos radicais livres (ANTOLOVICH et al., 2002;

WU et al., 2004). Inúmeros estudos realizados com os compostos fenólicos, especialmente os flavonóides (antoxantinas e antocianinas), demonstram a capacidade de sequestrar radicais livres (atividade antioxidante) e seus efeitos na prevenção de doenças cardiovasculares e circulatorias (STOCLET et al., 2004), cancerígenas, no diabetes e no mal de Alzheimer (ABDILLE et al., 2005).

Pesquisas têm evidenciado que os polifenóis possuem efeitos significativos na prevenção do câncer e, além disso, evidências epidemiológicas demonstraram uma correlação inversa entre doenças cardiovasculares e consumo de alimentos ricos em substâncias fenólicas, possivelmente devido às propriedades antioxidantes destas substâncias (NINFALI et al., 2005).

O balanço entre o estresse oxidativo e as funções antioxidantes dos organismos vivos parece ter um papel importante na carcinogênese. Estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado evidências de que os antioxidantes fenólicos de cereais, frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cuja dieta apresenta alta ingestão desses alimentos (WEISBURGER, 1999; WETTASINGHE et al., 2002).

Segundo Wettasinghe e Shahidi (1999), diversos extratos de especiarias como orégano, alecrim, coentro, salsa, sálvia, tomilho e manjeriço têm sido estudados devido ao poder antioxidante, que parece estar relacionado à presença dos compostos fenólicos.

Segundo Shahidi (1997), o extrato de folhas de alecrim apresentou atividade antioxidante mais efetiva entre as especiarias avaliadas. A identificação dos ácidos polihidroxibenzóico e cinâmico no extrato de alecrim, como compostos antioxidantes, foi relatada. As frações polares e não-polares das folhas de orégano retardaram a oxidação do ácido linoléico medida pelo método do ácido tiobarbitúrico (TBA). Foram encontrados sete compostos em solução etanólica de orégano, com atividade antioxidante, contra a oxidação do ácido linoléico. A manjeriço, uma especiaria semelhante ao orégano em classificação morfológica, apresentou teor de compostos fenólicos similar aos encontrados no orégano, de atividade antioxidante moderada. Os

principais componentes de aroma das folhas de tomilho, timol e carvacrol, apresentaram alta atividade antioxidante.

Angelo e Jorge (2008) avaliaram os efeitos, isolado e sinergista, dos antioxidantes de extrato de coentro e do palmitato de ascorbila em óleo de girassol refinado, isento de antioxidantes sintéticos e adicionado de emulsificante mono-diglicerídeo. Os resultados mostraram que esses antioxidantes apresentaram capacidade de retardar a oxidação lipídica quando adicionados, isoladamente, no óleo de girassol submetido ao teste acelerado em estufa. Entretanto, a mistura dos antioxidantes de extrato de coentro e do palmitato de ascorbila apresentou uma proteção ainda maior, comprovando o efeito sinérgico desses antioxidantes.

2.1.3 Métodos de extração e avaliação da atividade antioxidante

Existem diversas metodologias para a extração dos compostos antioxidantes dos alimentos. Dentre elas, podem ser citados os tradicionais métodos de extração utilizando solventes orgânicos, como água, etanol, metanol, acetona, éter e hexano, e a extração supercrítica que, mediante mudanças na pressão e na temperatura, transforma o dióxido de carbono (CO_2) em um fluido supercrítico para a extração (REHMAN; HABIB; SHAH, 2004). Sob o ponto de vista químico, não há como selecionar a metodologia mais eficiente para a extração desses compostos que podem sofrer a influência de diversos fatores. Dentre estes, podem ser citados a natureza do vegetal, o solvente empregado na extração, o tamanho das partículas, o tempo e a temperatura de extração (SHAHIDI; NACZK, 2003).

Para se garantir a eficiência de um processo de extração, este deve ser escolhido de acordo com o composto antioxidante a ser extraído. Para os polifenóis e outros antioxidantes presentes nos vegetais, três principais processos de extração podem ser utilizados: extração com solventes, extração de fase sólida ou extração supercrítica. Ao final destes processos, é possível fazer uso das técnicas de secagem, congelamento ou liofilização (SCHWARZ et al., 2001).

É de grande interesse para o público em geral, especialistas da área médica e nutricional e pesquisadores da área da saúde, ciência, tecnologia e engenharia dos alimentos, conhecerem os constituintes e a ação antioxidante dos alimentos que são

consumidos. Devido à complexidade da composição desses alimentos, a separação e o estudo individual de cada substância antioxidante são praticamente inviáveis, além de custosos. Por isso, espera-se que os pesquisadores venham validar métodos rápidos para a determinação da eficiência dos antioxidantes na prevenção de doenças. Entretanto, muitos métodos ainda precisam ser aperfeiçoados. Um teste de atividade antioxidante com base em reações químicas parece não ser condizente com situações reais, ainda que existam diversas publicações com medida de atividade antioxidante *in vitro* (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Existe uma grande variedade de testes para avaliar a potencialidade das substâncias antioxidantes presentes nas especiarias. Os métodos podem ser classificados em dois grupos: métodos que avaliam a capacidade de sequestrar os radicais livres e aqueles que testam a capacidade de retardar ou inibir a oxidação lipídica (SCHWARZ et al., 2001).

A atividade antioxidante de compostos naturais e sintéticos pode ser estimada quantitativamente determinando produtos primários e secundários da oxidação de lipídeos ou acompanhando outras variáveis como os ensaios de oxidação acelerada ou ainda as análises em sistemas modelos. Essa atividade pode variar de acordo com o tipo de composto, com a concentração e com as condições de extração (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

A determinação da atividade antioxidante em alimentos torna-se cada vez mais importante nas áreas de tecnologia e nutrição. Embora exista uma grande diversidade de métodos, estes não são validados ou padronizados (GIADA; MANCINI-FILHO, 2004). Esta gama de metodologias empregadas proporciona resultados numéricos distintos e difíceis de serem comparados (MARTÍNEZ-VALVERDE; PERIAGO; ROS, 2000).

De acordo com Moon e Shibamoto (2009), diversas metodologias têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro* de frutas, vegetais, especiarias, cereais e chás, dentre elas a autooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico, o ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), o DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil), o FRAP (poder antioxidante de redução do ferro), o ORAC (capacidade de absorção de radical oxigênio), entre outras.

Segundo Marco (1968) apud Prado (2009), o método da autooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico avalia a atividade de inibição dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. Este método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico. Segundo Saldanha (2005), pelo fato do sistema ser constituído de uma emulsão (sistema aquoso-lipídico), a atividade antioxidante é determinada pela capacidade do extrato ou do antioxidante isolado inibir o processo de oxidação do sistema, avaliado durante certo tempo em que os antioxidantes deverão apresentar maior estabilidade para garantir maior atividade.

Segundo Re et al. (1999), o método do ABTS baseia-se na formação do $ABTS^{+•}$, de coloração azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio que possui absorção máxima em 645, 734 e 815 nm, sendo os resultados expressos em termos da capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox (TEAC). Com a adição de um antioxidante ocorre a redução do $ABTS^{+•}$ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional. Com a extensão da perda de cor, a porcentagem de inibição do $ABTS^{+•}$ é determinada em função do Trolox, um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante. Esta metodologia é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais.

Esse método tem sido aplicado para avaliar a atividade antioxidante de diversos produtos naturais como frutas e vegetais (TACHAKITTIRUNGROD; OKONOGI; CHOWWANAPHOONPOHN, 2007; SUN; POWERS; TAND, 2007; PRADO, 2009), plantas medicinais (SURVESWARAN et al., 2007; KAWAREE et al., 2008), vinhos e uvas (RIVERO-PEREZ et al., 2008), cereais (HU et al., 2007; ABDEL-AAL; RABALSKI, 2008), bebidas (PICCINELLI et al., 2004; GOMEZ-RUIZ; LEAKE; AMES, 2007) e óleos essenciais (ZHAO; BOWLES; ZHANG, 2008; ERKAN; AYRANCI; AYRANCI, 2008), todos citados por Moon e Shibamoto (2009).

Entre os métodos analíticos aplicados para determinar a capacidade antioxidante de um composto em capturar radicais livres, o método DPPH é um dos mais utilizados por ser considerado prático, rápido e estável (ESPIN et al., 2000) e recomendado para a análise da atividade antioxidante de extratos de frutas e de especiarias e compostos puros (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

O DPPH é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta e possui absorção máxima na faixa de 515 a 520 nm. A redução do radical DPPH é monitorada pelo decréscimo da absorbância durante a reação (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995). De acordo com Molyneux (2004), na presença de um doador de hidrogênio ou elétron, a intensidade de absorção diminui e a solução com o radical perde sua coloração violeta, tornando-se amarela, de acordo com o número de elétrons capturados, ou seja, quando o elétron desemparelhado do átomo de nitrogênio no DPPH recebe um átomo de hidrogênio, proveniente do composto antioxidante, ocorre a mudança de cor (Figura 4).

De acordo com Mariutti et al. (2008), a atividade antioxidante de especiarias e ervas aromáticas usando métodos de sequestro de radicais livres, como o DPPH e o ABTS, tem sido investigada. No entanto, vários solventes, como água, metanol, etanol, acetona, éter de petróleo, hexano e diclorometano têm sido empregados no preparo de extratos dificultando a comparação dos diferentes valores da atividade antioxidante relatados nas pesquisas. Além disso, os resultados do DPPH têm sido apresentados em diferentes unidades, tais como % de atividade antioxidante (CERVATO et al., 2000; PRADO, 2009), % de atividade em relação ao controle (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005), % de inibição (ERKAN; AYRANCI; AYRANCI, 2008; AMAROWICZ et al., 2009; EL-GHORAB et al., 2010), % de sequestro do DPPH em relação ao controle (YOO et al., 2008; BUKHARI; IQBAL; BHANGER, 2009), % de atividade em relação ao ácido caféico (EXARCHOU et al., 2002) ou em relação ao pirogalol (NUUTILA et al., 2003), micromol de Trolox por grama de amostra (WOJDYLO; OSZMIANSKI; CZEMERY, 2007), EC_{50} , cujo valor representa a quantidade de um antioxidante necessária para levar a 50% a concentração inicial do DPPH• (KOSAR; DORMAN; HILTUNEN, 2005; HINNEBURG; DORMAN; HILTUNEN, 2006; PRADO, 2009; LAGOURI; NISTEROPOULOU, 2009).

Em contrapartida, os resultados obtidos no método do ABTS, geralmente, têm sido reportados como capacidade antioxidante em equivalente de Trolox (TEAC) (DORMAN; HILTUNEN, 2004; MURCIA et al., 2004; PELLEGRINI et al., 2006; MARIUTTI et al., 2008; ALI et al., 2008), ou como capacidade antioxidante em equivalente de ácido ascórbico (CHUN et al., 2005).

O método FRAP (*ferric reducing antioxidant power*) foi descoberto por Benzie e Strain (1999). Este método foi usado por Lim e Murtijaya (2007), Netzel et al. (2007) e, recentemente, por El-Ghorab et al. (2010) e Zhang, Li e Wang (2010), que determinaram a atividade antioxidante de diferentes extratos de plantas e de especiarias. Esse método baseia-se na redução do complexo férrico (Fe^{3+}) - 2,4,6-tripiridyl-s-triazine (TPTZ) ao complexo ferroso (Fe^{2+}), em condições de baixo pH. Esta redução é monitorada pela mudança na absorbância a 593 nm. Os resultados do poder antioxidante de redução do ferro podem ser expressos como equivalente em micromol de Trolox/g de amostra (em base seca) ou equivalente em milimol de Fe^{2+} /kg de

amostra (PELLEGRINI et al., 2006; YOO et al., 2008). Esse método é econômico, o preparo dos reagentes é simples, os resultados são altamente reprodutíveis e o procedimento é direto e rápido. A principal desvantagem desse método é de que a capacidade redutora medida pode não refletir necessariamente a atividade antioxidante. Uma vez que o método não inclui um substrato oxidável, nenhuma informação é fornecida sobre as propriedades protetoras dos antioxidantes. Em adição, o ensaio não mede os antioxidantes contendo grupos -SH (FRANKEL; MEYER, 2000).

O método ORAC (*oxygen radical absorbance capacity*) usa a beta-ficoeritrina (PE) como um substrato de proteína oxidável e 2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) como um gerador de radical peroxila ou $\text{Cu}^{2+} - \text{H}_2\text{O}_2$ como um formador de radical hidroxila. A capacidade de absorção do radical oxigênio pode ser expressa como equivalente em μM de Trolox/L ou g de amostra (PELLEGRINI et al., 2006).

Giada (2006) avaliou a atividade antioxidante de extratos etanólico e aquoso do cotilédono da semente de girassol empregando diferentes métodos como os ensaios FRAP, DPPH e ORAC. Os métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* se correlacionaram de forma positiva. Os resultados demonstraram que, apesar dos diferentes mecanismos de reação e métodos de quantificação, os valores de capacidade antioxidante encontrados nos métodos foram comparáveis, e a escala de atividade seguiram uma tendência similar, mostrando que podem ser utilizados para determinar a capacidade antioxidante. Por outro lado, devido às diferenças de especificidade e sensibilidade de cada método tornou-se inviável padronizar as concentrações. No entanto, independentemente do método escolhido, a medida das diferentes concentrações forneceu resultados mais compreensíveis sobre a capacidade antioxidante.

Prado (2009) quantificou o teor de compostos fenólicos totais de extratos etanólicos de frutas tropicais, cujos resultados foram expressos em mg de ácido gálico/mL de extrato. Foram obtidos os valores de 0,370; 15,8; 0,564; 0,372; 0,128; 0,564 e 1,16 mg de AG para os extratos de abacaxi, acerola, manga, maracujá, melão, goiaba e pitanga, respectivamente.

Prado (2009) também determinou a atividade antioxidante dos extratos pelo sequestro do radical livre DPPH e pelo método do ABTS+•. Os resultados da atividade antioxidante, obtidos por meio da atividade sequestrante do radical, foram de 83,6; 81; 71; 67,8; 58; 43,5 e 35,8% para os extratos de goiaba, pitanga, acerola, abacaxi, maracujá, melão e manga, respectivamente. No ABTS+•, o extrato de acerola apresentou a maior atividade (788 µM de Trolox/g de polpa), seguido dos extratos de pitanga (82 µM de Trolox/g de polpa), goiaba (46 µM de Trolox/g de polpa), maracujá (25 µM de Trolox/g de polpa), abacaxi e manga (18,7 µM de Trolox/g de polpa) e melão (6,7 µM de Trolox/g de polpa). As frutas que apresentaram as melhores atividades, em ambos os métodos, foram as mesmas (acerola, pitanga e goiaba), indicando a semelhança do mecanismo de reação em sequestrar o radical livre.

De acordo com Molyneux (2004), o método do DPPH foi descoberto por Blois (1958) e modificado por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Nos últimos anos, este método tem sido amplamente usado para avaliar a atividade antioxidante de plantas, porém, Molyneux (2004) ressaltou a importância de consultar o método original descrito por Blois (1958) em conjunto com os recentes trabalhos publicados por Brand-Williams e colaboradores (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997), os quais indicam que a situação de uma determinada pesquisa nem sempre é tão simples como aquela apresentada originalmente.

Segundo Erkan, Ayranci e Ayranci (2008), a correlação entre a atividade antioxidante, determinada com base no DPPH, e o teor de compostos fenólicos totais de extratos obtidos de diversas fontes naturais tem sido demonstrada por diferentes trabalhos, como de Liu et al. (2007) e Verzelloni, Tagliazucchi e Conte (2007). Reportou-se que o solvente usado no processo de extração e a determinação do teor de fenólicos são de extrema importância para a posterior avaliação da atividade antioxidante.

2.1.4 Testes acelerados de oxidação e suas aplicações

O estudo da deterioração de óleos, gorduras e alimentos lipídicos está diretamente relacionado com a determinação de sua estabilidade oxidativa, isto é, com o acompanhamento da ação do oxigênio sobre os lipídeos (REGITANO-D'ARCE, 2006).

A estabilidade oxidativa constitui um parâmetro global para a avaliação da qualidade de óleos e gorduras que não depende apenas da sua composição química e da qualidade da matéria-prima (HILL, 1994). Reflete também as condições às quais foram submetidos durante o processamento e armazenamento (SCHWARZ et al., 2001; REGITANO-D'ARCE, 2006).

Gray (1985) afirmou que os testes de armazenamento consomem tempo e, além disso, a simples determinação dos índices químicos em geral é insuficiente para caracterizar totalmente o grau de deterioração. E que várias metodologias foram desenvolvidas para se determinar a estabilidade oxidativa de alimentos lipídicos, sendo que a maioria delas está envolvida com a elevação da temperatura, com ou sem aumento de exposição ao oxigênio.

Segundo Regitano-d'Arce (2006), os testes de estabilidade podem ser classificados geralmente como testes de vida útil (*shelf life*) ou de vida útil do alimento, testes em estufa, métodos de oxigênio ativo e testes de absorção de oxigênio. O tempo de vida útil de óleos, gorduras e alimentos lipídicos depende da temperatura de armazenamento. A estabilidade oxidativa é determinada sob condições aceleradas (60°C ou mais), pois condições ambientais demandam períodos de armazenamento excessivamente longos.

De acordo com Silva, Borges e Ferreira (1999), os testes acelerados de oxidação, recorrendo às condições padronizadas de oxidação acelerada (oxigenação intensiva, tratamento térmico e/ou catálise metálica), permitem estimar de forma rápida a estabilidade oxidativa de uma matéria graxa ou a eficácia teórica de um antioxidante, isolado ou em associação, assumindo importância na rotina analítica.

As previsões mais confiáveis acerca da estabilidade dos sistemas lipídicos ou da eficácia dos antioxidantes são obtidas entre 40 e 60°C. Idealmente, o grau de oxidação deveria ser determinado por outras medidas complementares a que os substratos estão sujeitos em estágios avançados de oxidação. O teste de estufa de *Schaal* é o que apresenta os menores inconvenientes. Desenvolve-se a 63°C, o que limita as reações

secundárias e os resultados são muito bem correlacionados com as avaliações sensoriais e a medida da vida útil do produto. A dificuldade está no fato de que seus resultados não podem ser obtidos em um único dia (BERSET; CUVELIER, 1996 apud REGITANO-D'ARCE, 2006). Alguns autores aceitam a interpretação de que cada dia de armazenagem a 65°C seja equivalente a um mês de armazenamento à temperatura ambiente (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1998 apud REGITANO-D'ARCE, 2006).

No teste acelerado em estufa (*Schaal Oven Test*), os óleos são mantidos à temperatura de 60°C ou mais e avaliados, periodicamente, mediante análise de índice de peróxido. Ao detectar mudança nos parâmetros físico-químicos, determina-se o período de indução do óleo. O tempo de indução obtido da curva é, em muitos casos, uma boa indicação não apenas da capacidade de conservação, mas também da estabilidade oxidativa do óleo (FRANK; GEIL; FREASO, 1992).

A partir dos resultados verificados pelos métodos de estabilidade oxidativa determina-se o período de indução, ou índice de estabilidade oxidativa, o qual é definido como o tempo necessário para que o óleo atinja um nível de rancidez detectável ou ocorra uma brusca mudança na taxa de oxidação (MCCORD, 1994; HILL, 1994; ABDALLA; ROOZEN, 1999; REGITANO-D'ARCE, 2006).

O Rancimat é o equipamento que determina a resistência de um óleo à oxidação. O método baseia-se no registro das variações da condutividade da água destilada, na qual se faz a coleta dos ácidos de baixo peso molecular obtidos após a iniciação forçada da oxidação à temperatura de 110°C. Esse método apresenta vantagens como medida contínua, a qual não necessita de determinações analíticas periódicas, assim como o aparelho não requer supervisão durante o curso de um experimento (ABDALLA; ROOZEN, 1999).

Segundo Frankel e Huang (1994), os resultados do período de indução de óleos e gorduras que, em princípio, foram utilizados apenas como parâmetro comparativo, são atualmente de grande valia para a previsão do tempo de vida útil.

No método para avaliar a atividade nos sistemas alimentares, o objetivo é testar a eficiência do antioxidante na proteção do alimento contra os danos oxidativos. No caso da avaliação da atividade antioxidante de especiarias para sistemas lipídicos, os

testes acelerados têm grande importância, visto poder comparar os desempenhos de diferentes concentrações e extratos (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2001).

Ensaio em sistema modelo e em estufa foram conduzidos por Almeida-Doria (1999) para avaliar a atividade antioxidante de extratos etanólicos de alecrim e orégano em comparação aos antioxidantes sintéticos BHA+BHT e TBHQ, adicionados ao óleo de soja em diferentes concentrações. Os resultados mostraram que os extratos etanólicos foram eficientes em retardar a oxidação, apesar de os antioxidantes sintéticos apresentarem melhor desempenho. Nos ensaios em sistema modelo, a mistura (1:1) 200 mg.kg⁻¹ de BHA+BHT foi a mais eficiente em prevenir a perda de coloração da emulsão do β -caroteno-ácido linolólico, seguida das concentrações 200 e 100 mg.kg⁻¹ de TBHQ e 1000 e 500 mg.kg⁻¹ de extrato etanólico de alecrim, as quais foram equivalentes, assim como 1000 e 500 mg.kg⁻¹ de extrato de orégano.

Nos resultados de Almeida-Doria (1999), o teste acelerado em estufa apresentou comportamento diferente do ensaio em sistema modelo. O antioxidante sintético TBHQ, na concentração de 200 mg.kg⁻¹, foi o mais eficiente em retardar a oxidação do óleo, porém, foi possível determinar a melhor dose (128,85 mg.kg⁻¹) e a dose econômica (126,09 mg.kg⁻¹) desse antioxidante. A adição da mistura de extratos de alecrim e orégano, em concentrações de 25, 50, 75 e 100 mg.kg⁻¹, aos óleos com TBHQ minimizou o processo oxidativo, porém não foi mais eficiente que o antioxidante sintético sozinho. Não houve diferença significativa entre as concentrações. Concluiu-se que os extratos etanólicos de alecrim e orégano e suas misturas binárias podem ser usados como antioxidantes naturais, em substituição aos sintéticos, uma vez que apresentaram proteção antioxidante semelhante à mistura BHA+BHT.

A capacidade antioxidante de certos compostos tem fundamentado diversos estudos aplicados à ação antioxidante em produtos cárneos (BARRETO, 1996; SOARES, 1998; LEAL, 2000; RACANICCI et al., 2004; PIEDADE, 2007) e na proteção contra danos oxidativos de emulsões, aumentando a vida útil desses produtos (EMPSON; LABUZA; GRAF, 1991).

Pino (2005) avaliou a estabilidade oxidativa de almôndegas cozidas de carne de peito de frango adicionadas de 0,1% de folhas secas de salsa e coentro, armazenadas sob refrigeração durante nove dias. Alterações oxidativas ocorreram uma vez que os

resultados de TBARS atingiram $45,27 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ no tratamento controle, $22,12 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ no tratamento com salsa e $36,39 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ no tratamento com coentro. Nas amostras armazenadas sob congelamento, durante dois meses, o processo oxidativo esteve mais controlado, atingindo valores de $22,26 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ no tratamento controle, $15,15 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ no tratamento com salsa e $17,27 \mu\text{mol.kg}^{-1}$ no tratamento com coentro.

Folhas de orégano e alecrim demonstraram sua capacidade antioxidante em bolas de peito de frango pré-cozidas e armazenadas sob refrigeração. Adicionadas de 0,05% de folhas secas, o alecrim foi mais eficiente que o orégano (RACANICCI et al., 2004).

Piedade et al. (2005) avaliaram a atividade antioxidante de folhas secas de orégano e alecrim em bolas pré-cozidas de filés de sardinha armazenadas sob refrigeração, durante seis dias, em embalagens de polietileno. O orégano foi mais eficiente contra a oxidação lipídica do que o alecrim, adicionados na mesma concentração de 0,1%.

O teor de compostos fenólicos em extratos etanólicos e aquosos foi determinado por Mata et al. (2007) nas ervas funcho, poejo, menta, alecrim e tomilho. Os maiores valores foram encontrados no tomilho, cuja concentração foi de 113 mg de ácido pirogálico/g de amostra para o extrato etanólico e 74,9 mg de ácido pirogálico/g de amostra para o extrato aquoso.

Zácarí (2008) avaliou as ervas coentro, salsa, tomilho, manjerição e orégano, secas em escala laboratorial e industrial, quanto à concentração de compostos fenólicos. O tomilho, desidratado em laboratório, destacou-se entre as ervas com 25,75 mg de ácido gálico/g de erva. Entre as amostras desidratadas industrialmente, o orégano apresentou o maior teor de fenólicos, cujo resultado foi de 39,2 mg de ácido gálico/g de erva. A estabilidade oxidativa do óleo de castanha do Pará, adicionado dessas ervas foi avaliada através de teste acelerado em estufa por um período de tempo de 120 h à temperatura de 60°C . Os resultados do índice de peróxido mostraram que o óleo adicionado de 2,5% de tomilho apresentou 7,5 meq O_2/kg de amostra, seguido do tratamento com 2,5% de orégano, cujo valor foi de 9,6 meq O_2/kg de amostra. Esses mesmos tratamentos apresentaram os melhores resultados quanto à absorvidade específica na faixa do ultravioleta em 232 nm, com valores de $3,1 \text{ E}^{1\%}_{1\text{cm}}$

para o orégano e $3,8 E^{1\%}_{1cm}$ para o tomilho. Concluiu-se que as ervas orégano e tomilho destacaram-se como fontes naturais de antioxidantes capazes de oferecer proteção ao óleo de castanha do Pará contra a oxidação lipídica.

Prado (2009) avaliou a estabilidade oxidativa em Rancimat de extratos etanólicos de abacaxi, acerola, manga, maracujá, melão, goiaba e pitanga. Os compostos fenólicos nos extratos de acerola, goiaba e pitanga interagiram melhor com o sistema lipídico (óleo de soja), retardando o avanço da oxidação nesse sistema. A interação dos compostos fenólicos com o óleo foi distinta para cada um dos extratos, uma vez que cada um exibiu um fator de proteção diferente, porém, todos os extratos foram capazes de proteger o óleo contra a oxidação lipídica.

Apesar de o aquecimento ser o meio mais utilizado e o mais eficiente para acelerar a oxidação e permitir o seu acompanhamento, e de as baixas temperaturas permitirem as melhores correlações com o ambiente, existem condições alternativas como a alta iluminação e a extrema temperatura cujas finalidades são acelerar a oxidação de óleos e gorduras.

Vieira (1998) avaliou o efeito do aquecimento por microondas, sobre a estabilidade oxidativa de óleos refinados de canola, milho e soja, através da determinação de parâmetros analíticos. Amostras de óleo foram aquecidas em microondas (800 W, 2450 MHz) por períodos de 0 a 36 minutos. O aquecimento promoveu a degradação oxidativa em todos os óleos, os quais apresentaram comportamentos diferentes devido à composição em ácidos graxos.

Os valores de absorvidade em 232 e 270 nm apresentaram acréscimos crescentes com o aumento do período de exposição às microondas, indicando a ocorrência do processo oxidativo. Os índices de acidez aumentaram até os 36 min. de aquecimento em todos os óleos, assim como os índices de peróxido sofreram aumentos significativos no estágio inicial de aquecimento (0 - 6 min.). A partir deste período, as alterações não puderam ser relacionadas aos valores obtidos para a absorvidade em 232 nm devido à instabilidade dos hidroperóxidos às altas temperaturas (VIEIRA, 1998).

De acordo com Vieira (1998), o aquecimento por microondas pode ser utilizado para comparar a estabilidade oxidativa de diferentes óleos, assim como o teste de estufa.

Siqueira (1998) avaliou a correlação existente entre o teste de fotoxidação acelerada em câmara de luz e o armazenamento ao ambiente de óleos refinados de canola, milho e soja. No ensaio de armazenamento ao ambiente, os óleos foram acondicionados em embalagem PET, durante 180 dias, com intensidade luminosa de 210 lux. Já a fotoxidação foi conduzida em câmara de luz com uso de lâmpadas fluorescentes de 20 W e intensidade luminosa de 8.370 lux.

Os índices de peróxido obtidos apresentaram aumento nos dois ensaios. Após 180 dias de armazenamento ao ambiente, os valores se posicionaram entre 3 e 4 meq O_2 /kg de óleo, enquanto que, no teste acelerado de fotoxidação, esses valores foram atingidos em menos de 5 horas de exposição à luz. Desta forma, encontrou-se uma correlação positiva entre o teste acelerado de fotoxidação e o armazenamento ao ambiente, demonstrando a viabilidade da aplicação do teste acelerado em câmara de luz para avaliar a estabilidade oxidativa desses óleos (SIQUEIRA, 1998).

Segundo Siqueira (1998), o teste de fotoxidação acelerada é vantajoso, pois requer curto período de tempo e a fonte de luz pode ser controlada.

No teste acelerado de fotoxidação, Siqueira (1998) também avaliou a estabilidade oxidativa dos óleos de canola, milho e soja adicionados dos antioxidantes BHA+BHT (200 ppm), BHA+BHT (200 ppm) + ácido cítrico (100 ppm), ácido cítrico (100 ppm), beta-caroteno (1 ppm), alfa-tocoferol (500 ppm) e TBHQ (200 ppm).

Os valores de peróxido obtidos no tratamento com TBHQ foram significativamente diferentes após 72 horas de exposição à luz para os óleos de canola e milho (17,8 meq O_2 /kg de óleo e 15,03 meq O_2 /kg de óleo, respectivamente), e após 96 horas para o óleo de soja (25,28 meq O_2 /kg de óleo). Concluiu-se que o TBHQ foi o antioxidante mais eficiente em retardar o processo fotoxidativo dos óleos nas condições dos ensaios (SIQUEIRA, 1998).

2.1.5 Especiarias

As especiarias podem atuar sobre os alimentos funcionais prevenindo o processo oxidativo, protegendo ou agindo como agentes terapêuticos para doenças de resposta inflamatória (DROGE, 2002).

As ervas podem ser acrescentadas nos alimentos de várias formas: desidratadas, frescas ou na forma de extratos. O termo especiaria é definido como o material seco da planta que normalmente é adicionado ao alimento para melhorar o *flavor*. Desde os tempos antigos, as especiarias e as ervas aromáticas vem sendo usadas não somente para melhorar o aroma e sabor dos alimentos e prolongar o tempo de conservação, mas também pelas suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antissépticas e medicinais (CARVALHO, 2002).

A família *Lamiaceae* é composta por aproximadamente 3.500 espécies que são nativas, principalmente da região do Mediterrâneo, embora algumas tenham origem na Austrália, no Sudoeste da Ásia e na América do Sul. São exemplos dessa família as espécies de alecrim (*Rosmarinus* sp.), sálvia (*Salvia* sp.), orégano (*Origanum* sp.), tomilho (*Thymus* sp.), manjeriço (*Ocimum* sp.), manjerona (*Majorana* sp.), menta (*Mentha* sp.), segurelha (*Satureja* sp.), dentre muitas outras, as quais são estudadas devido às suas propriedades antioxidantes, antimicrobianas e medicinais, e usadas na culinária para conferir aroma e sabor aos alimentos (DROGE, 2002).

As propriedades antioxidantes das espécies da família *Lamiaceae* são atribuídas principalmente aos compostos fenólicos como o ácido rosmarínico e o ácido caféico em alecrim, sálvia, orégano e tomilho; o carnosol, o rosmanol, o ácido carnósico, o ácido 12-metilcarnósico, o metilcarnosol, o metilcarnosato, o epirosmanol, o rosmadial e a catequina em alecrim e sálvia (BANDONIENE et al., 2002; EXARCHOU et al., 2002; PIZZALE et al., 2002; SHAN et al., 2005), a luteolina e o ácido *p*-coumárico em sálvia, orégano e tomilho (SHAN et al., 2005), o campferol em sálvia e orégano; o carvacrol, o timol e o *p*-cimenol em orégano e tomilho; o carnosaldeído, o epirosmanol, a rosmariquinona e o ácido ursólico em alecrim (PIZZALE et al., 2002; SHAN et al., 2005).

O ácido clorogênico é também um composto fenólico, encontrado na semente de girassol, com propriedades antioxidantes (SHAHIDI; NACZK, 2003).

De acordo com Shan et al. (2005), as propriedades antioxidantes de ervas aromáticas e especiarias são indicadas como efetivas para retardar o processo de peroxidação lipídica em óleos e alimentos lipídicos e tem angariado o interesse de muitos grupos de pesquisa.

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), da família *Lamiaceae*, é originário da região do Mediterrâneo. É uma das especiarias mais estudadas e aplicadas no processamento dos alimentos devido às suas propriedades antioxidantes. Na Europa e nos Estados Unidos, é muito usada e comercialmente vendida como um antioxidante natural (YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNY, 2006). A planta do alecrim é caracterizada como um arbusto que atinge dois metros de altura, com folhas e flores aromáticas, com flores azuis ou brancas. As partes usadas são as folhas, de cor verde mais intenso, na forma *in natura* ou secas e trituradas (em pó). O óleo extraído dos ramos e das folhas frescas tem sido utilizado na indústria de sabão e cosméticos (perfumes, desodorantes e tônicos para o cabelo). O alecrim ajuda a regular as funções hepáticas e tem propriedades diuréticas, digestivas, tônicas e antissépticas. Universalmente, esta especiaria tornou-se um ingrediente indispensável no preparo de molhos para saladas, carnes e frangos (CARVALHO, 2002). Além disso, as folhas de alecrim têm sido adicionadas em óleos vegetais, principalmente em azeite de oliva, a fim de conferir características sensoriais de aroma e sabor desejáveis e devido ao seu potencial antioxidante.

A sálvia (*Salvia officinalis* L.), da família *Lamiaceae*, é originária da região mediterrânea. Esta especiaria possui características específicas, tais como: antibacteriana, antisséptica, hipoglicemiante, antiinflamatória, antiespasmódica e antissudorífera, além de ser um estimulante da digestão (CARVALHO, 2002). Segundo Yanishlieva, Marinova e Pokorny (2006), a sálvia é usada nos alimentos para conferir propriedades de aroma e sabor. Entre inúmeras especiarias avaliadas, a sálvia, ao lado do alecrim, tem apresentado a melhor atividade antioxidante, sendo que os extratos de sálvia e alecrim também são bastante conhecidos como eficientes antioxidantes naturais (BANDONIENE et al., 2002; PIZZALE et al., 2002).

O orégano (*Origanum vulgare* L.) é uma planta espontânea das montanhas da Europa. Frequentemente é usado como uma especiaria na qual seu aroma e sabor são altamente favoráveis aos consumidores em todo o mundo. Esta especiaria também é valorizada por suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes (YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNY, 2006).

O habitat natural da manjerona (*Origanum majorana* L.) estende-se do nordeste da África à Índia. O orégano e a manjerona, ambos da família *Lamiaceae*, são plantas muito próximas botanicamente, sendo facilmente confundidas devido à grande semelhança, principalmente em relação ao porte. Ambas as especiarias apresentam propriedades medicinais como expectorantes, antissépticas, facilitam a digestão e auxiliam no alívio de cólicas menstruais (CARVALHO, 2002).

O tomilho (*Thymus vulgaris* L.), da família *Lamiaceae*, é originário da região do Mediterrâneo, onde se encontra em estado silvestre aos pés das montanhas. O gênero *Thymus* possui diversas espécies, com 66 nativas da Europa, das quais 35 são de interesse comercial. É uma fonte natural de antioxidantes e, além disso, é usado devido as suas propriedades medicinais como diurético e antiespasmódico. Seu suco pode ser utilizado no tratamento de ferimentos e picadas de insetos, devido a sua ação cicatrizante, antisséptica e desodorizante (CARVALHO, 2002).

O louro (*Laurus nobilis* L.), da família *Lauraceae*, originário da Ásia Menor, possui folhas verde escuras muito aromáticas, porém de sabor amargo. No Brasil, são produzidas plantas macho e fêmea, separadamente, dando flores que não frutificam. A extração do óleo ou a manteiga de louro entram na preparação do unguento de louro, usado na medicina veterinária para proteger o pelo dos animais contra as moscas. Já nas cozinhas italiana, francesa e brasileira, as folhas de louro são indispensáveis, pois estimulam as papilas gustativas. Essa especiaria também apresenta uso medicinal como sudorífico, antisséptico, sedativo, além de combater a prisão-de-ventre (CARVALHO, 2002).

O cominho (*Cuminum cyminum* L.), da família *Apiaceae*, é originário do Turquestão, ao leste do Mar Cáspio, no sul da Rússia. Sua planta é pequena com no máximo 40 centímetros, com sementes alongadas de cor amarelo-amarronzadas e folhas finas e longas. Sua colheita é manual, em seguida as sementes são separadas dos talos e secas ao sol. As sementes, moídas ou inteiras, são empregadas em molhos para carnes, peixes, legumes e queijos, como para condimentar salsichas e outros embutidos. Essa especiaria pode ser usada contra inflamações estomacais e intestinais, cólicas e flatulência (CARVALHO, 2002).

O endro (*Anethum graveolens* L.), da família *Apiaceae*, é originário da Ásia e aclimatado na Europa. Sua planta, de até um metro de altura, com frequência é confundida com a do funcho, diferindo no aroma, no formato das sementes e na aplicação. As sementes, inteiras ou moídas, são usadas em panificação, em pastelarias, para condimentar molhos, na preparação de licores e como aromatizador de vinagre. O endro em pó constitui um dos ingredientes do *curry*. As folhas e os talos, em estado fresco e picados, podem ser utilizados para temperar queijos, saladas, molhos brancos, carnes e peixes (CARVALHO, 2002).

2.1.6 Legislação

Os compostos sintéticos têm que atender alguns requisitos para serem utilizados como antioxidantes na indústria de alimentos: não ser tóxico, apresentar alta atividade em baixas concentrações (0,01 a 0,02%) e se concentrar na superfície da fase lipídica do alimento. Além de resistir ao processamento do alimento ao qual foi adicionado, deve, ainda, contribuir para a estabilidade do produto final (BELITZ; GROSCH, 1999).

A legislação de cada país dita as concentrações máximas permitidas de cada aditivo alimentar e os antioxidantes sintéticos se encaixam nessa categoria. No Brasil, seu uso é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e os níveis de adição não podem ultrapassar 0,01% para os antioxidantes BHT e GP, e 0,02% para TBHQ e BHA (REGITANO-D'ARCE, 2006).

2.1.7 Análise sensorial

A análise sensorial é uma disciplina científica que estuda a forma como os sentidos humanos são evocados, percebidos, analisados e interpretados. Uma vez que o consumidor é quem experimenta tais sensações, estes estudos devem estar em conformidade com suas expectativas e necessidades, justificando e ampliando a atuação da análise sensorial em estudos do consumidor. É também uma ciência interdisciplinar na medida em que para alcançar estes objetivos utiliza diversas ferramentas de outras disciplinas tais como estatística, físico-química e química, além da sociologia e da psicologia (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007; MINIM, 2006; DUTCOSKY, 2007).

Segundo Della Modesta (1994), a análise sensorial representa um papel importante quando se deseja medir as necessidades do consumidor e traduzir esta demanda em produtos novos e/ou melhorados. Isto surge como consequência do aumento da competição entre os fornecedores de alimentos (supermercados) e do incremento da intensa busca do consumidor por um alimento com qualidade. Assim, a análise sensorial tem se constituído no pilar fundamental do desenvolvimento de novos produtos, a fim de medir, antecipadamente, em laboratório e ao nível piloto, a aceitabilidade do consumidor por este novo produto. Com isso, a sensorial tem se tornado um elemento necessário para desenvolver uma estratégia de mercado, pois o prazer ou a satisfação sensorial hedônica é um determinante importante no consumo dos alimentos.

Segundo Stone, McDermott e Sidel (1991), a análise sensorial, na indústria de alimentos, é uma metodologia utilizada com diversas finalidades tais como: desenvolvimento de novos produtos, monitoramento da concorrência, melhoramento de um produto já existente, estudos do consumidor, alteração de processos, redução de custo e/ou nova fonte de matérias-primas, controle de qualidade, estabilidade de um produto e seu armazenamento, estabelecimento de padrões do produto, seleção e treinamento de provadores, correlação de medidas sensoriais com medidas físico-químicas, entre outras.

As características sensoriais são aspectos de inegável importância na aceitação dos alimentos, bem como, parâmetros determinantes das condições de processamento relativas à seleção de matérias-primas, modificações e padronização de métodos e otimização de formulações para o desenvolvimento de produtos (RICHTER, 2006).

Na indústria de alimentos, a equipe sensorial é uma das ferramentas mais importantes tanto na pesquisa e no desenvolvimento de produtos, como no controle de qualidade. O sucesso ou fracasso do processo de desenvolvimento da equipe depende dos critérios e procedimentos usados para selecioná-la e treiná-la (DELLA MODESTA, 1994).

Atualmente, o analista sensorial tem usado um grande número de testes em função do propósito requerido. Acuidade para gosto é somente um aspecto, muito mais

importante é a habilidade para discernir e descrever uma particular característica ou um atributo sensorial (DELLA MODESTA, 1994).

Dentre os testes utilizados, encontram-se os descritivos tais como a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) e o Perfil Livre, os testes afetivos, referidos como teste de consumidor, de aceitação ou de preferência (STONE; SIDEL, 2004) e os testes discriminativos como o teste triangular, o duo-trio e o teste de comparação pareada. Testes descritivos são aqueles que descrevem qualitativamente e quantitativamente as características sensoriais das amostras enquanto os testes discriminativos têm por objetivo verificar se existe diferença perceptível ou não entre duas ou mais amostras. Os testes afetivos dizem respeito à opinião pessoal do provador, isto é, de consumidores cuja percepção a respeito de um produto pode ser expressa em termos que variam do agradável ao desagradável (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007; STONE; SIDEL, 2004).

2.1.7.1 Teste de preferência

Segundo Della Modesta (1994), o objetivo principal dos testes afetivos é verificar a resposta pessoal (preferência e/ou aceitabilidade) do consumidor comum ou do consumidor em potencial, sobre um produto já existente, ou das características específicas de um novo produto. Três diferentes tipos de testes englobam os testes afetivos: comparação pareada, ordenação e escala hedônica.

De acordo com Stone e Sidel (2004), métodos de avaliação sensorial utilizando escala hedônica permitem medir diretamente o grau de gostar até o de desgostar e, a partir desta avaliação, determinar indiretamente a preferência do consumidor. Testes que utilizam tais métodos podem ser denominados de teste de preferência, teste de aceitação ou ainda teste de consumidor e podem, geralmente, ser utilizados após a realização de testes sensoriais descritivos ou discriminativos.

Segundo Della Modesta (1994), a escala hedônica é altamente subjetiva, pois ela refere-se ao estado psicológico conscientemente agradável (gosta) ao desagradável (desgosta), medidos por uma escala de avaliação. A vantagem dessa escala comparada com a numérica é que os termos hedônicos constituem uma definição de cada ponto da escala.

A preferência pode ser medida diretamente pela comparação de um produto com outro ou de um produto em relação a vários outros, isto é, qual de dois ou mais produtos é o preferido; ou indiretamente, determinando-se qual produto recebeu avaliações significativamente mais elevadas que outro em uma avaliação envolvendo vários produtos (PONTES, 2008).

A escala hedônica de nove pontos é um método largamente aplicado em testes afetivos devido à confiabilidade de seus resultados e à facilidade de utilização pelos consumidores. Os termos hedônicos constituem uma definição de cada ponto da escala. O método baseia-se na determinação do comportamento do consumidor em relação ao alimento através de respostas diretas provenientes de suas próprias sensações (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007). Quando realizado em laboratório, utiliza grupos de 30 a 100 provadores não treinados e representativos dos consumidores do produto avaliado. Essa técnica permite avaliar diferentes amostras ao mesmo tempo. Os dados obtidos são submetidos à análise de variância (ANOVA) e outras análises estatísticas (STONE; SIDEL, 2004).

De acordo com Meilgaard, Civille e Carr (2007), a aplicação do teste de preferência visa atender quatro objetivos principais: verificação do posicionamento do produto no mercado, otimização da formulação do produto, desenvolvimento de novos produtos e avaliação do potencial de mercado.

2.2 Material e métodos

2.2.1 Matérias-primas

Foi utilizado óleo de soja refinado, isento de antioxidantes sintéticos, fornecido gentilmente pela empresa Cargill. No laboratório, o óleo foi recebido em latas de 18 kg e, em seguida, armazenado sob congelamento a -18°C até o momento de uso.

Foram utilizadas oito especiarias como alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), cominho (*Cuminum cyminum* L.), endro (*Anethum graveolens* L.), louro (*Laurus nobilis* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), sálvia (*Salvia officinalis* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.), regulamentadas pela ANVISA (2005) e adquiridas, já desidratadas, no mercado municipal de Piracicaba. Em seguida, foram

levadas ao laboratório, trituradas e armazenadas em frascos de vidro sob refrigeração à temperatura de 7°C.

As especiarias avaliadas nessa pesquisa podem ser visualizadas na Figura 6.

(continuação)

Figura 6 - Especiarias: alecrim (A), sálvia (S), orégano (O), manjerona (M), tomilho (T), louro (L), cominho (C) e endro (E)
Fonte: Carvalho (2002).

(conclusão)

Figura 6 - Especiarias: alecrim (A), sálvia (S), orégano (O), manjerona (M), tomilho (T), louro (L), cominho (C) e endro (E)
Fonte: Carvalho (2002).

2.2.2 Preparo dos extratos hidroalcoólicos

Os extratos hidroalcoólicos das especiarias desidratadas foram produzidos em laboratório segundo Ribeiro et al. (2008), com algumas modificações. Foram pesados 3,0 g de cada especiaria desidratada em tubos de centrífuga tipo Falcon onde foram adicionados 30 mL da mistura etanol:água (80:20 v/v). Os tubos contendo a especiaria e a mistura de solventes foram tampados com papel filme e submetidos à agitação em ultrasson por 25 minutos, em substituição à agitação em *shaker*, durante 50 minutos. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 5.000 rpm durante 15 minutos e, posteriormente, filtrados em papel filtro e armazenados sob refrigeração a 7°C, em

frascos âmbar, por até 5 dias. Após o preparo, foi verificado que os extratos hidroalcoólicos de endro e cominho apresentaram coloração mais clara, e os extratos de sálvia e louro foram aqueles de cor verde escuro mais intenso.

A Figura 7 mostra os extratos hidroalcoólicos de alecrim, tomilho, sálvia e louro após o preparo.

Figura 7 - Extratos hidroalcoólicos de alecrim, tomilho, sálvia e louro

2.2.3 Testes acelerados de oxidação

2.2.3.1 Teste acelerado em estufa ou *Schaal Oven Test*

O teste acelerado em estufa foi realizado com óleo de soja refinado, isento de antioxidantes (tratamento controle), adicionado de antioxidante sintético TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, tomilho, orégano, manjerona, louro e cominho, mantidos em estufa, com circulação de ar, à temperatura de $63^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por diferentes intervalos de tempo. No primeiro teste, os extratos de especiarias, assim como o TBHQ, foram adicionados ao óleo na concentração de 100 mg/kg de fenólicos, ou seja, 100 ppm, e conduzidos à estufa, de forma aleatória (Figura 8), onde permaneceram durante 72, 120 e 180 h (Figura 9).

Figura 8 - Óleo de soja, sem adição de antioxidantes, adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, tomilho, orégano, manjerona, louro e cominho, acondicionado em estufa a 63°C de forma aleatória

Figura 9 - Óleo de soja, adicionado de extratos hidroalcoólicos de especiarias, aquecido em estufa a 63°C por 120 h

No segundo ensaio, foram adicionados ao óleo de soja, além do TBHQ, os extratos hidroalcoólicos que proporcionaram, no primeiro teste em estufa, maior estabilidade oxidativa ao óleo. Esses extratos foram adicionados ao óleo, nas concentrações de 250 mg/kg (250 ppm) e 500 mg/kg de fenólicos (500 ppm), e o TBHQ nas concentrações de 100 e 200 mg/kg, e acondicionado em estufa, com circulação de ar, à temperatura de $63^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante os tempos de 36, 72 e 96 h.

Em todas as concentrações testadas (100, 200, 250 e 500 ppm), as amostras de óleo (30g) foram acondicionadas em béqueres de 50 mL, sendo que o volume de cada extrato adicionado no óleo foi calculado com base no teor de compostos fenólicos totais e o volume de TBHQ foi de 100 e 200 ppm.

Para cada ensaio, as amostras foram preparadas em triplicata, distribuídas de forma aleatória na estufa e, ao final de cada intervalo estabelecido, os béqueres foram retirados para a determinação do teor de ácidos graxos livres, índice de peróxido e absortividade em 232 e 270 nm.

2.2.3.2 Estabilidade oxidativa em Rancimat

A estabilidade oxidativa do óleo de soja foi determinada 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, adicionado de extratos hidroalcoólicos de especiarias, nas concentrações de 100, 250 e 500 mg/kg de fenólicos, e de TBHQ nas concentrações de 100 e 200 mg/kg. Esses óleos foram submetidos a uma oxidação acelerada à temperatura de 110°C e fluxo intenso de ar seco a taxa de 9 L/h, conforme o método descrito. As amostras foram preparadas e conduzidas ao equipamento Rancimat (Figura 10) em duplicata.

Figura 10 - Equipamento Rancimat

2.2.4 Análises físico-químicas

2.2.4.1 Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais dos extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, tomilho, orégano, manjerona, louro, cominho e endro foi realizado em triplicata e determinado de acordo com o método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu* descrito por Singleton, Orthofer e Lamuela (1999), utilizando o ácido gálico como padrão.

Segundo Prado (2009), o reagente de *Folin-Ciocalteu* é uma solução complexa de íons poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul Mo-W.

Os extratos hidroalcoólicos foram diluídos na mistura etanol:água (80:20 v/v), nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 e 0,5%, e uma alíquota de 0,5 mL da amostra diluída foi transferida para um tubo de ensaio e adicionado 2,5 mL da solução *Folin-Ciocalteu*:água (10:90 v/v). A mistura foi agitada em vortex seguida de repouso, em temperatura ambiente, durante cinco minutos. Em seguida, foram adicionados 2,0 mL da solução carbonato de sódio:água (4:96 m/v), sendo a mistura novamente agitada seguida de repouso por duas horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-1203 (Shimadzu) a 740 nm. Uma amostra em branco, a qual continha os reagentes, sem a amostra, foi conduzida nas mesmas condições, sendo os resultados dos compostos fenólicos totais

calculados a partir da curva padrão do ácido gálico, com concentrações que variaram de 2,5 a 50 µg/mL (Apêndice 1), e expressos em equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg AG/g amostra), em base seca.

2.2.4.2 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante determinada pelo método do radical livre DPPH baseia-se no princípio de que o DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazil), um radical estável de coloração violeta, aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula estável, sendo reduzido na presença de um antioxidante, adquirindo coloração amarela. Na forma de radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517 nm que desaparece à medida que este radical vai sendo reduzido pelo hidrogênio doado por um composto antioxidante (MENSOR et al., 2001).

A atividade dos extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, tomilho, orégano, manjerona, louro, cominho e endro foi realizada em triplicata e determinada na forma de porcentagem de atividade antioxidante (AA) através do sequestro do radical DPPH segundo Mensor et al. (2001). Em tubos de ensaio, a reação foi constituída pela adição de 0,5 mL do extrato de especiaria diluído em solução etanólica 80%, 3,0 mL de etanol 99% e 0,3 mL do radical DPPH 0,5 mM, diluído em solução de etanol:água (80:20 v/v). O branco foi preparado substituindo-se o volume do extrato por igual volume da solução etanólica 80%. Em seguida, os tubos foram agitados e incubados por 45 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm. A atividade anti-radical (AA) dos extratos hidroalcoólicos das especiarias foi determinada através da eq. (1):

$$AA (\%) = 100 - \left(\frac{((Aa - Ab) \times 100)}{Ac} \right) \quad (1)$$

Em que:

Aa = absorbância da amostra

Ab = absorbância do branco

Ac = absorbância do controle negativo

A atividade antioxidante (AA) dos extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, tomilho, orégano, manjerona, louro, cominho e endro também foi determinada em Trolox e os resultados foram expressos em μmol de Trolox/g de amostra de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Foi utilizado o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) como padrão para a determinação da curva de calibração, nas concentrações de 0,01 a 0,1 μmol , e os resultados da AA foram obtidos a partir da equação da reta da curva padrão em equivalente de Trolox (Apêndice 2).

2.2.4.3 Ácidos graxos livres (AGL)

O teor de ácidos graxos livres foi determinado de acordo com a metodologia Ca 5a-40 (AOCS, 2003). Os resultados foram expressos em porcentagem de ácido oléico através da eq. (2):

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

Em que:

V = volume gasto de solução padronizada de hidróxido de sódio

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio

m = massa da amostra (gramas)

2.2.4.4 Índice de peróxido (IP)

O índice de peróxido foi determinado segundo o método Cd 8b-90 (AOCS, 2003). Os resultados foram expressos em meq O_2/kg de amostra e obtidos pela eq. (3):

$$IP = \frac{(N \times (A - B) \times 1000)}{m} \quad (3)$$

Em que:

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio

A = volume gasto para titular a amostra

B = volume gasto para titular o branco

m = massa da amostra (gramas)

2.2.4.5 Absortividade na faixa do ultravioleta (UV)

As absorbâncias específicas nos comprimentos de 232 e 270 nm foram determinadas segundo a metodologia Ch 5-91 (AOCS, 2003). Os resultados foram expressos em $E_{1cm}^{1\%}$ e calculados através da eq. (4):

$$E_{1cm}^{1\%} = \frac{A}{C} \quad (4)$$

Em que:

A = absorbância no comprimento de onda 232 e 270 nm

C = concentração da solução (g/100 mL)

2.2.5 Análise sensorial

Foi realizado um teste de preferência com 100 consumidores para verificar a preferência entre os óleos de soja adicionados de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, tomilho e orégano e do antioxidante sintético TBHQ. Foram avaliadas as características sensoriais de cor, aroma e sabor, através de escala hedônica com sete pontos, onde desgostei muito = 1, desgostei regularmente = 2, desgostei ligeiramente = 3, não gostei e nem desgostei = 4, gostei ligeiramente = 5, gostei regularmente = 6, gostei muito = 7 (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2007).

Para a característica cor foram utilizadas placas de Petri colocadas sobre uma folha de papel sulfite branca, bem perto uma das outras. As amostras foram avaliadas da esquerda para a direita sob luz branca. A Figura 11 ilustra a avaliação sensorial da característica cor do óleo de soja adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, tomilho e orégano, na concentração de 100 mg/kg.

Para o aroma foram utilizados erlenmeyers, com tampas, recobertos com folha de alumínio, sendo o consumidor instruído a agitar cuidadosamente cada erlenmeyer antes de cheirá-lo. A Figura 12 ilustra a avaliação sensorial da característica aroma do óleo de soja adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, tomilho e orégano, na concentração de 100 mg/kg.

Para o sabor foram utilizados copinhos plásticos revestidos com folha de alumínio. Junto às amostras foram colocados biscoito de água, um copo plástico com

água mineral à temperatura ambiente, um copo plástico para descarte das amostras, colheres plásticas descartáveis para cada amostra, papel toalha e a ficha do teste. A Figura 13 ilustra a avaliação sensorial da característica sabor do óleo de soja adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, tomilho e orégano, na concentração de 100 mg/kg.

Figura 11 - Avaliação sensorial da cor de óleo de soja adicionado de extratos hidroalcoólicos de orégano, tomilho, sálvia, TBHQ e alecrim, respectivamente

Figura 12 - Avaliação sensorial do aroma de óleo de soja adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, orégano, tomilho e sálvia

Figura 13 - Avaliação sensorial do sabor de óleo de soja adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, orégano, tomilho e sálvia

Todos os recipientes foram preenchidos com quantidades iguais de óleo e etiquetados com números aleatórios de três dígitos. Para as características de aroma e sabor, as amostras foram avaliadas, separadamente, à temperatura ambiente, da esquerda para a direita, sob luz vermelha, de acordo com a metodologia da *American Society for Testing and Materials* (ASTM, 1968).

Para cada característica foi usado um delineamento de blocos completos, balanceado, sendo que a ordem de apresentação das amostras foi diferente para cada característica e para cada consumidor. Foram recrutados 100 consumidores e, com isso, o experimento foi balanceado segundo Cochran e Cox (1957).

A apresentação das amostras foi descrita em uma ficha controle. Os dados da análise sensorial foram transferidos para um banco de dados e analisados estatisticamente.

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ESALQ/USP, protocolo número 37, e todos os participantes assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O teste de preferência foi realizado em cabines individuais do laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ/USP.

2.2.6 Análise estatística

A análise estatística dos resultados físico-químicos e sensoriais foi realizada através do software Minitab (2004) aplicando-se a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, ao nível de 5% de significância, segundo Pimentel-Gomes (1990).

2.3 Resultados e discussão

2.3.1 Matéria-prima

A caracterização físico-química do óleo de soja refinado puro, isento de antioxidantes sintéticos, foi realizada pela empresa fornecedora da matéria-prima, cujos resultados foram: 0,04 % de ácido oléico, 0,01 meq O₂/kg de amostra, 0,01% de umidade e voláteis e odor e sabor neutros.

2.3.2 Compostos fenólicos totais

Os teores de compostos fenólicos totais dos extratos hidroalcoólicos de orégano, alecrim, manjerona, louro, sálvia, tomilho, cominho e endro foram expressos em mg de ácido gálico/g de amostra seca. Os resultados podem ser observados na Figura 14.

Figura 14 - Compostos fenólicos totais dos extratos hidroalcoólicos de especiarias
Valores médios das triplicatas / Letras diferentes indicadas nas barras diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

De acordo com os resultados apresentados na Figura 14, foi observado que o extrato de orégano diferiu significativamente ($p < 0,05$) dos demais extratos apresentando o maior teor de compostos fenólicos. O extrato de alecrim também diferiu ($p < 0,05$) dos demais extratos e foi a segunda amostra com maior teor de fenólicos. Os extratos de manjerona e louro não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre si. Já os extratos de sálvia, tomilho, cominho e endro foram diferentes ($p < 0,05$) entre si. Dentre as especiarias avaliadas, o orégano demonstrou ser a fonte natural com maior teor fenólico e o endro com menor teor.

Proestos et al. (2005) avaliaram extratos de ervas aromáticas como fontes potenciais de compostos fenólicos, os quais foram extraídos dos extratos utilizando uma mistura metanol:água (62,5:37,5 v/v) e quantificados de acordo com o método de *Folin-Ciocalteu* descrito por Kahkonen et al. (2004). Os extratos de endro, sálvia, tomilho, alecrim e manjerona apresentaram teor de compostos fenólicos totais de 12,5 mg, 13,6 mg, 19,2 mg, 21 mg e 16,9 mg de AG/g de amostra seca, respectivamente.

Shan et al. (2005) determinaram o teor de compostos fenólicos totais de 26 extratos de plantas. Dentre as especiarias avaliadas estavam manjeriço, orégano, alecrim, sálvia, tomilho, louro, cravo-da-índia, endro, cominho, salsinha e gengibre. Os extratos foram preparados com uma mistura metanol:água (80:20 v/v) e o teor de compostos fenólicos foi estimado usando o método colorimétrico de *Folin-Ciocalteu* descrito por Zheng e Wang (2001) e Cai et al. (2004), com algumas modificações. O teor de fenólicos encontrados nos extratos metanólicos das especiarias foi de 36,4 mg, 101,7 mg, 50,7 mg, 53,2 mg, 45,2 mg, 41,7 mg, 143,8 mg, 9,8 mg, 2,3 mg, 9,7 mg e 6,3 mg de GAE/g de amostra seca, respectivamente. Shan et al. (2005) identificaram o extrato de cravo-da-índia como a fonte de maior teor de fenólicos, seguido do extrato de orégano.

Hinneburg, Dorman e Hiltunen (2006) determinaram o teor de compostos fenólicos de extratos hidrodestilados de manjeriço, salsinha, louro, zimbro, cardamomo, gengibre, semente de anis, funcho e cominho, cujos valores obtidos foram de 147 mg, 29,2 mg, 92 mg, 18,5 mg, 24,2 mg, 23,5 mg, 20,8 mg, 30,3 mg e 37,4 mg de AG/g de extrato, respectivamente. Segundo Rice-Evans, Miller e Paganga (1996) apud Hinneburg, Dorman e Hiltunen (2006), as substâncias fenólicas têm sido apontadas

como as responsáveis pela atividade antioxidante de plantas. Os resultados encontrados por Hinneburg, Dorman e Hiltunen (2006) mostraram que os extratos de manjerição, louro, cominho e funcho apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$), sendo que o extrato de manjerição foi o de maior teor de fenólicos, seguido dos extratos de louro, cominho e funcho. Não foi encontrada uma correlação entre os resultados do teor de compostos fenólicos totais e da atividade sequestrante do radical livre DPPH.

Yoo et al. (2008) determinaram o teor de compostos fenólicos totais em extratos metanólicos de 17 ervas aromáticas. Com os resultados obtidos, as especiarias foram divididas em três grupos quanto à concentração de compostos fenólicos: alto, médio e baixo. Extratos de camomila, limão verbena, chá verde e alecrim foram classificados como grupo de alta concentração de fenólicos, cujos valores obtidos estavam entre 7,698 e 8,444 mg de GAE/g de amostra fresca. Entre todos os extratos de especiarias avaliados, o extrato de camomila apresentou o maior teor de fenólicos (8,444 mg de GAE/g de erva fresca). Chá preto, dente-de-leão, jasmim e funcho pertenceram ao grupo de médio teor de fenólicos, cujos resultados mantiveram-se entre 7,007 e 7,455 mg de GAE/g de amostra fresca. E, finalmente, os extratos de tomilho, capim-limão, alfazema, hortelã e pêra bergamota foram classificados como grupo com baixo teor de fenólicos (4,642 a 6,786 mg de GAE/g de amostra fresca), sendo que o extrato de pêra apresentou a menor concentração de fenólicos dentre todos os extratos.

Bukhari, Iqbal e Bhanger (2009) avaliaram o potencial antioxidante de extrato de cominho utilizando diferentes solventes como metanol, etanol, diclorometano e hexano para extração dos compostos fenólicos totais. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico. O extrato etanólico de cominho se destacou com o maior teor de fenólicos, cujo resultado foi de 5,97 mg de GAE/g de amostra seca, seguido do extrato metanólico (5,38 mg GAE/g de amostra seca). O teor de fenólicos encontrado no extrato preparado com hexano foi de 1,90 mg GAE/g de amostra. Já o extrato produzido com diclorometano apresentou a menor concentração de fenólicos, cujo valor foi de 1,71 mg GAE/g da erva seca. Segundo os autores, dentre os solventes de extração avaliados, o etanol foi o mais eficiente.

El-Ghorab et al. (2010) avaliaram o teor de compostos fenólicos totais de extratos de gengibre (fresco e seco) e cominho utilizando os solventes n-hexano e metanol. O

teor de fenólicos foi determinado pelo método de *Folin-Ciocalteu* segundo Sun et al. (2007). Os teores de fenólicos encontrados nas seis amostras analisadas foram: 87,5 mg (extrato de gengibre fresco com hexano), 67,5 mg (extrato de gengibre seco com hexano), 10,6 mg (extrato de cominho com hexano), 95,2 mg (extrato de gengibre fresco com metanol), 71,1 mg (extrato de gengibre seco com metanol) e 35,3 mg de GAE/g de extrato (extrato metanólico de cominho). Os resultados mostraram que o extrato metanólico de gengibre fresco apresentou o maior teor de fenólicos. Similarmente, o extrato de hexano de gengibre fresco também apresentou um alto teor de fenólicos. Já os extratos de cominho tiveram baixa concentração de fenólicos, principalmente, o extrato produzido com hexano.

A Tabela 1 apresenta uma comparação entre os teores de compostos fenólicos totais, de extratos etanólico e metanólico de orégano, manjerona, louro, sálvia, tomilho, cominho e endro, obtidos nesta pesquisa, assim como nos trabalhos de Proestos et al. (2005) e Shan et al. (2005).

Tabela 1 - Teor de compostos fenólicos totais nos extratos de especiarias

Extrato de especiaria	Presente pesquisa*	Proestos et al. (2005)**	Shan et al. (2005)***
Orégano	53,77	---	101,7
Alecrim	49,28	21	50,7
Manjerona	45,90	16,9	---
Louro	44,99	---	41,7
Sálvia	34,50	13,6	53,2
Tomilho	29,19	19,2	45,2
Cominho	20,67	---	2,3
Endro	11,31	12,5	9,8

*Compostos fenólicos totais de extratos etanólicos de especiarias expressos em mg de AG/g de amostra seca

**Compostos fenólicos totais de extratos metanólicos de especiarias expressos em mg de AG/g de amostra seca

***Compostos fenólicos totais de extratos metanólicos de especiarias expressos em mg de GAE/g de amostra seca

Observou-se de forma geral que os resultados da presente pesquisa com os de Shan et al. (2005) são comparáveis, isto é, são de mesma ordem de grandeza o que pode levar à conclusão de que tanto o metanol como o etanol são solventes recomendados para a produção de extratos de especiarias ricos em compostos fenólicos. A comparação com os resultados obtidos com o hexano (BUKHARI; IQBAL; BHANGER, 2009) não pode ser feita dada a forma de apresentação dos resultados e a ausência de informações necessárias para a conversão das unidades. A preferência pelo etanol se deve à sua possibilidade de aplicação direta no alimento.

Os resultados apresentados por Proestos et al. (2005) são efetivamente mais baixos quando comparados com os de Shan et al (2005). Isto pode ser explicado pela presença de uma maior proporção de água nos sistemas de solventes aplicados (62,5:37,5 e 80:20 v/v metanol:água, respectivamente).

2.3.3 Atividade antioxidante

A Figura 15 apresenta os resultados da atividade antioxidante (%) dos extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, orégano, louro, manjerona, tomilho, cominho e endro.

Figura 15 - Atividade antioxidante (%) dos extratos hidroalcoólicos de especiarias
Valores médios das triplicatas / Letras diferentes indicadas nas barras diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

De acordo com os resultados apresentados na Figura 15, pode-se observar que o extrato de alecrim diferiu significativamente ($p < 0,05$) das demais amostras apresentando alta atividade antioxidante (91,87%). O extrato de sálvia, que também diferiu ($p < 0,05$) dos demais extratos, foi a segunda fonte natural de maior atividade antioxidante com 88,82%. Em seguida, ficaram os extratos de orégano (86,85%), louro (86,50%), manjerona (85,12%), tomilho (84,05%) e cominho (83,40%), os quais não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si. Todos esses extratos, cujos resultados da atividade antioxidante foram superiores a 70%, demonstraram alta capacidade em sequestrar o radical DPPH. Já o extrato de endro, com atividade de 33,54% foi classificado como uma fonte natural de baixa ação antioxidante, pois apresentou uma atividade inferior a 60%.

Melo et al. (2006) avaliaram a atividade antioxidante de extratos de hortaliças e, os extratos que apresentaram atividade de sequestro do radical DPPH superior a 70% foram considerados com alta ação. Os extratos que exibiram atividade entre 60-70% foram classificados como de ação moderada e aqueles cuja atividade foi inferior a 60% foram considerados com baixa ação antioxidante.

Prado (2009) determinou a atividade antioxidante de extratos de frutas e encontrou no extrato de goiaba a maior atividade antioxidante (83,6%) e no de pitanga uma atividade de 81%, sendo que ambos os extratos não diferiram estatisticamente entre si. Os extratos de acerola e abacaxi também não apresentaram diferença significativa entre si, cujos valores de atividade foram de 71 e 67,8%, respectivamente. Já os extratos de maracujá (58%), melão (43,5%) e manga (35,8%) apresentaram resultados de atividade antioxidante inferior a 60%, ou seja, de baixo potencial antioxidante de acordo com Melo et al. (2006).

Segundo a classificação proposta por Melo et al. (2006) e Prado (2009), foi possível concluir que os extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, orégano, louro, manjerona, tomilho e cominho demonstraram ação antioxidante e foram capazes de sequestrar o radical DPPH, sendo que o extrato de alecrim foi o antioxidante de maior ação e o extrato de endro foi o de menor potencial.

A Figura 16 apresenta os resultados da atividade antioxidante ($\mu\text{mol trolox/g}$ de amostra) dos extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, orégano, louro, manjerona, tomilho, cominho e endro.

Figura 16 - Atividade antioxidante ($\mu\text{mol trolox/g}$ amostra) dos extratos hidroalcoólicos de especiarias. Valores médios das triplicatas / Letras diferentes indicadas nas barras diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

Os resultados da Figura 16 ratificam os da Figura 15, com a vantagem de expressarem a atividade antioxidante com base na massa de amostra original, no caso, massa seca de especiarias. Esses resultados foram a base para a definição dos extratos empregados nos ensaios subsequentes.

Quando se comparou o teor de compostos fenólicos totais com a atividade antioxidante em trolox (Figura 17), observou-se uma relação direta entre esses resultados para os extratos de alecrim, orégano, manjerona, louro e endro. Entretanto, a mesma relação não foi observada para os extratos de sálvia, tomilho e cominho.

Figura 17 - Atividade antioxidante e compostos fenólicos totais dos extratos hidroalcoólicos de especiarias

Wojdylo, Oszmianski e Czemerys (2007) determinaram a atividade antioxidante de extratos metanólicos de especiarias, cujos resultados foram de 0,412 μM , 0,796 μM , 5,13 μM , 0,361 μM , 2,95 μM , 2,53 μM , 0,258 μM e 1 μM de trolox/g de amostra seca para os extratos de sálvia, orégano, alecrim, melissa, tomilho, canela, valeriana e cúrcuma, respectivamente. Segundo os autores, não houve uma relação entre o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante, de forma que o extrato de melissa apresentou o maior teor de fenólicos e o extrato de alecrim comportou-se como a fonte de maior atividade antioxidante.

Mariutti et al. (2008) determinaram a atividade antioxidante de extratos etanólicos de especiarias através do método do radical DPPH. Foram encontrados valores de 6,5 mM, 2,5 mM, 0,8 mM, 1,1 mM, 3,2 mM, 4,4 mM, 6,7 mM, 7,8 mM, 53 mM, 14,8 mM, 0,20 mM, 33,5 mM, 83 mM, 192 mM e 33 mM de trolox/g de amostra, para os extratos de manjerição, pimenta preta, cardamomo, coentro, cominho, endro, alho, gengibre, louro, manjerona, cebola, orégano, alecrim, sálvia e tomilho, respectivamente. O extrato de sálvia se comportou como a fonte natural de maior atividade antioxidante, seguido do alecrim. Ambos apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre si e em relação às demais amostras, contudo esses resultados não puderam ser comparados com os obtidos no presente trabalho por impossibilidade de conversão de unidades.

2.3.4 Testes acelerados de oxidação

2.3.4.1 Teste acelerado em estufa

A Tabela 2 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 antioxidantes (controle = CTL), adicionado de antioxidante sintético TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, tomilho, orégano, manjerona, louro e cominho, na concentração de 100 mg/kg de fenólicos, aquecido em estufa a 63°C por 72, 120 e 180 h.

Tabela 2 - Ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo de soja, isento de antioxidantes, adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de especiarias, na concentração de 100 mg/kg de fenólicos, aquecido em estufa a 63°C por diferentes tempos

(continuação)					
Amostra	Tempo na estufa (h)	AGL*	IP*	UV*	UV*
		(% ácido oléico)	(meq O ₂ /kg amostra)	(232 nm) (E ^{1%} _{1cm})	(270 nm) (E ^{1%} _{1cm})
CTL	0	0,0536 ^e	0,1580 ^c	3,3680 ^a	3,3525 ^a
TBHQ		0,0541 ^b	0,1580 ^c	3,2960 ^b	1,8490 ^c
Alecrim		0,0540 ^c	0,1597 ^a	3,3130 ^{ab}	1,8840 ^{bc}
Sálvia		0,0541 ^b	0,1590 ^b	3,3170 ^{ab}	1,8880 ^b
Tomilho		0,0541 ^b	0,1600 ^a	3,3430 ^a	1,8970 ^b
Orégano		0,0541 ^b	0,1580 ^c	3,3455 ^a	1,9000 ^b
Manjerona		0,0538 ^d	0,1600 ^a	3,3565 ^a	1,9215 ^{ab}
Louro		0,0542 ^a	0,1590 ^b	3,3455 ^a	1,9260 ^{ab}
Cominho		0,0542 ^a	0,1600 ^a	3,3525 ^a	1,9315 ^{ab}
CTL		0,1075 ^a	1,5337 ^a	4,4623 ^a	2,0840 ^a
TBHQ	72	0,0541 ^c	0,3170 ^c	3,3357 ^c	1,8620 ^c
Alecrim		0,0812 ^b	0,9317 ^b	3,5133 ^c	1,8843 ^c
Sálvia		0,0811 ^b	1,0283 ^b	3,4650 ^c	1,8620 ^c
Tomilho		0,0902 ^{ab}	0,9300 ^b	3,5220 ^c	1,8853 ^c
Orégano		0,0903 ^{ab}	1,2313 ^{ab}	3,6533 ^{bc}	1,9580 ^b
Manjerona		0,0993 ^{ab}	1,2847 ^{ab}	3,8213 ^b	1,9893 ^b
Louro		0,0992 ^{ab}	1,3753 ^{ab}	3,9513 ^b	1,9807 ^b
Cominho		0,1084 ^a	1,3390 ^{ab}	3,9633 ^b	1,9930 ^b

Tabela 2 - Ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absorvidade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo de soja, isento de antioxidantes, adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de especiarias, na concentração de 100 mg/kg de fenólicos, aquecido em estufa a 63°C por diferentes tempos

Amostra	Tempo na estufa (h)	(conclusão)			
		AGL*	IP*	UV*	UV*
		(% ácido oléico)	(meq O ₂ /kg amostra)	(232 nm) (E ^{1%} _{1cm})	(270 nm) (E ^{1%} _{1cm})
CTL	120	0,1173 ^a	3,4143 ^a	7,1893 ^a	2,1100 ^a
TBHQ		0,0632 ^b	0,3437 ^d	3,5343 ^d	2,0297 ^{bc}
Alecrim		0,0903 ^{ab}	1,8883 ^c	5,3120 ^c	2,0200 ^c
Sálvia		0,0903 ^{ab}	1,5623 ^c	5,4793 ^c	2,0270 ^{bc}
Tomilho		0,0992 ^a	2,3117 ^b	6,1777 ^b	2,0263 ^{bc}
Orégano		0,0993 ^a	2,6347 ^b	6,2007 ^b	2,0433 ^b
Manjerona		0,1084 ^a	2,6727 ^b	6,8747 ^a	2,0840 ^a
Louro		0,1085 ^a	2,4197 ^b	6,6163 ^{ab}	2,0540 ^b
Cominho		0,1174 ^a	2,5780 ^b	6,9387 ^a	2,0673 ^b
CTL		0,1353 ^a	4,7737 ^a	9,3740 ^a	2,1347 ^a
TBHQ		0,0812 ^d	0,7403 ^d	3,8127 ^e	2,0387 ^c
Alecrim		0,1084 ^c	3,5093 ^c	7,5350 ^d	2,0717 ^b
Sálvia		0,1083 ^c	3,4677 ^c	7,9060 ^c	2,0717 ^b
Tomilho	180	0,1084 ^c	3,3357 ^c	7,9890 ^c	2,0770 ^b
Orégano		0,1084 ^c	3,6350 ^c	8,0290 ^c	2,0790 ^b
Manjerona		0,1173 ^{bc}	3,7873 ^{bc}	9,1087 ^b	2,0977 ^{ab}
Louro		0,1265 ^{ab}	3,8393 ^{bc}	8,9780 ^b	2,0850 ^b
Cominho		0,1353 ^a	4,2007 ^b	9,0717 ^b	2,1150 ^a

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

Os ácidos graxos livres e o glicerol são compostos formados a partir da quebra da ponte éster dos triglicerídeos durante a reação de hidrólise (REGITANO-D'ARCE, 2006). Durante o período de aquecimento, observou-se um leve aumento da acidez em todas as amostras, mantendo-se, porém, em níveis muito aquém do limite estabelecido pela legislação brasileira para óleo de soja refinado.

O índice de peróxido tem sido a metodologia mais usada para acompanhar a incidência do processo oxidativo em óleos e gorduras.

A Figura 18 apresenta a formação de peróxidos no óleo de soja isento de antioxidantes (CTL), adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de louro (L), cominho (C), alecrim (A), manjerona (M), orégano (O), tomilho (T) e sálvia (S), na concentração de 100 mg/kg de fenólicos, em função dos tempos em que foram mantidos em estufa à temperatura de 63°C.

Figura 18 - Índice de peróxido (IP) do óleo de soja, isento de antioxidantes (CTL), adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de louro (L), cominho (C), alecrim (A), manjerona (M), orégano (O), tomilho (T) e sálvia (S), em função do tempo na estufa

Com o tempo de aquecimento, sob condições de oxidação acelerada, o IP aumentou para todas as amostras. Também como esperado, o TBHQ se apresentou como o melhor antioxidante. Nenhum dos extratos conseguiu atribuir a mesma proteção que o antioxidante sintético, embora sejam dignos de nota o desempenho dos extratos de alecrim, sálvia, tomilho e orégano nas condições de temperatura do teste.

Nos tempos de 72, 120 e 180 h de aquecimento em estufa, o TBHQ foi o antioxidante mais eficiente na proteção do óleo contra a oxidação lipídica catalisada por temperatura superior à do ambiente, uma vez que seu IP do óleo inicial de 0,1580 meq O₂/kg de amostra permaneceu menor que 1 meq O₂/kg de amostra até o tempo de 180 h. Já o controle foi a amostra mais suscetível à oxidação, cujo IP do óleo inicial de

0,1580 meq O₂/kg amostra chegou a atingir o valor de 4,7737 meq O₂/kg de amostra durante as 180 h em que foi mantido na estufa sob constante aquecimento.

No tempo de 72 h, o óleo adicionado de extratos de alecrim, sálvia e tomilho não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre si e foram menos suscetíveis que o controle e mais propensos à oxidação que o TBHQ. Em 120 h, o óleo com adição de extratos de alecrim e sálvia não diferiram significativamente ($p > 0,05$) entre si, demonstrando maior potencial antioxidante em relação ao controle e aos demais extratos de especiarias. Com 180 h de aquecimento em estufa, o óleo de soja, isento de antioxidantes, foi a amostra mais oxidada e, por outro lado, o óleo com adição de TBHQ foi o menos oxidado.

O exame espectrofotométrico na faixa do ultravioleta pode fornecer indicações sobre a qualidade de uma substância lipídica, seu estado de conservação e as modificações provocadas pelos processos tecnológicos, pois os produtos da auto-oxidação de óleos e gorduras exibem espectros característicos nessa região. Os valores de tais absorbâncias são expressos como coeficiente de extinção ou absorbância específica $E^{1\%}_{1\text{cm}}$ (absortividade de uma solução de matéria graxa a 1% no solvente prescrito, em célula com passagem ótica de 1 cm), de acordo com a metodologia da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC, 1979).

Segundo Regitano-d'Arce (2006), a análise do UV é capaz de fornecer informações, sempre em termos relativos, da auto-oxidação dos ácidos graxos visto ser acompanhada da isomerização (*cis*, *trans*, conjugações) que é absorvida em comprimentos de onda específicos na faixa do ultravioleta (232 nm para os dienos conjugados e 270 nm para os trienos conjugados).

Analisando os resultados apresentados na Tabela 2 da absortividade em 232 nm, foi observado que, nos tempos de 72, 120 e 180 h, o controle foi a amostra mais suscetível a oxidação dos ácidos graxos.

No tempo de 72 h, o óleo de soja adicionado de extratos de alecrim, sálvia, tomilho e orégano não diferiu ($p > 0,05$) do óleo com TBHQ e, com isso, esses extratos naturais conseguiram retardar o processo oxidativo da mesma forma que o antioxidante sintético.

Com 120 h de aquecimento em estufa, o controle não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) dos óleos adicionados de extratos de manjerona, louro e cominho. Os óleos adicionados de extratos de alecrim e sálvia, cujos valores da absortividade no UV foram de 5,3120 e 5,4793 $E^{1\%}_{1cm}$, respectivamente, apresentaram maior eficiência em retardar a formação de dienos (produtos primários da oxidação lipídica) do que o controle e os demais extratos, sendo menos eficientes apenas que o antioxidante sintético (3,5343 $E^{1\%}_{1cm}$).

No tempo de 180 h, o óleo adicionado de TBHQ foi a amostra menos suscetível ao processo oxidativo, seguido do óleo com adição de extrato de alecrim.

A Figura 19 mostra a absortividade específica na faixa do UV em 232 nm do óleo de soja isento de antioxidantes (CTL), adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de louro (L), cominho (C), alecrim (A), manjerona (M), orégano (O), tomilho (T) e sálvia (S), na concentração de 100 mg/kg de fenólicos, no tempo zero e nos tempos de 72, 120 e 180 h de aquecimento em estufa, à temperatura de 63°C.

Figura 19 - Absortividade específica na faixa do UV (232 nm) do óleo de soja, isento de antioxidantes (CTL), adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de louro (L), cominho (C), alecrim (A), manjerona (M), orégano (O), tomilho (T) e sálvia (S), em função do tempo na estufa

Segundo Gamba e Mazzini (1982), o aumento do índice de peróxido com o tempo influi diretamente na absorção do espectro na região do ultravioleta, mas não com a mesma magnitude. Os valores de absorvidade em 232 nm geralmente apresentam boa correlação com o aumento do índice de peróxido, comprovado por Almeida-Doria e Regitano-d'Arce (2000) e Vieira e Regitano-d'Arce (2001).

Na presente pesquisa também foi possível relacionar os valores de IP e UV em 232 nm. Foi observado que, no tempo de 72 h, os extratos de alecrim, sálvia, tomilho e orégano demonstraram, em ambas as determinações analíticas, boa proteção antioxidante ao óleo. Em 120 h, tanto no IP como no UV, o óleo adicionado de extratos de alecrim e sálvia estavam menos propensos à oxidação do que o controle e os demais extratos de especiarias. No tempo de 180 h, a tendência se repetiu.

A Figura 20 apresenta a absorvidade na faixa do UV em 270 nm do óleo de soja isento de antioxidantes (CTL), adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de louro (L), cominho (C), alecrim (A), manjerona (M), orégano (O), tomilho (T) e sálvia (S), na concentração de 100 mg/kg de fenólicos, no tempo zero e nos tempos de 72, 120 e 180 h de aquecimento em estufa a 63°C.

Figura 20 - Absorvidade específica na faixa do UV (270 nm) do óleo de soja, isento de antioxidantes (CTL), adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de louro (L), cominho (C), alecrim (A), manjerona (M), orégano (O), tomilho (T) e sálvia (S), em função do tempo na estufa

Quanto à formação de trienos, novamente o TBHQ demonstrou ser o melhor antioxidante. Entretanto, os extratos de alecrim, sálvia e tomilho apresentaram bom desempenho na proteção do óleo contra a oxidação lipídica.

Desse modo, constatou-se que os extratos de alecrim, sálvia e tomilho demonstraram boa ação antioxidante contra a formação de produtos gerados pelas reações oxidativas do óleo. Por isso, foi proposto um novo teste de estufa através da adição de concentrações maiores que 100 mg/kg de fenólicos, a fim de verificar o comportamento do óleo, adicionado de 250 e 500 mg/kg de fenólicos, perante à oxidação acelerada sob as mesmas condições do primeiro ensaio.

No segundo ensaio, o TBHQ, nas concentrações de 100 e 200 mg/kg, e os extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia e tomilho, nas concentrações de 250 e 500 mg/kg, foram adicionados ao óleo e mantidos em estufa a 63°C por 36, 72 e 96 h.

A Tabela 3 apresenta os resultados de ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo de soja isento de antioxidantes (controle = CTL) e adicionado de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia e tomilho, na concentração de 250 mg/kg de fenólicos.

Tabela 3 - Ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo de soja, isento de antioxidantes e adicionado de extratos hidroalcoólicos de especiarias, na concentração de 250 mg/kg de fenólicos, aquecido em estufa a 63°C por diferentes tempos

Amostra	Tempo na estufa (h)	(continuação)			
		AGL* (% ácido oléico)	IP* (meq O ₂ /kg amostra)	UV* (232nm) (E ^{1%} _{1cm})	UV* (270nm) (E ^{1%} _{1cm})
CTL	0	0,0542 ^a	0,1590 ^b	3,5280 ^a	2,0360 ^a
Alecrim		0,0542 ^a	0,1600 ^a	3,4665 ^a	1,9870 ^b
Sálvia		0,0542 ^a	0,1600 ^a	3,5350 ^a	1,9880 ^b
Tomilho		0,0542 ^a	0,1600 ^a	3,3500 ^b	1,9760 ^b
CTL	36	0,1085 ^a	0,8030 ^a	4,1640 ^a	1,9827 ^a
Alecrim		0,0723 ^b	0,4813 ^b	3,5770 ^{bc}	1,9857 ^a
Sálvia		0,0723 ^b	0,4820 ^b	3,7037 ^b	1,9980 ^a
Tomilho		0,0723 ^b	0,4820 ^b	3,4577 ^c	2,0080 ^a

Tabela 3 - Ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absorvidade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo de soja, isento de antioxidantes e adicionado de extratos hidroalcoólicos de especiarias, na concentração de 250 mg/kg de fenólicos, aquecido em estufa a 63°C por diferentes tempos

Amostra	Tempo na estufa (h)	AGL* (% ácido oléico)	IP* (meq O ₂ /kg amostra)	(conclusão)	
				UV* (232nm) (E ^{1%} _{1cm})	UV* (270nm) (E ^{1%} _{1cm})
CTL	72	0,1174 ^a	1,6060 ^a	5,9210 ^a	2,0743 ^a
Alecrim		0,0903 ^b	0,8563 ^b	4,6983 ^b	2,0703 ^a
Sálvia		0,0903 ^b	0,9103 ^b	4,8027 ^b	2,0617 ^b
Tomilho		0,0903 ^b	0,9097 ^b	4,8297 ^b	2,0793 ^a
CTL	96	0,1356 ^a	2,1947 ^b	8,6173 ^a	2,0850 ^a
Alecrim		0,0994 ^b	1,2317 ^b	5,0787 ^b	2,0247 ^b
Sálvia		0,0994 ^b	1,2847 ^b	5,1977 ^b	2,0237 ^b
Tomilho		0,0994 ^b	1,2847 ^b	5,1320 ^b	2,0240 ^b

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

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostraram que no tempo de 36 h de estufa, os valores de IP e UV em 232 nm apresentaram uma relação direta e crescente. O controle foi a amostra mais suscetível à oxidação lipídica. No tempo de 72 h, o comportamento do óleo adicionado de extratos de alecrim, sálvia e tomilho foi semelhante, à medida que estes extratos não diferiram (p>0,05) entre si quanto ao IP e UV 232 nm, proporcionando melhor proteção antioxidante ao óleo do que o controle. No UV (270 nm), o extrato de sálvia apresentou diferença (p<0,05) em relação às demais amostras e foi o antioxidante mais eficaz em inibir a formação de trienos conjugados no óleo.

Com 96 h de estufa, os óleos adicionados de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia e tomilho não apresentaram diferença significativa (p>0,05) entre si proporcionando boa ação antioxidante ao óleo.

Com isso, observou-se que o óleo de soja adicionado de extratos de alecrim, sálvia e tomilho apresentou menor suscetibilidade à oxidação do que o controle. Além disso, com exceção do UV (270 nm) no tempo de 72 h, não houve diferença

significativa ($p>0,05$) entre os extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia e tomilho quando adicionados ao óleo de soja na concentração de 250 mg/kg de fenólicos.

A Tabela 4 apresenta os resultados de ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo de soja isento de antioxidantes (controle = CTL) e adicionado de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia e tomilho, na concentração de 500 mg/kg de fenólicos.

Tabela 4 - Ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo de soja, isento de antioxidantes e adicionado de extratos hidroalcoólicos de especiarias, na concentração de 500 mg/kg de fenólicos, aquecido em estufa a 63°C por diferentes tempos

Amostra	Tempo na estufa (h)	AGL* (% ácido oléico)	IP* (meq O ₂ /kg amostra)	UV* (232nm) (E ^{1%} _{1cm})	UV* (270nm) (E ^{1%} _{1cm})
CTL	0	0,0542 ^a	0,1590 ^b	3,5280 ^a	2,0360 ^a
Alecrim		0,0542 ^a	0,1600 ^a	3,3230 ^b	2,0050 ^a
Sálvia		0,0542 ^a	0,1600 ^a	3,5570 ^a	2,0087 ^a
Tomilho		0,0542 ^a	0,1600 ^a	3,3730 ^{ab}	1,9940 ^a
CTL	36	0,1085 ^a	0,8030 ^a	4,1640 ^a	1,9827 ^{ab}
Alecrim		0,1084 ^a	0,5353 ^b	3,7793 ^b	1,9450 ^b
Sálvia		0,1084 ^a	0,5353 ^b	3,6670 ^{bc}	2,0083 ^a
Tomilho		0,1084 ^a	0,5353 ^b	3,5510 ^c	1,9510 ^b
CTL	72	0,1174 ^a	1,6060 ^a	5,9210 ^a	2,0743 ^a
Alecrim		0,1084 ^a	0,9107 ^b	4,6830 ^c	2,0590 ^b
Sálvia		0,1084 ^a	0,9637 ^b	4,9260 ^b	2,0533 ^b
Tomilho		0,1085 ^a	0,9640 ^b	4,9777 ^b	2,0660 ^{ab}
CTL	96	0,1356 ^a	2,1947 ^a	8,6173 ^a	2,0850 ^a
Alecrim		0,1084 ^b	1,1777 ^b	4,5543 ^d	1,9760 ^b
Sálvia		0,1084 ^b	1,3390 ^b	5,9977 ^c	2,0200 ^b
Tomilho		0,1084 ^b	1,3383 ^b	6,2757 ^b	2,0287 ^b

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

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, no tempo zero e nos tempos de 36 e 72 h de aquecimento em estufa, foi observado que o óleo de soja isento de antioxidantes e adicionado de extratos de alecrim, sálvia e tomilho não diferiram ($p>0,05$) entre si quanto ao teor de ácidos graxos livres. No entanto, no IP e no UV em 232 nm, o tratamento controle foi a amostra mais suscetível à oxidação em todos os tempos de estufa.

Dessa forma, quanto ao teor de ácidos graxos livres e índice de peróxido, foi verificado que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia e tomilho quando adicionados ao óleo de soja na concentração de 500 mg/kg de fenólicos.

Entretanto, no UV em 232 nm, com 72 e 96 h de aquecimento em estufa, o extrato de alecrim diferiu ($p<0,05$) dos extratos de sálvia e tomilho, oferecendo maior proteção antioxidante ao óleo contra a formação de dienos. E, no UV em 270 nm, com 36 h de estufa, os extratos de alecrim e tomilho não diferiram ($p>0,05$) entre si, apresentando maior potencial antioxidante na proteção do óleo contra a formação de trienos.

Observou-se o comportamento do óleo de soja, isento de antioxidantes, adicionado de extratos de alecrim, sálvia e tomilho, na concentração de 250 mg/kg de fenólicos e adicionado de extratos de alecrim, sálvia e tomilho, na concentração de 500 mg/kg de fenólicos.

A Figura 21 apresenta o índice de peróxido (IP) do óleo de soja, isento de antioxidantes (controle = CTL), adicionado de extratos de alecrim (A 250), sálvia (S 250) e tomilho (T 250), na concentração de 250 mg/kg de fenólicos e adicionado de extratos de alecrim (A 500), sálvia (S 500) e tomilho (T 500), na concentração de 500 mg/kg de fenólicos, no tempo zero e aquecido em estufa a 63°C por 36, 72 e 96 h.

Figura 21 - Índice de peróxido (IP) do óleo de soja, isento de antioxidantes (CTL), adicionado de extratos de alecrim (A250), sálvia (S250) e tomilho (T250), na concentração de 250 mg/kg de fenólicos e adicionado de extratos de alecrim (A500), sálvia (S500) e tomilho (T500), na concentração de 500 mg/kg de fenólicos, em função do tempo na estufa

De acordo com a Figura 21, observou-se que os extratos de alecrim, sálvia e tomilho, adicionados ao óleo nas concentrações de 250 e 500 mg/kg de fenólicos, apresentaram entre si um comportamento semelhante na proteção do óleo de soja contra a formação de peróxidos e demonstraram maior estabilidade oxidativa do que o controle à temperatura de 63°C. Com isso, concluiu-se que os extratos de alecrim, sálvia e tomilho apresentaram a mesma proteção antioxidante quando adicionados ao óleo nas duas concentrações avaliadas.

No segundo ensaio em estufa, além da adição de extratos de alecrim, sálvia e tomilho, o TBHQ também foi adicionado ao óleo de soja, porém em diferentes concentrações. A Tabela 5 apresenta os resultados de ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absortividade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo adicionado de 100 e 200 mg de TBHQ/kg.

Tabela 5 - Ácidos graxos livres (AGL), índice de peróxido (IP) e absorvidade na faixa do ultravioleta (UV) do óleo de soja adicionado de TBHQ, nas concentrações de 100 e 200 mg/kg, mantido em estufa a 63°C por 36, 72 e 96 horas

Amostra	Tempo na estufa (h)	100 mg/kg	200 mg/kg
TBHQ	AGL* (% ácido oléico)		
	0	0,0542 ^b	0,0542 ^b
	36	0,0542 ^b	0,0542 ^b
	72	0,0542 ^b	0,0542 ^b
	96	0,0813 ^a	0,0813 ^a
	IP* (meq O ₂ /kg amostra)		
	0	0,1600 ^c	0,1600 ^c
	36	0,1607 ^c	0,1607 ^c
	72	0,3210 ^b	0,3210 ^b
	96	0,4220 ^a	0,4223 ^a
	UV* 232 nm (E ^{1%} _{1cm})		
	0	3,3375 ^c	3,3370 ^c
	36	3,4900 ^b	3,5307 ^b
	72	3,6157 ^a	3,6187 ^a
	96	3,6413 ^a	3,6433 ^a
	UV* 270 nm (E ^{1%} _{1cm})		
	0	1,9440 ^c	1,9745 ^b
	36	1,9713 ^b	1,9897 ^b
	72	2,0210 ^a	2,0620 ^a
	96	1,9657 ^{bc}	1,9763 ^b

*Médias com letras diferentes, na mesma coluna, para cada tempo em estufa e para cada parâmetro diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Os resultados da Tabela 5 mostraram que o TBHQ apresentou um comportamento semelhante ao longo dos tempos de aquecimento em estufa. Com isso, observou-se que este antioxidante proporcionou a mesma proteção ao óleo quando adicionado em dobro à concentração de 100 mg/kg. Esses resultados foram base para identificar o TBHQ, na concentração de 100 mg/kg, como um potente antioxidante capaz de inibir a oxidação do óleo de soja à temperatura de 63°C.

A Figura 22 mostra a formação de peróxidos no óleo de soja, isento de antioxidantes, adicionado de TBHQ, nas concentrações de 100 e 200 mg/kg e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia e tomilho, nas concentrações de 100, 250 e 500 mg/kg de fenólicos, aquecido em estufa a 63°C por diferentes tempos.

Figura 22 - Índice de peróxido (IP) do óleo de soja, isento de antioxidantes, adicionado de TBHQ, nas concentrações de 100 e 200 mg/kg e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, tomilho e sálvia, nas concentrações de 100, 250 e 500 mg/kg de fenólicos, em função do tempo na estufa

A Figura 22 mostrou que houve uma tendência crescente quanto à formação de peróxidos ao longo dos tempos em que o óleo de soja permaneceu acondicionado em estufa sob aquecimento. Mais uma vez se observou que o controle foi a amostra mais suscetível à oxidação, ao contrário do óleo adicionado de TBHQ o qual apresentou maior estabilidade oxidativa. Esta figura permitiu a comparação entre os desempenhos antioxidantes dos extratos nas três concentrações avaliadas. Com isso, conclui-se que as melhores especiarias foram alecrim, tomilho e sálvia. Isso pode ser visualizado em todos os tempos de estufa, principalmente no tempo de 72 h. E que esses extratos adicionados ao óleo de soja, nas concentrações de 100, 250 e 500 mg/kg de fenólicos, proporcionaram a mesma proteção antioxidante ao óleo no teste em estufa.

2.3.4.2 Estabilidade oxidativa em Rancimat

No teste de estabilidade oxidativa em Rancimat, o fluxo intenso de oxigênio e a temperatura elevada de 110°C favoreceram a oxidação acelerada do óleo, promovendo a formação de compostos (ácidos voláteis) ao final do período de indução. Ao término do teste, o aparelho indicou o número de horas (período de indução) que cada amostra conseguiu permanecer estável sob condições aceleradas, favoráveis à oxidação das amostras. Quanto maior o período de indução, maior é a estabilidade da amostra perante a oxidação acelerada e, portanto, menos suscetível.

A Tabela 6 apresenta os resultados do período de indução dos óleos sem adição de antioxidantes (controle), adicionado de 100 mg/kg de fenólicos dos extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, tomilho, orégano, manjerona, louro e cominho e de antioxidante sintético TBHQ.

Tabela 6 - Período de indução (PI) dos óleos controle e adicionado de diferentes antioxidantes na concentração de 100 mg/kg de fenólicos

Amostras	Período de indução (h)*
Controle	7,18
TBHQ 100	14,27
Alecrim	8,48
Sálvia	6,52
Tomilho	7,65
Orégano	6,80
Manjerona	7,20
Louro	7,56
Cominho	7,68

*Médias das duplicatas

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostraram que o óleo com adição de extrato de alecrim conseguiu manter-se estável por um maior número de horas em relação aos demais extratos de especiarias e ao controle. Entretanto, o TBHQ foi o antioxidante que proporcionou maior estabilidade ao óleo de soja frente à oxidação catalisada por alta temperatura.

A Tabela 7 apresenta os resultados do período de indução dos óleos sem adição de antioxidantes (controle), adicionado de TBHQ nas concentrações de 100 e 200 mg/kg e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia e tomilho nas concentrações de 100, 250 e 500 mg/kg de fenólicos.

Tabela 7 - Período de indução (PI) da amostra controle e dos óleos adicionados de diferentes antioxidantes nas concentrações de 100, 200, 250 e 500 mg/kg de fenólicos

Amostras	Período de indução (h)*
Controle	7,18
TBHQ 100	14,27
TBHQ 200	16,72
Alecrim 100	8,48
Alecrim 250	9,75
Alecrim 500	11,38
Sálvia 100	6,52
Sálvia 250	8,36
Sálvia 500	9,51
Tomilho 100	7,65
Tomilho 250	8,03
Tomilho 500	8,50

*Médias das duplicatas

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostraram que o óleo de soja adicionado de TBHQ, nas duas concentrações, manteve-se estável por um maior número de horas, de modo que este antioxidante foi eficaz em inibir a oxidação do óleo perante a alta temperatura do teste.

O óleo de soja adicionado de extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia e tomilho apresentou período de indução semelhante ao do óleo de soja isento de antioxidantes. Isso mostrou que os compostos ativos, presentes nos extratos, podem ter sido destruídos pela temperatura de 110°C.

Dentre os extratos hidroalcoólicos, o extrato de alecrim, adicionado na concentração de 500 mg/kg de fenólicos, foi o antioxidante natural que proporcionou maior estabilidade oxidativa ao óleo nas condições do Rancimat.

Contudo, dada a influência dessa concentração na coloração do óleo e ao entendimento de que esse comportamento apresentado no Rancimat se deveu a exposição à temperatura elevada, optou-se por prosseguir o trabalho com a menor concentração de extratos, ou seja, 100 mg/kg de fenólicos, cuja ação antioxidante oferecida ao óleo de soja foi demonstrada no teste acelerado em estufa. Da mesma forma, incluiu-se o extrato de orégano, dado o seu alto teor de compostos fenólicos e seu bom desempenho na estufa.

2.3.5 Análise sensorial

A Tabela 8 apresenta as médias atribuídas pelos consumidores ao óleo de soja, adicionado de TBHQ e de extratos de alecrim, orégano, tomilho e sálvia, na concentração de 100 mg/kg de fenólicos, avaliado sensorialmente quanto às características de cor, aroma e sabor.

Tabela 8 - Teste de preferência do óleo de soja adicionado de TBHQ e de extratos de especiarias

Características sensoriais	TBHQ*	Alecrim*	Orégano*	Tomilho*	Sálvia*
Cor	6,0 ^a	5,7 ^a	4,8 ^b	4,3 ^b	4,8 ^b
Aroma	4,8 ^a	4,8 ^a	4,5 ^a	4,3 ^a	4,6 ^a
Sabor	4,7 ^a	5,1 ^a	4,7 ^a	5,1 ^a	5,1 ^a

*Média das notas dos consumidores / Médias seguidas de letras diferentes, na mesma linha, diferem significativamente ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey

1 – desgostei muito; 2 – desgostei regularmente; 3 – desgostei ligeiramente; 4 – não desgostei nem gostei; 5 – gostei ligeiramente; 6 – gostei regularmente; 7 – gostei muito

Os resultados da análise sensorial mostraram que para a característica cor, houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o óleo adicionado de TBHQ e dos extratos das especiarias, com exceção do extrato de alecrim, os quais foram os mais preferidos pelos consumidores e cujas médias corresponderam, na escala hedônica utilizada, entre gostei ligeiramente a regularmente.

Observou-se que o óleo, após a adição de TBHQ e de extrato hidroalcoólico de alecrim, manteve sua coloração clara e transparente, semelhante a do óleo de soja isento de antioxidantes. Além disso, foi perceptível que os extratos de sálvia e tomilho interferiram na coloração do óleo aumentando a intensidade da cor verde e que o óleo adicionado de extrato de orégano tornou-se mais opaco.

Quanto ao aroma e sabor, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre o óleo adicionado de TBHQ e de extratos de especiarias, em ambas as características, e, com isso, não houve uma preferência com relação a um determinado óleo.

Entretanto, no aroma observou-se que os óleos adicionados de TBHQ e de extrato de alecrim demonstraram uma preferência aleatória (ao acaso), com médias de 4,8, em relação aos óleos adicionados de extratos de orégano, tomilho e sálvia.

Quanto ao sabor, houve uma tendência aleatória com relação ao óleo com extratos de alecrim, tomilho e sálvia, cuja média atribuída pelos consumidores de 5,1 ficou na escala hedônica entre cinco (gostei ligeiramente) e seis (gostei regularmente). Importante ressaltar que, mesmo que a média do antioxidante sintético não tenha apresentado diferença significativa ($p>0,05$) em relação às demais, a mesma correspondeu na escala usada a não desgostei nem gostei e gostei ligeiramente.

Figura 23 - Preferência dos consumidores pelo óleo de soja adicionado de TBHQ e de extratos hidroalcoólicos de alecrim, orégano, tomilho e sálvia

Desse modo, concluiu-se que houve uma preferência significativa ($p < 0,05$) e aleatória pelos consumidores, quanto às características de cor, aroma e sabor, pelo óleo de soja com adição de extrato hidroalcoólico de alecrim, na concentração de 100 mg/kg de fenólicos, conforme apresentada na Figura 23.

3 CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais pode-se concluir que:

- O emprego do etanol possibilitou a extração dos compostos fenólicos e a produção de extratos etanólicos de especiarias com ação antioxidante.
- O teor de compostos fenólicos totais esteve diretamente relacionado à atividade antioxidante dos extratos de alecrim, orégano, manjerona, louro e endro.
- Os extratos hidroalcoólicos de alecrim, sálvia, tomilho e orégano foram capazes de retardar a formação de compostos resultantes da oxidação do óleo de soja.
- Os extratos de alecrim, sálvia e tomilho, adicionados ao óleo de soja, foram igualmente eficientes em sua ação antioxidante no teste acelerado em estufa.
- Houve uma preferência dos consumidores pelo óleo de soja adicionado de extrato hidroalcoólico de alecrim quanto às características sensoriais de cor, aroma e sabor.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, A.E.; ROOZEN, J.P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. **Food Chemistry**, Barking, v. 64, n. 3, p. 323-329, 1999.

ABDEL-AAL, E.S.M.; RABALSKI, I. Bioactive compounds and their antioxidant capacity in selected primitive and modern wheat species. **The Open Agriculture Journal**, Perth, v. 2, n. 1, p. 7-14, 2008.

ABDILLE, M.H.; SINGHA, R.P.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JENA, B.S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, Barking, v. 90, n. 4, p. 891-896, 2005.

AJAIKUMAR, K.B.; ASHEEF, M.; BABU, B.H.; PADIKKALA, J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 96, n. 1, p. 171-176, 2005.

ALI, S.S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, Essex, v. 41, n. 1, p. 1-15, 2008.

ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. **Rancidity in foods**. Londres: Blackie Academic & Professional, 1994. 273p.

AL-MAMARY, M.; AL-MEERI, A.; AL-HABORI, M. Antioxidant activities and total phenolics of different types of honey. **Nutrition Research**, New York, v. 22, n. 3, p. 1041-1047, 2002.

ALMEIDA-DORIA, R.F. **Ação antioxidante de extratos etanólicos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) em óleo de soja submetido à termoxidação e fotoxidação**. 1999. 71 p. Dissertação (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. 17-20, 2000.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R.B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J.A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, Barking, v. 84, n. 4, p. 551-562, 2004.

AMAROWICZ, R.; WANASUNDARA, U.; WANASUNDARA, J.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of ethanolic extracts of flaxseed in a b-carotene-linoleate model system. **Journal of Food Lipids**, London, v. 1, n. 2, p. 111-117, 1993.

AMAROWICZ, R.; ZEGARSKA, Z.; RAFALOWSKI, R.; PEGG, R.B.; KARAMAC, M.; KOSINSKA, A. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of ethanolic extracts of thyme, oregano, and marjoram. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 111, n. 11, p. 1111-1117, 2009.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices**. Champaign, 2003. 1v.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **Manual on sensory testing methods**. Philadelphia, 1968. 118p.

ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; KERBER, V.A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, *Leguminosae-mimosoideae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Avaliação do óleo de girassol adicionado de antioxidantes sob estocagem. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 1-5, 2008.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, London, v. 127, p. 183-185, 2002.

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

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

BANDONIENE, D.; VENSKUTONIS, P.R.; GRUZDIENE, G.; 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**, Weinheim, v. 104, n. 5, p. 286-292, 2002.

BARRETO, A.C.S. **Efeito da adição de antioxidantes naturais na oxidação lipídica e cor de carne de frango e derivado**. 1996. 142 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. 2nd ed. Berlim: Springer Verlag, 1999. 715p.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. Ferric reducing antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 15-27, 1999.

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

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

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

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC 276**, 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 15 jun. 2011.

BRENNA, O.V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 10, p. 4841-4844, 2001.

BUKHARI, S.B.; IQBAL, S.; BHANGER, M.I. Antioxidant potential of commercially available cumin (*Cuminum cyminum*) in Pakistan. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Basingstoke, v. 60, n. 3, p. 240-247, 2009.

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

CAI, Y.Z.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, Taipei, v. 74, n. 17, p. 2157-2184, 2004.

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

CARVALHO, A.F. **Ervas e temperos**: cultivo, processamento e receitas. Viçosa: Aprenda Fácil, 2002. 296p.

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

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

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

CHUN, O.K.; KIM, D.O.; SMITH, N.; SCHROEDER, D.; HAN, J.T.; LEE, C.Y. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruits and vegetables in the American diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 85, n. 10, p. 1715-1724, 2005.

COCHRAN, W.G.; COX, G.M. **Experimental designs**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1957. 611p.

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

DECKER, E.A. Antioxidant mechanisms. In: AKOH, C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1998. chap. 11, p. 397-421.

DELAZAR, A.; TALISCHI, B.; NAZEMIYEH, H.; REZAZADEH, H.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Chrozophorin: a new acylated flavone glucoside from *Chrozophora tinctoria* (*Euphorbiaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 3, p. 286-290, 2006.

DELLA MODESTA, R.C. **Manual de análise sensorial de alimentos e bebidas: geral**. Rio de Janeiro: Embrapa, 1994. 115p.

DELMAS, D.; JANNIN, B.; LATRUFFE, N. Resveratrol: preventing properties against vascular alterations and ageing. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 49, n. 5, p. 377-395, 2005.

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.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial de alimentos e bebidas**. 2. ed. Curitiba: Champagnat, 2007. 239p.

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

EMPSON, K.L.; LABUZA, T.P.; GRAF, E. Phytic acid as a food antioxidant. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 56, n. 2, p. 560-563, 1991.

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

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

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 of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 19, p. 5294-5299, 2002.

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

FRANK, J.; GEIL, J.V.; FREASO, R. Automatic determination of oxidation stability of oil and fatty products. **Food Technology**, Champaign, v. 36, n. 6, p. 71-76, 1992.

FRANKEL, E.N.; HUANG, S.W. Improving the oxidative stability of polyunsaturated vegetable oils by blending with high oleic sunflower oil. **The Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 71, n. 3, p. 255-259, 1994.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 80, n. 13, p. 1925-1941, 2000.

FRANKEL, E.N.; WATERHOUSE, A.L.; TEISSEDRE, P.L. Principle phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoprotein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 4, p. 890-894, 1995.

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.

GAO, X.; OHLANDER, M.; JEPSSON, N.; BJORK, L.; TRAJKOVSKI, V. Changes in antioxidant effects and their relationship to phytonutrients in fruits of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) during maturation. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 5, p. 1485-1490, 2000.

GIADA, M.L.R. **Avaliação da capacidade antioxidante dos compostos fenólicos do cotilédono da semente de girassol (*Helianthus annuus* L.) rajada**. 2006. 188 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

GIADA, M.L.R.; MANCINI-FILHO, J. The *in vitro* antioxidant activity of food phenolic compounds. **Nutrire**, São Paulo, v. 28, p. 91-107, 2004.

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

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

GOMEZ-RUIZ, J.A.; LEAKE, D.S.; AMES, J.M. *In vitro* antioxidant activity of coffee compounds and their metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 17, p. 6962-6969, 2007.

GRAY, J.I. Simple chemical and physical methods for measuring flavor quality of fats and oils. In: MIN, D.B.; SMOUSE, T.H. **Flavor chemistry of fats and oils**. Champaign: AOCS, 1985. chap. 12, p. 223-240.

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

GUNSTONE, F.D.; NORRIS, F.A. **Lipids in foods: chemistry, biochemistry and technology**. New York: Pergamon Press, 1983. 1273p.

GYAMFI, M.A.; YONAMINE, M.; ANIYA, Y. Free-radical scavenging action of medicinal herbs from *Ghana Thonningia sanguinea* on experimentally-induced liver injuries. **General Pharmacology**, Bristol, v. 32, n. 6, p. 661-667, 1999.

HALLIWELL, B. **Encyclopedia of life sciences**. London: Nature Publishing Group, 2001. 350p.

HAMAMA, A.A.; NAWAR, W.W. Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 39, n. 6, p. 1063-1069, 1991.

HILL, S.E. A comparison of modern instruments for the analysis of the oxidation stability of fats, oils and foods. **Inform**, Champaign, v. 5, n. 1, p. 104-109, 1994.

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

HU, C.; CAI, Y.Z.; LI, W.; CORKE, H.; KITTS, D.D. Anthocyanin characterization and bioactivity assessment of a dark blue grained wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Hedong Wumai) extract. **Food Chemistry**, Barking, v. 104, n. 3, p. 955-961, 2007.

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

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

INTERNACIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 6th ed. Oxford: Pergamon Press, 1979. 71p.

KAHKONEN, M.P.; HOPIA, A.I.; HEIKKI, J.V.; RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, London, v. 44, n. 6, p. 453-464, 2004.

KATALINIC, V.; MILOS, M.; JUKIC, M. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, Barking, v. 94, n. 4, p. 550-557, 2006.

KAWAREE, R.; OKONOGI, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S.; PHUTDHAWONG, W. Chemical composition and antioxidant evaluation of volatile oils from Thai medicinal plants. **Acta Horticulturae**, Hague, v. 786, p. 209-215, 2008.

KIM, D.O.; JEONG, S.W.; LEE, C.Y. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. **Food Chemistry**, Barking, v. 81, n. 3, p. 321-326, 2003.

KOLEVA, I.I.; VAN BEEK, T.A.; LINSSEN, J.P.H.; GROOT, A.; EVSTATIEVA, L.N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 13, n. 1, p. 8-17, 2002.

KOSAR, M.; DORMAN, H.J.D.; HILTUNEN, R. Effect of an acid treatment on the phytochemical and antioxidant characteristics of extracts from selected *Lamiaceae* species. **Food Chemistry**, Barking, v. 91, n. 3, p. 525-533, 2005.

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

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

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

LEAL, E.S. **Extração, obtenção e caracterização parcial de ácido fítico do germe grosso de milho e aplicação como antioxidante**. 2000. 86 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.

LIM, Y.Y.; MURTIJAYA, J. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. **Food Science and Technology**, London, v. 40, n. 9, p. 1664-1669, 2007.

LIMA, A.R.; BARBOSA, V.C.; SANTOS FILHO, P.R.; GOUVEA, C.M.C.P. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 4, p. 531-536, 2006.

LIU, X.; DONG, M.; CHEN, X.; JIANG, M.; LV, X.; YAN, G. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. **Food Chemistry**, Barking, v. 105, n. 2, p. 548-554, 2007.

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

LUO, Q.; CAI, Y.Z.; YAN, J.; SUN, M.; CORKE, H. Hypoglycemic and hypolipidemic effects and antioxidant activity of fruit extracts from *Lycium barbarum*. **Life Sciences**, Taipei, v. 76, n. 2, p. 137-149, 2004.

MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **The Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 45, n. 9, p. 594-598, 1968.

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

MARTINEZ-TOME, M.; JIMENEZ, A.M.; RUGGIERI, S.; FREGA, N.; STRABBIOLI, R.; MURCIA, M. Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 64, n. 9, p. 1412-1419, 2001.

MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M.J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 51, n. 1, p. 5-18, 2000.

MATA, A.T.; PROENÇA, A.R.; SERRALHEIRO, M.L.M.; NOGUEIRA, J.M.F.; ARAÚJO, M. E.M. Antioxidant and aniacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, Barking, v. 103, n. 3, p. 778-786, 2007.

MCCORD, J. M. Free radicals and pro-oxidants in health and nutrition. **Food Technology**, Champaign, v. 48, n. 3, p. 106-110, 1994.

MCKEITH, G. **A bíblia da alimentação**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 396p.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. Boca Raton: CRC Press, 2007. 448p.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; LEAL, F.L.L.; CAETANO, A.C.S.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

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

MINIM, V.P.R. **Análise sensorial: estudos com consumidores**. Viçosa: UFV, 2006. 225p.

MINITAB STATISTICAL SOFTWARE. **MINITAB 14.0**. 2004.

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

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 411-424, 2004.

MURCIA, M.A.; EGEA, I.; ROMOJARO, F.; PARRAS, P.; JIMÉNEZ, A.M.; MARTÍNEZ-TOMÉ, M. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives. Influence of irradiation procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 7, p. 1872-1881, 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 1054, n. 2, p. 95-111, 2004.

NAHAR, L.; SARKER, S.D. Chenoalbuside: an antioxidant phenolic glycoside from the seeds of *Chenopodium album* L. (*Chenopodiaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 4, p. 279-282, 2005.

NAKATANI, N. Antioxidant from spices and herbs. In: SHAIDI, F. (Ed.). **Natural antioxidants**: chemistry, health effects, and applications. Newfoundland: AOCS Press, 1996. chap. 4, p. 64-75.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. **Food chemistry**. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, 1985. chap. 3, p. 139-244.

NETZEL, M.; NETZEL, G.; TIAN, Q.; SCHWARTZ, S.; KONCZAK, I. Native Australian fruits: a novel source of antioxidants for food. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, New York, v. 8, n. 3, p. 339-346, 2007.

NINFALI, P.; MEA, G.; GIORGINI, S.; ROCCHI, M.; BACCHIOCCA, M. Antioxidant capacity of vegetables, spices and dressings relevant to nutrition. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 93, n. 2, p. 257-266, 2005.

NUUTILA, A.M.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AARNI, M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. **Food Chemistry**, Barking, v. 81, n. 4, p. 485-493, 2003.

OOMAH, B.D.; KENASCHUK, E.O.; MAZZA, G. Phenolic acids in flaxseed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 8, p. 2016-2019, 1995.

ORDÓÑEZ, J.A. **Tecnologia de alimentos**: componentes dos alimentos e processos. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 294p.

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

PICCINELLI, A.L.; DE SIMONE, F.; PASSI, S.; RASTRELLI, L. Phenolic constituents and antioxidant activity of *Wendita calysina* leaves (Burrito), a folk Paraguayan tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 19, p. 5863-5868, 2004.

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

PIECADE, K.R.; RACANICCI, A.C.M.; PINO, A.P.M.; PINO, L.M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Atividade antioxidante de orégano (*Origanum vulgare*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre a estabilidade oxidativa de sardinha. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL TENDÊNCIAS E INOVAÇÕES EM ÓLEOS E GORDURAS, 2., 2005, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBOG, 2005. p. 7-9.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. 13. ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 468p.

PINO, L.M. **Estabilidade oxidativa da carne de frango alimentados com diferentes fontes lipídicas e armazenada sob congelamento**. 2005. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiróz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

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

POKORNY, J. Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidants? **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 109, n. 6, p. 629-642, 2007.

POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food practical applications**. Boca Raton: CRC Press, 2001. 380p.

PONTES, M.M.M. **Polpa de manga processada por alta pressão hidrostática: aspectos microbiológicos, nutricionais, sensoriais e a percepção do consumidor**. 2008. 136 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 106 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

PROESTOS, C.; CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, G.J.E.; KOMAITIS, M. RP-HPLC Analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 4, p. 1190-1195, 2005.

RACANICCI, A.M.C.; DANIELSEN, B.; MENTEN, J.F.M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SKIBSTED, L.K. 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.

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**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Deterioração de lipídeos - ranço. In: OETTERER, M.; _____; SPOTO, M.H.F. (Org.). **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. cap. 6, p. 243-299.

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

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

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

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

RICHTER, V.B. **Desenvolvimento de uma técnica sensorial descritiva por ordenação**. 2006, 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RIVERO-PEREZ, M.D.; GONZALEZ-SANJOSE, M.L.; ORTEGA-HERAS, M.; MUNIZ, P. Antioxidant potential of single-variety red wines aged in the barrel and in the bottle. **Food Chemistry**, Barking, v. 111, n. 4, p. 957-964, 2008.

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

SALDANHA, L.A. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*)**. 2005, 120 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SANCHEZ-MORENO, J.A.; LARRAURI, F.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 76, n. 2, p. 270-276, 1998.

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

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

SHAHIDI, F.; ALASALVAR, C.; LIYANA-PATHIRANA, C.M. Antioxidant phytochemicals in hazelnut kernel (*Corylus avellana* L.) and hazelnut byproducts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 4, p. 1212-1220, 2007.

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

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics**: sources, chemistry, effects and applications. 2nd ed. Lancaster: CRC Press, 2003. 405p.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U.N. Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. In: AKOH, C.; MIN, D.B. **Food lipids**: chemistry, nutrition, and bio-technology. New York: Marcel Dekker, 1998. chap. 14, p. 387-396.

SHAN, B.; CAI, Y.Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 20, p. 749-759, 2005.

SILVA, B.M.; ANDRADE, P.B.; VALENTÃO, P.; FERRERES, F.; SEABRA, R.M.; FERREIRA, M.A. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 15, p. 4705-4712, 2004.

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

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

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

SOARES, A.L. **Ação do ácido fítico e vitamina E na oxidação lipídica e aroma de requeijado em filés de peito de frango**. 1998. 115 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 1998.

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

STONE, H.; MCDERMOTT B.J.; SIDEL, J.L. The importance of sensory analysis for the evaluation of quality. **Food Technology**, Champaign, v. 2, n. 5, p. 88-95, 1991.

STONE, H.; SIDEL, J. **Sensory evaluation practices**. 3rd ed. New York: Academic Press, 2004. 377p.

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

SUN, T.; XU, Z.; WU, C.; JANES, M.; PRINYAWIWATKUL, W. Antioxidant activities of different colored sweet bell pepper (*Capsicum annum* L.). **Journal of Food Science**, Chicago, v. 72, n. 2, p. 98-102, 2007.

SURVESWARAN, S.; CAI, Y.Z.; CORKE, H.; SUN, M. Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants. **Food Chemistry**, Barking, v. 102, n. 3, p. 938-953, 2007.

TACHAKITTIRUNGROD, S.; OKONOJI, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S. Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chemistry**, Barking, v. 103, n. 2, p. 381-388, 2007.

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

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

VERZELLONI, E.; TAGLIAZUCCHI, D.; CONTE, A. Relationship between the antioxidant properties and the phenolic and flavonoid content in traditional balsam vinegar. **Food Chemistry**, Barking, v. 105, n. 2, p. 564-571, 2007.

VIEIRA, T.M.F.S. **Estabilidade oxidativa de óleos vegetais refinados**: efeito do aquecimento por microondas. 1998. 70 p. Dissertação (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**, London, v. 34, n. 2, p. 215-221, 2001.

WANASUNDARA, U.N.; SHAHIDI, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry**, Barking, v. 63, n. 3, p. 335-342, 1998.

WEISBURGER, J.H. Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 37, n. 9, p. 943-948, 1999.

WETTASINGHE, M.; BOLLING, B.; PLHAK, L.; PARKIN, K. Screening for phase II enzyme inducing and antioxidant activities of common vegetables. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, n. 7, p. 2583-2588, 2002.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, 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.

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

WU, X.; BEECHER, R.G.; HOLDEN, J.M.; HAYTOWITZ, D.B.; GEBHARDT, S.E.; PRIOR, R.L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 12, p. 4026-4037, 2004.

YANISHLIEVA, N.V.; MARINOVA, E.; POKORNY, J. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 108, n. 9, p. 776-793, 2006.

YOO, K.M.; LEE, C.H.; LEE, H.; MOON, B.; LEE, C.Y. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. **Food Chemistry**, Barking, v. 106, n. 3, p. 929-936, 2008.

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

ZHANG, Y.; LI, X.; WANG, Z. Antioxidant activities of leaf extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and related phenolic constituents. **Food and Chemical Toxicology**, London, v. 48, n. 10, p. 2656-2662, 2010.

ZHAO, Q.; BOWLES, E.J.; ZHANG, H.Y. Antioxidant activities of eleven Australian essential oils. **Natural Product Communications**, Cambridge, v. 3, n. 2, p. 837-842, 2008.

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

APÊNDICES

APÊNDICE 1

Figura 24 - Curva de calibração do ácido gálico

APÊNDICE 2

Figura 25 - Curva de calibração do Trolox