Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Zácarí, Cristiane Zago

Estabilidade oxidativa de óleo extra-virgem de castanha do Pará com ervas aromáticas
antioxidantes / Cristiane Zago Zácarí. - - Piracicaba, 2008.
111 p.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2008.
Bibliografia.

1. Antioxidantes 2. Castanha 3. Condimento e especiais 4. Óleos e gorduras vegetais
comésteíveis 5. Oxidação I. Título

CDD 665.3
Z13e

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

Dedico este trabalho a minha mãe Elizabete
e ao meu pai Vicente, incríveis
incentivadores e provas vivas de amor
incondicional. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Ao apoio irrestrito de toda minha família.

Aos meus pais e ao meu irmão Cristiano e minha cunhada Aline, que sempre acreditaram em absoluto na realização desse projeto.

Por motivos que não caberiam aqui descreve-los, agradeço imensamente à Érika Gutierrez e ao Júlio de Mello Neto que foram pessoas inspiradoras e que sempre estiveram ao meu lado, ajudando, dando dicas, incentivos, coragem, garra e que participaram intensivamente não só da minha formação profissional como pessoal.

À minha grande amiga Cyh, sempre presente e sempre se dedicando a nossa eterna amizade.

À pessoa que sempre tornava o nosso trabalho no laboratório uma diversão, agradeço de todo meu coração Maria Fernanda de Almeida Prado.

À professora Dra Marisa Aparecida Bismara Regitano D'Arce pela confiança depositada, pelos ensinamentos transferidos, pelos conselhos, pela formação de vida, não somente profissional. A minha admiração será eterna.

À professora Thaís Vieira que não só acreditou, mas participou veemente na realização desse projeto.

Aos meus companheiros de laboratório Ana Paula, Karen, Lilian, Ana Carolina, Carla, Débora, Camila, Aline, Filipe, Celso, Gustavo e Érico. Por todo apoio e pelos incríveis momentos, sempre os terei com carinho.

Aos meus amigos do mestrado, em especial Da Terra, André, Ricardo, Ligiane, Ana Claudia, Isis e Ingrid.

Aos meus amigos distantes, mas que sempre estiveram presentes, em especial, André, Patrícia e Diego, obrigada eternamente.

A todos os funcionários do departamento, sempre com carinho para atender.

Às empresas Ouro Verde e CIA das Ervas que disponibilizaram todas as matérias primas para a realização desse trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização desse projeto.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE FIGURAS	12
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Castanha do Pará	17
1.2 Oxidação lipídica	18
1.2.1 Auto-oxidação	22
1.2.2 Fotooxidação	24
1.3 Antioxidantes	25
1.4 Potencial antioxidante de especiarias de uso culinário	30
1.5 Métodos de caracterização da qualidade de óleos	33
1.5.1 Acidez	34
1.5.2 Índice de peróxido	35
1.5.3 Absorbância na região da ultravioleta	36
1.5.4 Teste acelerado – Método de estufa ou “Schaal Oven Test”	36
Referências	37
2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE 5 ERVAS AROMATICAS DE USO CULINÁRIO ADICIONADAS EM ÓLEO EXTRA VIRGEM DE CASTANHA DO PARÁ	45
Resumo	45
Abstract	45
2.1 Introdução	46
2.2 Material e método	48
2.2.1 Materiais	48
2.2.1.1 Ervas	48
2.2.1.2 Óleo de castanha do Pará	48
2.3 Métodos	48
2.3.1 Teste de estufa para seleção das ervas (Oven test)	48

2.3.2 Obtenção dos extratos e teor de compostos fenólicos	49
2.3.3 Umidade	49
2.3.4 Índice de Peróxido	50
2.3.5 Absorbância específica no UV – 232 nm	50
2.4 Resultados	51
2.4.1 Compostos fenólicos e umidade	51
2.4.2 Shaal Oven Test	53
2.4 Conclusão	65
Referências	66
3 DESEMPENHO DE MISTURAS BINÁRIAS DE ERVAS AROMÁTICAS NA	
ESTABILIDADE OXIDATIVA ADICIONADA A ÓLEO DE CASTANHA DO PARÁ	69
Resumo	69
Abstract.....	69
Key Words: Phenolic, Peroxide value, Schaal Oven Test	70
3.1 Introdução	70
3.2 Material e Método	72
3.2.1 Materiais	72
3.2.1.1 Ervas	72
3.2.1.2 Óleo de castanha do Pará	73
3.3 Métodos	73
3.3.1 Teste de estufa (Schaal Oven Test)	73
3.3.2 Obtenção dos extratos e teor de compostos fenólicos	74
3.3.3 Umidade	74
3.3.4 Índice de Peróxido	74
3.3.5 Medida espectrofotométrica da absorbância entre 200 e 300 nm	75
3.4 Resultados	75
3.4.1 Compostos fenólicos e umidade	75
3.4.2 Schaal Oven Test	76
3.5 Conclusão	83
Referências	83

4 ESTUDO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA EM TEMPERATURA AMBIENTE DO ÓLEO EXTRA-VIRGEM DE CASTANHA DO PARÁ COM ERVAS AROMÁTICAS

ANTIOXIDANTE	86
Resumo	86
Abstract.....	86
4.1 Introdução	87
4.2 Material e método	89
4.2.1 Materiais	89
4.2.1.1 Ervas	89
4.2.1.2 Óleo de castanha do Pará	90
4.2.2 Métodos	90
4.2.2.1 Armazenamento em condições normais de temperatura e luminosidade	90
4.2.2.2 Schaal Oven Test	90
4.2.2.3 Teor de Compostos Fenólicos	91
4.2.2.4 Umidade	91
4.2.2.5 Índice de Peróxido	91
4.2.2.6 Acidez	92
4.2.2.7 Medida espectrofotométrica da absorbância entre 200 e 300 nm	92
4.2.2.8 Índice de Iodo	93
4.2.2.9 Composição em ácidos graxos	93
4.2.2.10 Estabilidade oxidativa.....	93
4.3 Resultados.....	94
4.3.1 Compostos fenólicos e umidade	94
4.3.2 Schaal Oven Test	94
4.3.3 Ensaio em temperatura ambiente	96
4.4 Conclusão	107
Referências	107
Considerações gerais	111

RESUMO

Estabilidade oxidativa de óleo extra -virgem de castanha do Pará com ervas aromáticas antioxidantes

Com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos gordurosos são empregados compostos químicos conhecidos como antioxidantes. Recentemente, o interesse na adição de aditivos em alimentos derivados de plantas tem aumentado, deste modo, o uso de ervas e seus extratos têm mostrado possuir propriedades tanto para a preservação da saúde como dos alimentos. O emprego de ervas aromáticas como antioxidantes naturais tem se destacado na indústria de alimentos, quer na forma de extratos, quer *in natura*. Cinco ervas, desidratadas em escala laboratorial e industrial, de reconhecido poder antioxidante, orégano, *Origanum vulgare*; manjerição, *Ocimum basilicum*; coentro, *Coriandrum sativum* L.; salsa, *Petroselinum sativum* e tomilho, *Tymus vulgaris*, foram avaliadas quanto ao teor de compostos fenólicos, umidade e quanto à atividade antioxidante através de teste acelerado de oxidação, Schaal Oven Test, e armazenamento em temperatura ambiente, em óleo de castanha do Pará a partir das análises de índice de peróxido, absortividade específica em 232 nm, índice de acidez, índice de iodo, estabilidade oxidativa e perfil de ácidos graxos. O teor de fenólicos e umidade encontrado variou entre as ervas. Orégano, coentro, salsa e manjerição secos industrialmente, apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos. O tomilho não apresentou diferença entre as amostras. O tomilho e o orégano foram as ervas que apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos independentemente do processo de secagem. Nos testes de estufa as ervas tomilho e orégano foram as que demonstraram maior atividade. Em relação aos testes de estufas todas as combinações apresentaram resultados satisfatórios, mas esses resultados não se repetiram quando o experimento foi realizado em temperatura ambiente. Apesar de a atividade antioxidante das ervas poder ser relacionada à presença dos compostos fenólicos, poucos estudos têm considerado os efeitos da sua interação.

Palavras-chave: Oxidação, Óleo de castanha do Pará, Antioxidantes

ABSTRACT

Oxidative stability of crude Brazil nut oil with antioxidant aromatic herbs

With the purpose to inhibit or to delay the lipid oxidation, oil, fats and fatty foods chemical composites are used known as antioxidant. Recently, the interest in the additive addition in foods derived from plants has increased, in this way the use of herbs and extracts has shown some preservation properties of health and foods. The role of natural aromatic herbs as antioxidant has been detached in the food industry using the extract and *in natura* forms. Five herbs, dehydrated in laboratorial and industrial scale, of recognized antioxidant capability, oregano, *Origanum vulgare*; basil, *Ocimum basilicum*; sage, *Coriandrum sativum* L.; parsley, *Petroselinum sativum* and thyme, *Tymus vulgaris*, had been evaluated on phenolic contents levels, humidity and antioxidant activity through a sped up test of oxidation, Schaal Oven Test, and storage at ambient temperature added to Brazil nut oil by means of peroxide value, specific extinction in 232 nm, acid value, iodine index, oxidative stability and fatty acid composition. Phenolic levels and moisture found between herbs varied. Oregano, sage, parsley and basil industrially dried, had shown the highest phenolic composite levels. Thyme had not shown any difference between the samples. Thyme and oregano had been the herbs that have shown the highest phenolic composite concentrations independently of the drying process. In the oven stability tests thyme and oregano had been the ones that had demonstrated the highest activity. In relation to the tests of greenhouses all the combinations had presented satisfactory results, but these results had not occurred again when in ambient temperature. Although antioxidant activity of herbs is related to the presence of phenolic composites few studies has considered the effect of its interaction.

Keywords: Oxidation, Brazil nut oil, Antioxidant

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de compostos fenólicos expressos em equivalentes de ácido gálico em mg/g de erva.....	52
Tabela 2 - Porcentagem de umidade das ervas utilizadas durante os ensaios	53
Tabela 3 - Valores de índice de peróxido (meq O ₂ /1Kg) e absorbância específica em 232 nm ($E^{1\%}_{1cm}$) do óleo de castanha do Pará após 120 horas em estufa de circulação de ar a 60°C + 2°C utilizando ervas secas em escala laboratorial	58
Tabela 4 – Os melhores resultados de índice de peróxido encontrados nos quatro ensaios realizados	65
Tabela 5 - Delineamento experimental do planejamento fatorial completo do tipo 2 ² (valores codificados e valores reais) aplicado ao teste de estufa para seleção de antioxidante.....	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hidrólise total de triacilglicerol	20
Figura 2 – Rota de auto-oxidação.....	21
Figura 3 – Estrutura química dos ácidos benzóicos	28
Figura 4 – Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos	29
Figura 5 – Estrutura química das cumarinas	29
Figura 6 – Valores de índice de peróxido	55
Figura 7 - Valores de absorvância específica em 232 nm ($E^{1\%}_{1cm}$) do óleo de castanha do Pará após 120 horas em estufa de circulação de ar a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ utilizando ervas secas em escala laboratorial.	56
Figura 8 - Valores de índice de peróxido (meq $\text{O}_2/1000\text{g}$) do óleo de castanha do Pará após 120 horas em estufa de circulação de ar a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ utilizando ervas secas em escala industrial	59
Fugura 9 - Valores de absorvância específica em 232 nm ($E^{1\%}_{1cm}$) do óleo de castanha do Pará após 120 horas em estufa de circulação de ar a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ utilizando ervas secas em escala industrial	61
Figura 10 - Índice de peróxido após 120 horas em estufa com circulação com temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ utilizando ervas secas industrialmente.....	62
Figura 11 - Índice de peróxido após 72 horas em estufa com circulação com temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ utilizando ervas secas em escala industrial.....	64

Figura 12 - Índices de peróxido (meq O ₂ /kg) obtidos no teste em estufa após 72 horas com temperatura de 60°C ± 2°C com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha (planejamento experimental fatorial completo - 2 ²).....	77
Figura 13 - Medida espectrofotométrica da absorbância entre 200 e 300 nm obtida no teste em estufa após 72 horas com temperatura de 60°C ± 2°C com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha (planejamento experimental fatorial completo - 2 ²).....	78
Figura 14 - Índices de peróxido (meq O ₂ /kg) obtidos no teste em estufa após 72 horas com temperatura de 60°C ± 2°C com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha (planejamento experimental fatorial completo - 2 ²).....	79
Figura 15 - Medida espectrofotométrica da absorbância entre 200 e 300 nm obtida no teste em estufa após 72 horas com temperatura de 60°C ± 2°C com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha (planejamento experimental fatorial completo - 2 ²).....	80
Figura 16 - Índices de peróxido (meq O ₂ /kg) obtidos no teste em estufa após 120 horas com temperatura de 60°C ± 2°C com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha (planejamento experimental fatorial completo - 2 ²).....	81
Figura 17 - Medida espectrofotométrica da absorbância entre 200 e 300 nm obtida no teste em estufa após 120 horas com temperatura de 60°C ± 2°C com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha (planejamento experimental fatorial completo - 2 ²).....	82
Figura 18 - Índices de peróxido (meq O ₂ /kg) obtidos no teste em estufa após 120 horas com temperatura de 60°C ± 2°C com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha	95

Figura 19 - Medida espectrofotométrica da absorbância entre 200 e 300 nm obtida no teste em estufa após 120 horas com temperatura de 60°C $\pm$ 2°C com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha do Pará.....	96
Figura 20 - Índice de acidez (mg KOH/g) dos óleos de castanha do Pará armazenados à temperatura ambiente durante 6 meses com adição das ervas tomilho, orégano e mistura	97
Figura 21 - Índices de peróxido (meq O ₂ /Kg) de óleos de castanha do Pará armazenados à temperatura ambiente durante 6 meses com adição das ervas tomilho, orégano e mistura.....	99
Figura 22 - Absortividade específica em 232 nm em óleo de castanha do Pará armazenado à temperatura ambiente durante 6 meses com adição das ervas tomilho, orégano e mistura	101
Figura 23 - Índice de iodo de óleo de castanha do Pará armazenado à temperatura ambiente durante 6 meses com adição das ervas tomilho, orégano e mistura	103
Figura 24 - Composição em ácidos graxos (%) dos tratamentos estudados analisados no início, terceiro e sexto mês do armazenamento.....	104
Figura 25 - Período de indução (h) em Rancimat do óleo de castanha do Pará armazenado à temperatura ambiente durante 6 meses adicionado das ervas tomilho, orégano e um mistura	105

1 INTRODUÇÃO

Os processos de oxidação de substâncias orgânicas são uma das principais causas da redução da vida de útil dos produtos alimentícios industrializados bem como das matérias-primas em geral. Portanto, o conhecimento e compreensão dos mecanismos de reação e as formas de controle para os mesmos são de suma importância econômica para a indústria alimentícia. Dentre as principais reações de oxidação em produtos alimentícios se destacam:

- escurecimento enzimático e
- oxidação de lipídios.

No caso das reações de oxidação de lipídios, os principais problemas decorrentes são as alterações sensoriais envolvendo o desenvolvimento de notas aromáticas desagradáveis, denominadas de uma forma generalizada de ranço. Estas reações ocorrem com substratos específicos que são os ácidos graxos. Esta alteração na qualidade de um produto é o principal parâmetro de controle físico-químico (ponto crítico de controle) que define o prazo de validade de diversos produtos alimentícios processados, principalmente quando os mesmos apresentam valores de atividade de água inferiores a 0,3. Nesta faixa de valores de atividade de água, atinge-se a zona de adsorção primária ou a monocamada, que propicia a ação catalítica de metais, favorecendo o desenvolvimento das reações de oxidação dos lipídios (BOBBIO; BOBBIO, 1992; FENNEMA, 1993)

Os alimentos contendo significantes teores de ácidos graxos pol insaturados têm contribuído para necessidade de se empregar agentes antioxidantes para prevenir a oxidação. Os antioxidantes mais largamente empregados são o butil -hidroxi-tolueno (BHT), butil-hidroxi-anisol (BHA) e butilhidroquinonas terciárias e em alguns casos a ação sinérgica do ácido cítrico é indispensável. Estes agentes antioxidantes tendem a estabilizar os ácidos graxos em alimentos através da reação com radicais livres, quelando íons metálicos e interrompendo a fase de propagação da oxidação lipídica. Os antioxidantes naturais ou artificiais apresentam funções similares, sendo que vem sendo questionada a salubridade de alguns antioxidantes comerciais, visto que alguns

estudos têm demonstrado que os mesmos podem favorecer efeitos mutagênicos e carcinogênicos (BIRCH et al., 2001).

Antioxidantes são compostos que podem retardar ou inibir a oxidação de lipídios ou outras moléculas, evitando o início ou propagação das reações em cadeia de oxidação. A atividade antioxidante de compostos fenólicos é principalmente devida às suas propriedades de óxido-redução, as quais podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singlete ou decompondo peróxidos (ANTUNES; CANHOS, 1984; BRENNAN; PAGLIARINI, 2001; ZHENG; WANG, 2001; ZHANG, et al., 2006; FENNEMA, 1993; SIMÃO, 1985).

Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo. Foi descoberto que uma série de doenças entre as quais câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, AIDS, doenças do coração, podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigênio extremamente reativas denominadas de “substâncias reativas oxigenadas” ou simplesmente ROS. Estas substâncias também estão ligadas com processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo. (BRENNAN; PAGLIARINI, 2001; YILDRIM; MAVI; KARA, 2002).

Os mecanismos endógenos de defesa (ou mediadores de redox tais como: superóxido dismutase, catalase, peroxidase e metaloproteínas) podem ser auxiliadas favoravelmente com a introdução de antioxidantes por meio da dieta. (BRENNAN; PAGLIARINI, 2001; YILDRIM; MAVI; KARA, 2002).

Da mesma forma, o emprego de agentes antioxidantes visando o aumento do prazo de validade de produtos alimentícios é uma constante na área da tecnologia de alimentos. A Resolução nº 04 de 24/11/88 relaciona um total de 13 aditivos permitidos classificados como antioxidantes, possíveis de serem adicionados em aproximadamente 40 a 50 alimentos (BRASIL, 1988).

A partir do início dos anos 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais tem

sido restringidos devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como pela comprovação de diversos outros males como: aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático. (MELO; GUERRA, 2002; SIMÃO, 1985; YILDRIM; MAVI; KARA, 2002; ZHENG; WANG, 2001; BAUER et al., 2001).

As matérias-primas *in natura* disponíveis como: frutas, vegetais em geral e condimentos contêm numerosos fitoquímicos além dos compostos fenólicos como, por exemplo, compostos nitrogenados, carotenóides, ácido ascórbico e tocoferóis. Muitos destes fitoquímicos apresentam significativa capacidade antioxidante e são associados à baixa incidência e baixa mortalidade de câncer em seres humanos (BIRCH et al., 2001; SLUIS et al., 2001; TOMÁS-BARBERÁN, 2001; VINSON et al., 2001; ZHENG; WANG, 2001; WATANABE, 1998; YILDRIM; MAVI; KARA, 2002)

Compostos com ação antioxidante são empregados com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos lipídicos. Neste caso, os compostos mais utilizados são: butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), tércio-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG). Contudo estudos toxicológicos mais recentes têm demonstrado a possibilidade desses antioxidantes apresentarem alguma toxidez (BAUER et al., 2001), abrindo caminho para o interesse nos antioxidantes naturalmente presentes nas ervas aromáticas.

1.1 Castanha do Pará

A castanha do Pará, ou castanha do Brasil, semente da castanheira -do-pará, *Bertholletia excelsa*, H.B. e K., da família das Lecitidáceas, cresce em toda a Amazônia. Apresenta porte majestoso e frondoso, com copa dominante na região, chegando a medir de 30 – 50 metros de altura e 5 metros de diâmetro na base do tronco. A castanha tem reconhecido valor nutricional, decorrente de sua composição em lipídeos e proteínas. A amêndoa de castanha do Pará apresenta em média a seguinte composição química centesimal: umidade 4,4 g, proteína bruta 17,0 g, lipídeos 67,0 g, carboidratos 3,6 g. É uma amêndoa oleaginosa de elevado valor energético, rica em proteínas de alto valor biológico, apresentando outros constituintes como o selênio, um antioxidante natural muito citado na prevenção de doenças cardiovasculares e câncer (NERY, 1969).

A extração do óleo ocorre por prensagem, podendo ser produzido e comercializado como tal. O óleo da castanha tem certa semelhança com o óleo de milho, contendo alto teor de ácidos graxos insaturados, com predominância dos ácidos oléico e linoléico, um ácido graxo essencial. Seu maior consumo se restringe às regiões produtoras no norte do país, chegando ao mercado dos estados do Sul como óleo gourmet ou especial em quantidades reduzidas (SOUZA; MENEZES, 2004).

À temperatura ambiente o óleo bruto é líquido e de cor amarelo-claro, com sabor e aroma agradáveis e característicos da castanha do Pará. O óleo apresenta densidade de 0,917 – 0,918 a 15°C, índice de refração de 1,458 – 1,464 a 25°C, índice de iodo de 97 – 109 mg iodo/100 mg de óleo, ponto de fusão de 0 a -2°C e índice de saponificação de 192 – 202 mg KOH/g de óleo (PECHNIK; BORGES; SIQUEIRA, 1950).

Em relação à estabilidade oxidativa o óleo bruto de castanha apresenta-se com estabilidade intermediária entre o de maracujá e o de seringueira atribuída ao seu alto teor em ácidos graxos insaturados (41,2% de oléico e 36,1% de linoléico) . O melhor antioxidante sintético indicado para a conservação da estabilidade lipídica desse óleo foi o TBHQ (ASSUNÇÃO; BENES; SERRYA, 1984; REGITANO -D'ARCE, 1998).

1.2 Oxidação lipídica

Os óleos e gorduras presentes nos alimentos são constituídos predominantemente de triacilgliceróis, sendo passíveis de diversas alterações químicas durante o processamento, armazenamento e consumo do alimento, gerando substâncias desejáveis ou não ao *flavor*. O controle dessas reações de deterioração requer o conhecimento da química dos lipídios (BELITZ; GROSCH, 1999) .

Quimicamente, os triacilgliceróis são ésteres de glicerol contendo três ácidos graxos. Cada ácido graxo pode conter diferentes números de átomos de carbono e diferentes graus de insaturação. A maioria dos ácidos graxos de ocorrência natural possui números pares de carbonos e de cadeia linear (BELITZ; GROSCH, 1999; ZDZISLAW; KOLAKOWSKA, 2002) .

Os lipídeos ocorrem em quase todos os tipos de alimentos, e a maioria deles é encontrada na forma de triacilgliceróis, porém os alimentos também possuem outros

tipos de lipídeos, como fosfolipídios, glicolipídios, esfingolipídios e lipoproteínas. Os lipídios desempenham um importante papel na qualidade de certos produtos alimentares, particularmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis (*flavor*, cor e textura). Por outro lado, conferem valor nutricional aos alimentos, constituindo uma fonte de energia metabólica, de ácidos graxos essenciais (e.g. ácidos linoléico e linolênico) e de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1998).

A degradação de lipídios pode ser ocasionada por oxidação, hidrólise, polimerização, pirólise e absorção de sabores e odores estranhos. Dentre esses fatores, a oxidação é a principal causa da deterioração de vários produtos biologicamente importantes, alterando diversas propriedades como qualidade organoléptica, valor nutricional, funcionalidade e toxidez. Tais processos podem ter origem durante a produção, o processamento, a preservação, o armazenamento e o preparo do alimento. Embora a oxidação em geral se inicie na fração lipídica, eventualmente outros componentes como as proteínas, vitaminas e pigmentos são afetados. A oxidação lipídica é um fenômeno espontâneo e inevitável, com uma implicação direta no valor comercial, quer das matérias graxas, quer de todos os produtos a partir de que são formulados (alimentos, cosméticos e medicamentos) (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1998; GRAY, 1978; ZDZISLAW; KALOKOWSKA, 2002; TOMAINO et al., 2005).

Numerosas variáveis internas e externas como a composição em ácidos graxos, conteúdo de anti e pró-oxidantes, exposição à irradiação, altas temperaturas, o oxigênio e atividade de água, metais, lipoxigenase e metaloproteínas podem afetar a oxidação (ALLEN; HAMILTON, 1994).

Há duas formas de deterioração lipídica: hidrolítica e oxidativa. A hidrolítica pode ocorrer a partir de um processo bioquímico ou químico (hidrólise enzimática e hidrólise não enzimática). A hidrólise enzimática ocorre pelas reações catalisadas pela lipase (enzima presente em grãos oleaginosos e alimentos) que age sobre os triacilgliceróis produzindo ácidos graxos livres e glicerol. Já a hidrólise não enzimática ocorre em altas temperaturas, em presença de água produzindo também ácidos graxos livres (Figura 1).

Figura 1 - Hidrólise total de um triacilglicerol

A hidrólise (enzimática e não enzimática) dos triacilgliceróis pode originar diacilgliceróis, monoacilgliceróis e ácidos graxos livres. A presença nestas moléculas das mesmas cadeias insaturadas dos triacilgliceróis torna-as predispostas à oxidação. No estado natural, estes compostos insaturados apresentam duplas ligações com configuração *cis*, separadas entre si por grupos metilênicos (SHERWIN, 1978; BERGER; HAMILTON, 1995).

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

Na oxidação lipídica ocorre uma série extremamente complexa de reações químicas, envolvendo ácidos graxos insaturados e oxigênio. Por conveniência essas reações são divididas em três diferentes estádios: inicial, de propagação e terminal. A reação inicial ocorre quando o átomo de hidrogênio é removido do grupo metilênico ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-$) do ácido graxo insaturado, formando radical livre ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}^\bullet-$). Este processo ocorre a partir de uma variedade de diferentes iniciadores presentes no alimento, incluindo peróxidos, íons metálicos de transição, luz UV e enzimas. Uma vez formado o radical livre, este reage com o oxigênio para formar o radical peroxil ($\text{CH}=\text{CH}-\text{CHOO}^\bullet-$) (LADIKOS; LOUGOVOIS, 1990).

Esses radicais são altamente reativos e capazes de remover os átomos de hidrogênio de outros ácidos graxos insaturados, propagando, a reação de oxidação. A reação terminal ocorre com a interação de dois radicais livres formando um não radical

e, assim, interrompendo a sua participação na reação (GRAY, 1978; LADIKOS; LOUGOVOIS, 1990).

Iniciação:

Propagação:

Decomposição do hidroperóxido:

Término:

Sendo:

RH: triacilglicerol ou ácido graxo livre

RO₂•: radical peróxido

R•: radical livre

ROOH•: hidroperóxido

Figura 2 - Rota da auto-oxidação (BELITZ; GROSCH, 1999)

Durante a oxidação de lipídios, 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 com o odor característico associado à oxidação de lipídios (ALLEN; HAMILTON, 1994).

A oxidação de lipídios está associada à reação do oxigênio com lipídios insaturados por mecanismos químicos, a saber: auto-oxidação e fotoxidação.

1.2.1 Auto-oxidação

Os peróxidos são os primeiros a serem formados na oxidação de óleos e gorduras. Do ponto de vista da deterioração do sabor, os peróxidos não são os mais importantes e sim os produtos oriundos de sua decomposição: aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos e ácidos. O grupo éster formado entre a carboxila do ácido graxo e o agrupamento álcool do glicerol ou de álcoois representam parte da reatividade das moléculas lipídicas, porém é na dupla ligação da cadeia dos ácidos graxos das frações lipídicas que se localiza o ponto de maior instabilidade dos lipídios (REGITANO-d'ARCE, 2006).

A formação de peróxidos passa necessariamente pela produção dos radicais livres. Estes são formados a partir do ácido graxo insaturado, pela interação com o oxigênio na presença de catalisadores, sendo a reação inicial provocada pela ação de alguma fonte externa de energia, como calor, luz, radiação ou por meio de reações químicas envolvendo íons metálicos (ZDZISLAW; KOLAKOWSKA, 2002; ALLEN; HAMILTON, 1994).

O mecanismo de formação do primeiro radical livre ainda não é devidamente esclarecido, mas pode ocorrer por irradiação, tratamento térmico e pela reação com íons metálicos. Em alimentos sempre ocorrem traços de peróxidos (formados pela ação do oxigênio singlete), os quais se dissociam, com formação de radicais livres (FENNEMA, 1985).

O oxigênio molecular, ou triplete ($^3\text{O}_2$), possui dois elétrons com o mesmo spin, porém em orbitais diferentes ($2 (\frac{1}{2} + \frac{1}{2}) + 1 = 3$). Esses dois elétrons possuem *spin* paralelos e, para oxidar outro átomo ou molécula aceitando o novo par de elétrons, ambos têm de estar em *spins* antiparalelos, de forma a preencher o espaço livre no orbital. Essa situação impõe restrição na oxidação, a qual tende a aceitar elétrons pelo oxigênio, um de cada vez, permitindo tempo para que ocorra a inversão do spin entre as colisões. Isto faz com que o oxigênio seja pouco reativo com as espécies não-radicais. (FENNEMA, 1985; ALLEN; HAMILTON, 1994).

Toda a energia externa absorvida é transferida diretamente para o elétron, tornando-o altamente energético e instável. Em razão dessa instabilidade, o elétron rapidamente encontra outro átomo e transfere-lhe toda a sua energia inicial, tornando-

se extremamente instável devido à energia acumulada. Esse novo átomo formado é denominado radical livre, contendo um elétron extra, o qual, para se tornar estável, precisa liberar essa energia acumulada. Portanto, a transferência da energia ocorre para as substâncias localizadas mais próximas, principalmente para os ácidos graxos insaturados (FENNEMA, 1985; ALLEN; HAMILTON, 1994).

O oxigênio triplete reage com elementos e íons, formando óxidos, mas não com compostos orgânicos no estado singlete. Entretanto reage facilmente com radicais livres produzidos pela ação de outros radicais ativos, radiação, luz UV, aquecimento etc (ALLEN; HAMILTON, 1994).

Dessa forma, na auto-oxidação o átomo de oxigênio adjacente à dupla ligação é retirado do ácido graxo (pela exposição à luz ou íons metálicos); o radical livre combina-se com o oxigênio molecular e forma o radical peróxido (ROO^*), que retira um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo insaturado formando um hidroperóxido (ROOH) e outro radical livre (propagação). Este processo chega ao fim quando duas espécies de radicais livres se combinam e formam produtos não radicais (LADIKOS; LOUGOVOIS, 1990).

Quanto maior o número de duplas ligações nos ácidos graxos, mais susceptível é o óleo à degradação oxidativa. Uma vez que a velocidade de auto-oxidação é dependente do número de duplas ligações presentes na molécula, seria de se esperar que os óleos vegetais exibissem maior susceptibilidade à deterioração que as gorduras animais. Porém, alguns tendem a oxidar mais lentamente, porque contêm quantidades significativas de tocoferóis, os quais atuam como antioxidantes naturais (LINDLEY, 1998; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1998).

Em estudo da estabilidade oxidativa de óleos vegetais refinados, Vieira e Regitano-d'Arce (2001) confirmaram que quanto maior a insaturação, mais susceptível é o óleo à oxidação. Em seus resultados, o óleo de soja, por ser mais insaturado do que os óleos de canola e de milho, apresentou valores de índice de peróxido e absorvidade em 232nm mais altos. Apesar da adição de antioxidantes, o processo oxidativo foi mais marcante no óleo de soja (VIEIRA, 1998).

1.2.2 Fotoxidação

A reação de fotoxidação é um mecanismo alternativo para a formação de radicais livres. A presença de sensores, como clorofila, na presença de luz e oxigênio, dá início ao processo de transferência de energia para a reação de formação do peróxido. A reação fotooxidativa tem certas características que diferem da reação auto-oxidativa: não envolve a formação de radicais livres, é independente da pressão de oxigênio, é inibida pela ação de receptores de oxigênio singlete, não apresenta período de indução e provoca mudanças na insaturação da configuração *cis* para *trans*. A configuração eletrônica do oxigênio molecular é que faz o mecanismo de fotoxidação se diferenciar do auto-oxidação (BELITZ; GROSCH, 1999).

Moléculas de oxigênio altamente reativas e radicais de oxigênio podem ser formadas a partir do oxigênio no estado triplete, ou seja, por meio de reações fotoquímicas catalisadas por fotossensores. Neste estado, o oxigênio singlete contém os dois elétrons com *spins* opostos e, portanto, uma alta carga de energia eletrostática, resultando em um estado excitado (FENNEMA, 1985 ; ZDZISLAW; KOLAKOWSKA, 2002). Esse oxigênio não é um radical livre, mas uma espécie altamente eletrofílica, o qual reage prontamente com as substâncias de alta densidade de elétrons, como as insaturações presentes nos ácidos graxos.

A oxidação dos ácidos graxos insaturados com oxigênio comum triplete é menor, porém, sendo o oxigênio singlete 1450 vezes mais reativo, é mais fácil que ocorra a reação por ataque direto às duplas ligações que são rearranjadas nos hidroperóxidos. O oxigênio singlete pode se inserir em um dos carbonos da dupla ligação, que acarretará uma alteração na conformação da molécula para *trans*, e os hidroperóxidos formados serão diferentes dos formados na via de autooxidação, sendo possível associar a composição em hidroperóxidos à forma de oxidação ocorrida (FENNEMA, 1985; ZDZISLAW; KOLAKOWSKA, 2002).

Geralmente a formação de um peróxido de ácido graxo é acompanhada por uma mudança na posição da dupla ligação. Esta alteração faz com que ocorra a desestabilização por ressonância interna. A retirada seletiva de hidrogênio do ácido graxo insaturado está correlacionada com o número de duplas ligações na molécula. O radical de peroxila retira um átomo de hidrogênio mais facilmente de um grupo metileno

pertencente a um sistema 1,4-pentadieno do que de um simples grupamento alílico. O radical 1,4-dieno produzido é muito mais facilmente estabilizado por ressonância, isto é, pelo simples deslocamento de elétrons pelos cinco átomos de carbono que compõem o sistema. Deste modo, explica-se a diferença nas velocidades de reações de ácidos graxos insaturados (BELITZ; GROSCH, 1999).

A reação de oxidação é ainda responsável pela formação de polímeros (compostos de alto peso molecular) que alteram a qualidade dos óleos e das gorduras. Alterações na viscosidade e a eficiência do óleo como meio de transferência de calor, assim como a diminuição de sua estabilidade, são alguns dos efeitos da polimerização. As reações oxidativas levam à diminuição do valor nutricional, pois os ácidos graxos essenciais (linoléico e linolênico) são os primeiros a serem oxidados, produzindo diversos compostos como aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos que são potencialmente tóxicos (PASSOTTO; PENTEADO; MANCINI -FILHO, 1998; JASWIR; YAAKOB; KITTS, 2000).

1.3 Antioxidantes

A deterioração do alimento com o tempo, em razão de sua natureza biológica, é inevitável. Durante a produção, o processamento, a distribuição e o armazenamento ocorrem várias reações de deterioração envolvendo microrganismos e processos químicos. Estes últimos são representados pela oxidação enzimática e não -enzimática de lipídios e de substâncias fenólicas. A complexidade do processamento do alimento, associada à necessidade de aumentar o período de armazenamento, torna o produto vulnerável à deterioração oxidativa. Portanto, a utilização de substâncias químicas capazes de oferecer proteção contra a oxidação é necessária.

Pode-se definir antioxidantes como substâncias que, numa concentração consideravelmente menor que a do substrato oxidável, retardam o processo oxidativo, diminuindo a velocidade da reação ou prolongando o seu período de indução. O efeito do antioxidante consiste na inativação de radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos para produtos incapazes de formar em radicais livres e produtos de decomposição rançosos.

Deste modo podem ser divididos dentro de duas categorias: (1) antioxidantes primários que são capazes de inibir e estabilizar os radicais livres, pois interrompem a cadeia de radical das reações oxidativas, contribuindo com hidrogênio de grupos hidroxilas dos compostos fenólicos (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1998; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 1998; BELITZ; GROSCH, 1999); e (2) antioxidantes secundários (preventivos) que reduzem a velocidade de oxidação por mecanismos diversos, porém não convertem radicais livres em compostos estáveis; esses antioxidantes conseguem quelar metais pró-oxidantes e desativá-los, doar átomos de hidrogênio a antioxidantes primários, decompor hidroperóxidos em espécies não radicais, desativar o oxigênio singlete, absorver radiação ultravioleta ou agir como supressores de oxigênio (NAWAR, 1985; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 1998; ZDZISLAW; KOLAKOWSKA, 2002; GRAMZA; KORCZAK, 2005).

Os antioxidantes primários incluem os compostos fenólicos polihidroxilados (galatos) e os fenóis com impedimento estrutural. Atuam bloqueando a ação dos radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis por meio da doação de hidrogênio ou elétrons, além de atuarem nas reações com os radicais lipídicos, formando o complexo antioxidante-lipídico. Podem ser representados pela: inibição da fase inicial da reação pela interação com os radicais livres ou na etapa de propagação, reagindo com os radicais alcóxil ou peróxil, e, ou, pela formação do complexo antioxidante-peróxil (NAWAR, 1985; BAUER et al., 2001).

Antioxidantes sintéticos são normalmente utilizados nas indústrias de alimentos lipídicos. Entretanto, estes compostos podem apresentar alguns inconvenientes; estudos têm demonstrado que essas substâncias podem causar efeitos adversos em animais, como por exemplo, hemorragia nas cavidades pleurais e peritoneais ou extensa proliferação de células no pulmão, com mudanças bioquímicas, atuando como agente promotor no desenvolvimento de adenoma (WITSCHI; LOCK, 1978; WHYSNER et al., 1994; BAUER et al., 2001; THOMPSON et al., 2001).

Nos resultados obtidos dos ensaios realizados por Goulart (2003), Gutierrez (1995) e Gutierrez, Regitano-d'Arce e Rauen (1997) confirmou-se a hipótese de que concentrações de TBHQ inferiores à máxima permitida pela legislação (200mg/Kg) podem ser igualmente eficientes. Num dos estudos mencionados a conservação do

óleo em temperatura ambiente foi alcançada com uma dose de 115mg/Kg, (GOULART; REGITANO d'ARCE, 2004).

Dentro desse cenário, nos últimos anos tem sido dada ênfase à pesquisa de possíveis antioxidantes presentes em produtos naturais, com destaque para as especiarias, mundialmente utilizadas para fins culinários. A atividade antioxidante das especiarias e de seus extratos é atribuída aos compostos fenólicos que também podem atuar como seqüestrantes de radicais livres no organismo reduzindo os riscos de doenças crônicas (GUERRA; LAJOLO, 2005).

Os compostos fenólicos possuem no mínimo um anel aromático em sua estrutura, com uma ou mais hidroxilas como grupos funcionais. Estes grupos podem ser substituídos por ésteres, ésteres metílicos e glicosídeos. São amplamente distribuídos em plantas, como produtos do metabolismo secundário, e são sintetizados por duas rotas distintas: rota do chuíquimato, do qual se originam os fenilpropanóides e a rota do acetato que produz fenólicos simples (ESCARPA; GONZÁLES, 2001).

Os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, e são encontrados nas formas livres ou conjugados. Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (BRAVO, 1998).

Podem ainda ligar-se a grande variedade de substâncias naturais, principalmente monossacarídeo como a glicose, galactose, xilose e ramnose por meio de ligações glicosídicas, aumentando assim ainda mais a sua variedade química (PICCIN, 2004; TAI; ZEIGER, 2004; CROFT, 1998).

Uma classificação através da cadeia carbônica principal dos compostos fenólicos foi realizada e dessa forma existem 4 classes principais: ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos, cumarinas e flavonóides, das quais derivam outras substâncias (ESCARPA; GONZÁLES, 2001; MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990).

Os ácidos hidroxibenzóicos são os compostos fenólicos de estruturas mais simples e os mais representativos em termos de encontro e diversidade. A sua estrutura básica é composta por C6-C1 e seu representante mais comum é o ácido gálico. Já os ácidos hidroxicinâmicos apresentam uma estrutura básica de C6-C3 e seus maiores representantes são os ácidos p-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico (PICCIN, 2004).

As cumarinas se apresentam na forma glicosídica estando numerosamente distribuídas no reino vegetal e em sua grande maioria em forma livre (MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990; MADARI; JACOBS, 2004; PICCIN, 2004).

Os flavonóides possuem uma estrutura básica formada por $C_6-C_3-C_6$, sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal. Neste grupo encontram-se flavanol, antocianidina, flavanona, flavanonol, flavonas, isoflavonas e flavonol, todos esses derivados das chalconas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula (MACHEIX; FLEURIET; BILLOT, 1990).

Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C_6-C_1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza (figura 3). O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C_6-C_3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal (figura 4). As cumarinas são derivadas do ácido cinâmico por ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (figura 5). Os ácidos fenólicos além de se apresentarem sob sua forma natural, podem também se ligar entre si ou com outros compostos (HARBORNE; WILLIAMS, 2000).

R1 = OH – Ácido Salicílico; R1 = R4 = OH – Ácido Gentísico; R3 = OH – Ácido p-hidroxibenzoico; R2 = R3 = OH – Ácido Protocatequínico; R2 = OCH₃; R3 = OH – Ácido Vanílico; R2 = R3 = R4 = OH – Ácido Gálico; R2 = R4 = OCH₃; R3 = OH – Ácido Siringico.

Figura 3 - Estrutura química dos ácidos benzóicos

R1 = R2 = R3 = R4 = H – Ácido cinâmico; R1 = OH – Ácido *o*-cumárico; R2 = OH – Ácido *m*-cumárico; R3 = OH – Ácido *p*-cumárico; R2 = R3 = OH – Ácido Caféico; R2 = OCH₃; R3 = OH – Ácido Ferúlico; R2 = R4 = OCH₃; R3 = OH – Ácido Sinápico.

Figura 4 - Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos

Figura 5 - Estrutura química das cumarinas

Antioxidantes fenólicos funcionam como seqüestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992). Os

produtos intermediários formados pela ação destes antioxidantes são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático dessas substâncias (NAWAR, 1985).

Estudos têm demonstrado que o uso de substâncias antioxidantes naturais em alimentos pode oferecer uma ação protetora efetiva contra processos oxidativos que ocorrem em alimentos já que oferecem proteção contra os radicais livres e ao oxigênio singlete. Juntamente com a preferência do consumidor por produtos funcionais o uso de especiarias e ervas como antioxidantes naturais tem se tornado importante na indústria alimentícia. Pesquisadores têm trabalhado na separação, identificação, quantificação e utilização dos compostos fenólicos enfrentando muitos problemas metodológicos já que esses compostos englobam uma gama de substâncias (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

1.4 Potencial antioxidante de especiarias de uso culinário

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos (MARTINEZ-TOME et al., 2001) e o crescente número de consumidores que optam por alimentos com valor agregado e mais atributos relacionados à preservação da saúde, nos últimos anos a pesquisa tem se destacado pela prospecção de componentes antioxidantes naturais, com destaque para as especiarias, as quais permitirão substituir os sintéticos ou promover associações entre eles, com o intuito de diminuir a quantidade adicionada nos alimentos.

Dentre eles, podem se citar os trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Óleos e Gorduras da ESALQ, em que Almeida-Doria (1999) demonstrou que os extratos etanólicos de orégano (1000mg/Kg), alecrim (500mg/Kg) e a mistura deles podem ser utilizados como antioxidantes naturais, e apresentam a mesma eficiência em retardar a oxidação dos óleos que a mistura de antioxidantes sintéticos BHA+BHT, podendo assim substituí-los.

Já Dormana et al. (2003) estudaram as propriedades antioxidantes de extratos aquosos de quatro ervas geralmente consumidas, pertencentes à família das *Labiaceae*, sendo orégano, alecrim, sálvia e tomilho. Vários modelos experimentais foram usados para a caracterização da atividade, incluindo a capacidade de redução do ferro, DPPH e ABTS. Os extratos mostraram variados graus de capacidade

seqüestrante de radicais. As características antioxidantes observadas não foram relacionadas aos teores de fenólicos dos extratos.

Melo, Mancini-Filho e Maciel (2004) estudaram a atividade antioxidante de diferentes extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.) – extrato etéreo, etanólico e aquoso - isolados, associados entre si e com BHT. Os extratos aquoso, etéreo e etanólico exibiram 69,83%, 61,89% e 40,50%, respectivamente, de proteção contra a oxidação. Compostos fenólicos foram detectados nos dois primeiros extratos e foi constatada a presença de carotenóides. Ao combinar os dois extratos, em diferentes concentrações, o percentual de inibição da oxidação foi inferior ao dos extratos isolados, demonstrando não haver sinergismo entre eles. Associações de diferentes concentrações de BHT com o extrato aquoso exibiram elevada ação antioxidante, enquanto com o extrato etéreo essa ação foi levemente superior à do extrato isolado. A habilidade dos extratos aquoso e etéreo em retardar a oxidação pode ser atribuída, respectivamente, aos seus constituintes fenólicos e carotenóides. O extrato aquoso pode ser considerado como um potencial antioxidante, cuja ação pode ser intensificada ao ser empregado juntamente com BHT.

Frações isoladas de um extrato de coentro usando cromatografia em coluna demonstraram que não há diferença significativa no que diz respeito a suas propriedades antioxidantes usando o sistema α -caroteno/linoléico, porém foi inferior ao BHT. O componente identificado α -caroteno representou 61,14% dos carotenóides detectados no extrato, sugerindo que esse é o principal componente na ação antioxidante do coentro (GUERRA; MELO; MANCINI-FILHO, 2005).

A atividade antioxidante dos extratos de diferentes polaridades das folhas, das sementes e do óleo de coentro (*Coriandrum sativum*) foram estudados por Wangensteen, Samuelsen e Malterud (2004) através de três diferentes métodos, avaliação da atividade seqüestrante de radical DPPH, peroxidação do ácido linoléico e inibição do Fe^{2+} pela peroxidação fosfolipídica, além da quantificação de fenólicos, com boas correlações entre eles. As folhas do coentro mostraram uma atividade antioxidante mais forte do que as sementes. Na conclusão, a adição do coentro ao alimento deve aumentar a proteção antioxidante, inibindo assim processos não desejados da oxidação.

Melo, Mancini-Filho e Guerra (2004) estudaram o extrato aquoso de coentro obtido com um processo seqüencial da extração através de cromatografia, utilizando uma coluna de sílica em gel, e espectrometria de massa a fim de identificar os compostos fenólicos responsáveis pela sua atividade antioxidante. Quatro frações foram identificadas no extrato, usando cromatografia em uma coluna de silicone. Sua atividade antioxidante determinada no sistema β -caroteno/linoléico, foi inferior à do BHT. Nos fenólicos identificados anotou-se que o ácido caféico estava em concentração elevada (4,34 $\mu\text{g/mL}$ da fração I e 2,64 $\mu\text{g/mL}$ na fração III), visto que o ácido protocatequina e o glicetina estavam em concentrações elevadas na fração II (6,43 $\mu\text{g/mL}$) e na fração IV (3,27 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente. Estes resultados sugeriram que esses são os principais componentes responsáveis pela atividade antioxidante do extrato aquoso do coentro.

A atividade antioxidante de 23 espécies de manjeriço foi determinada a partir da capacidade antioxidante equivalente de Trolox (TEAC). Os índices de fenólicos totais foram determinados usando a técnica espectrofotométrica, baseada no reagente do Folin-Ciocalteu e calculados enquanto a atividade antioxidante do total de equivalentes de ácido gálico. Houve uma correlação positiva linear entre a atividade antioxidante e o índice de ácidos fenólicos totais testados no manjeriço (JAVANMARDIA et al., 2003).

Juntachote e Berghofer (2005) avaliaram a influência do calor e do pH na atividade antioxidante de extratos etanólicos obtidos a partir do manjeriço e do gengibre. Os extratos etanólicos mostraram boa estabilidade ao calor (80°C, por 1 h) e em pH neutro e ácido. Além disso, os extratos etanólicos agiram como ótimos seqüestrantes de radicais livres e também como inibidores da lipoxigenase.

Politeo, Jukic e Milos (2006) avaliaram a composição química e a capacidade antioxidante de agliconas do manjeriço comparados ao seu óleo essencial. A comparação da composição química de agliconas voláteis com a composição química do óleo essencial revelou quatro compostos comuns: eugenol, chavicol, linalol e α -terpineol. Para a avaliação das capacidades antioxidantes mencionadas, dois diferentes métodos foram executados: avaliação da atividade seqüestrante de radical DPPH e inibição do Fe^{2+} pela peroxidação fosfolipídica. O método de DPPH mostrou que as

agliconas voláteis livres possuem boas propriedades antioxidantes ao serem comparadas com o óleo essencial e BHT.

Wong e Kitts (2006) estudaram a atividade antioxidante da salsa e do coentro. O teor de fenólicos totais foi quantificado com o reagente de Folin-Ciocalteu. Diversos mecanismos foram utilizados para determinar a atividade antioxidante de todos os extratos, incluindo o método de avaliação da atividade seqüestrante de radical DPPH e inibição do Fe^{2+} pela peroxidação fosfolipídica. O teor de fenólicos variou entre a salsa e o coentro, folha e a haste, assim como extratos do metanol e da água. Os extratos de metanol derivados da folha exibiram melhor atividade no seqüestro de radicais livres ($p < 0.05$). A ação quelante do íon de ferro foi significativamente maior ($p < 0.05$) nos extratos do metanol da haste, e correspondendo à atividade antioxidante.

A capacidade antioxidante do óleo essencial extraído da salsa foi avaliada por três métodos *in vitro* diferentes: sistema β -caroteno, atividade no seqüestro de radicais livres DPPH e inibição do Fe^{2+} . Os resultados mostraram que o óleo essencial da salsa possui atividade antioxidante demonstrado no método de autooxidação do β -caroteno, mas sua capacidade de quelar metal foi insignificante. Entretanto, os valores foram mais baixos do que aqueles do BHT e do α -tocoferol (ZHANG et al., 2006).

1.5 Métodos de caracterização da qualidade de óleos

A análise de produtos naturais ou tecnológicos é uma especificação dos constituintes naturais e suas relativas quantidades. Em muitos casos, óleos e gorduras são uma complexa mistura, e as análises são baseadas na implementação de métodos físicos, químico-físicos, químicos, bioquímicos e sensoriais. Os resultados obtidos refletem a natureza e pureza dos produtos. Frequentemente, um conhecimento mais detalhado dos produtos é requerido, e desse modo, obtido pela combinação de diferentes métodos usando sofisticadas tecnologias instrumentais. É possível dessa forma, estabelecer um “cartão” de identificação para óleos e gorduras (MORDRET, 1996).

Depois dessa informação relatada como constituição, as análises também promoverão resultados sobre o estado de alteração resultando da hidrólise de

triacilglicerídeos (acidificação) ou a fixação do oxigênio no ácido graxo (autooxidação, termoxidação, fotoxidação) ou a presença de compostos indesejáveis (água, impurezas, contaminantes) como bem o sabor, odor e textura dos produtos (MORDRET, 1996).

No que diz respeito à sua estabilidade oxidativa, existem na literatura muitas técnicas para caracterização do estado de conservação de óleos e gorduras. De forma geral, elas podem ser classificadas em métodos estáticos (índice de peróxido, de TBA, de carbonila, de anisidina e teste de Kreis, de absorção na faixa da ultravioleta, de fluorescência, de cromatografia a gás e de polarografia), que medem o grau de oxidação de uma gordura ou óleo em um dado momento e em métodos dinâmicos (teste de estufa ou de Schaal, oxigênio ativo, absorção de oxigênio e o Rancimat) bem difundido entre os laboratórios de controle de qualidade e pesquisa em que a gordura ou óleo é submetido a um processo acelerado de envelhecimento (GRAY, 1978).

1.5.1 Acidez

Esse método determina a quantidade de ácidos graxos livres que existem na amostra. Aplica-se a todo óleo bruto e refinado, além de gorduras de animais. A acidez é freqüentemente expressa em termos de % de ácidos graxos livres (AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY-AOCS, 2003).

O índice de acidez é definido como o número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos graxos livres em um grama de óleo. Como os ácidos graxos são ácidos fracos, é necessário usar uma base forte como hidróxido de sódio ou de potássio para titulá-los. Pelo mesmo motivo, o ponto de equivalência estequiométrica, quando titulados com uma base forte, está no lado alcalino da neutralidade (pH 7). Por isso, a acidez causada pelos ácidos graxos livres é estimada, com hidróxido de sódio ou de potássio em solução alcoólica, usando fenolftaleína como indicador (MEHLENBACHER, 1960).

Dependendo de vários fatores, como o estado de conservação do grão do qual foi extraído, processo de extração e presença de enzimas hidrolíticas, um óleo pode apresentar maior ou menor teor de ácidos graxos livres, isto é, ácidos graxos não esterificados à glicerina (AOCS, 2003).

1.5.2 Índice de peróxido

É um indicador muito sensível no estágio inicial da oxidação, e sua presença é indício de que a deterioração do sabor e odor, em função de sua instabilidade, está por acontecer. Quando sua concentração atinge certo nível, mudanças complexas ocorrem, formando compostos de baixo peso molecular, oriundos de sua degradação (REGITANO-D'ARCE, 2006).

Estes compostos, aldeídos, cetonas, ácidos, álcoois e hidrocarbonetos, são os responsáveis pelo sabor e odor característicos de produtos rançosos. Inevitavelmente, são decompostos mesmo à temperatura ambiente, produzindo moléculas pequenas, em especial compostos carbonílicos. À temperatura elevada, a velocidade de formação dos peróxidos é menor que a de sua decomposição. Portanto, esta medição é limitada em razão da natureza transitória do peróxido, sua decomposição em produtos secundários pode subestimar o grau de oxidação, ou seja, baixos valores podem representar o estágio inicial ou avançada oxidação.

É o mais usado para indicar o grau de oxidação. O valor de peróxido é a medida do teor de oxigênio reativo expresso em termos de milequivalentes de oxigênio por 1.000g de óleo ou como milimoles de peróxido por quilo de molécula g raxa (1 milimol = 2 milequivalentes) (MEHLENBACHER, 1960 ; AOCS, 2003). As substâncias quantificadas são geralmente peróxidos e outros produtos similares, resultantes da oxidação lipídica. Aplica-se em toda gordura ou óleo (AOCS, 2003).

Durante essa análise, a amostra com solvente é adicionada de solução de iodeto de potássio saturada. Desta forma, os íons de iodo reagem com os peróxidos produzindo I_2 . Como indicador, é adicionado amido que na presença de I_2 se colore de azul. Ao titular-se a solução com tiosulfato de sódio ocorrerá a oxidação a tetrionato de sódio e o iodo é reduzido a I^- , causando perda na cor azulada, logo a quantidade de tiosulfato consumida é proporcional à quantidade de íons de iodeto presentes e indiretamente, de peróxido (BACCAN et al., 1985).

Esse método é altamente empírico e algumas variações podem acarretar resultados errados, pois, apesar do hidroperóxido reagir completamente com o iodeto, não existe garantia absoluta de que o índice de peróxido reflète o total de peróxido de oxigênio (BALTES, 1964; AOCS, 2003). Discute-se a real capacidade do oxigênio

ligado à molécula de oxidar o iodeto a elemento (DEFRANCESCO ; DEFRANCESCO; BOCCARDI, 1980 apud REGITANO-d'ARCE, 1998), perdendo a sua sensibilidade com valores de peróxido maiores ou iguais a 70 (AOCS, 2003).

1.5.3 Absorbância na região da ultravioleta

O exame espectrofotométrico na faixa do ultravioleta indica a qualidade de uma substância graxa, podendo prover informações sobre a qualidade do óleo, seu estado de preservação e refletir as modificações provocadas pelos processos tecnológicos, pois os produtos da autooxidação de óleos e gorduras exibem espectros característicos (INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY -IUPAC, 1979; AOCS, 2003).

Os valores de absorbâncias específicas em 233 e em 268nm, $E_{233\pm1}$ e $E_{268\pm1}$, respectivamente, podem definir o nível de oxidação dos óleos vegetais. Dienos ou polienos conjugados apresentam uma alteração na posição de suas duplas ligações. A formação de dienos, trienos e compostos de aroma como aldeídos e cetonas é proporcional ao ganho de oxigênio e à formação de peróxido durante os estágios iniciais de oxidação; estes são detectados em $233\pm1\text{nm}$ e em $268\pm1\text{nm}$, respectivamente. Além disso, a ação catalítica dos ácidos graxos livres na autooxidação determina aumento na absorção específica em 268nm, influenciado tanto pelas carboxilas livres como pela presença dos produtos secundários de oxidação do tipo carbonílico (GAMBA; MAZZINI, 1982; GATTUSO ; CILLUFFO; FAZIO, 1982 apud REGITANO-d'ARCE, 1998, AOCS, 2003). O método pode ser realizado por medida espectrofotométrica da absorbância entre 220 e 320 nm (varredura) ou pontualmente em 232 e 268nm (AOCS, 2003).

1.5.4 Teste acelerado – Método de estufa ou “Schaal Oven Test”

Um grande número de testes que aceleram a oxidação lipídica tem sido usado para analisar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras predizendo a conservação em condições normais de armazenamento. O Schaal oven test é o método que reconhecidamente fornece uma correlação melhor com o armazenamento ao ambiente

do que com o de oxigênio ativo (REGITANO-D'ARCE, 2006). Inicialmente destinava-se à avaliação de produtos de padaria e confeitaria, como biscoitos, pães elaborados e outros, em que a limpeza da estufa e pessoal bem treinado em distinguir o ponto olfativo final, eram exigidos para ser um teste confiável (MEHLENBACHER, 1960).

Este procedimento inicialmente envolvia a colocação de um béquer contendo 100g de amostra em uma estufa a temperatura de 70°C ou 63°C até o desenvolvimento do ranço. Amostras são examinadas a intervalos que podem variar de diários a semanais e o ponto final é determinado por uma avaliação organoléptica do odor. O índice de peróxido pode ser determinado (GRAY, 1978).

Atualmente, os trabalhos utilizam béquer contendo 20g de amostra e envolvem um número maior de amostras, a evolução da instalação do processo de ranço é acompanhada pela análise do índice de peróxido e tem-se observado que 1 dia de armazenamento sob as condições do Schaal Oven Test é equivalente a 1 mês de armazenamento em temperatura ambiente (FRANKEL, 1993; MALCONSON et al., 1994).

Referências

ALLEN, J.C.; HAMILTON, R.J. **Rancidity in foods**. In:_____. 3th ed. Londres: Blackie Academic & Professional, 1994. 290p.

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. 71p. (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

ALMEIDA-DORIA, R.F.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Antioxidant Activity of Rosemary and Oregano Ethanol Extracts in Soybean Oil under Thermal Oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.20, n.2, p.197-203, 2000.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official and tentative methods**. 3th ed. Champaign, 2003. 1v.

ANTUNES, A. J.; CANHOS, V. **Aditivos em alimentos**. Campinas: Editora da UNICAMP, 1984. 178p.

ASSUNÇÃO, F.P.; BENTES, M.H.S.; SERRYA, H. A comparison of stability oil from Brazil nut, from rubber and passion fruit seeds. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.61, n.6, p.1031-1036, 1984.

BACCAN, N.; ANDRADE, J.C.; GODINHO, O.E.S. BARONE, J.S. Práticas de laboratório. In: BACCAN, N.; ANDRADE, J.C.; GODINHO, O.E.S. BARONE, J.S. **Química analítica elementar**. Campinas: Unicamp, 1985. cap.8, p.154-212.

BALTES, J. Classical chemical methods in fat analysis. In: BOEKENOOGEN, H.A. **Analysis and characterization of oils, fats and fats products**. London: Interscience, 1964. v1, p.1-58.

BAUER, A.K.; DWYER-NIELD, L.D.; HANKIN, J.A.; MURPHY, R.C.; MALKINSON, A.M. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. **Toxicology**, Amsterdam, v.169, p.1-5, 2001.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. **Food chemistry**. 2th ed. In: _____ Berlim: Springer Verlag, 1999. p.215-223; 693-715.

BERGER, K.G.; HAMILTON, R.J. Lipids and oxygen: Is rancidity avoidable in practice?. In: HAMILTON, R.J. **Developments in oils and fats**. London: Chapman & Hall, 1995. chap 7, p.192-204.

BIRCH, A.E. ;FENNER, G. P.; WATKINS, R.; BOYD, L. C. Antioxidant proprieties of evening primrose seed extracts. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Chicago, v.49, p. 4502-4507, 2001.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2.ed. São Paulo : Varela, 1992.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Resolução número 04** de 24 de novembro de 1988. Aditivos Intencionais. Brasília: Ministério da Saúde, 1988.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, New York, v.56, n.11, p.317-333, 1998.

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

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, New York, v.854, p.435-442, 1998.

DEFRANCESCO, F.; DEFRANCESCO, C.; BOCCARDI, A. Alterazione ossidativa dei grassi e assorbimento nell'ultravioletto. Spettri U.V. di strutture ossidative in tecnica derivativa. Nota 1. **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, Milano, v.57, n.2, p.85-87, 1980.

ESCARPA, A.; GONZÁLES, M.C. An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Cleveland, v.31, n.2, p. 57 – 139, 2001

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

FENNEMA, O. R. **Food chemistry**. 2th ed. New York: Marcel Dekker, 1985, 991p.

_____ **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993. 896p.

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

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

GATTUSO, A.M.; CILLUFFO, V.; FAZIO, G. Caratteristiche chimiche e chimico -fisiche di oli lampanti siciliani. **Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, Milano, v.59, n.3, p.149-155, 1982.

GOULART, J. **Melhor dose e dose econômica de TBHQ nos óleos de milho e canola**. 2003, 75p. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo .

GOULART, J.; REGITANO D'ARCE, M. A. B. Economical TBHQ doses for corn oil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n.3, p.413-418, jul./ set., 2004.

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

GUERRA, N. B.; MELO, E. A.; MANCINI FILHO, J. Antioxidant compounds from coriander (*Coriandrum sativum* L.) etheric extract. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v.18, p.193-199, 2005.

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

GUTIERREZ, E.M.R.; REGITANO-d'ARCE, M.A.B.; RAUEN, A.M.M. Estabilidade oxidativa do óleo bruto de castanha do Pará. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n.3, p.22-27, 1997.

GRAMZA, A.; KORCZAK, J. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. **Food Science and Technology**, Shinfield, v.16, p.351-358, 2005.

GRAY, J.I. Measurement of lipid oxidation: a review. **Journal of the American Oil Chemists` Society**, Champaign, v.55, n.6, p.539-546, 1978.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, Oxford, v.55, p.481-504, 2000.

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

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

JAVANMARDIA, J.; STUSHNO, C.; LOCKE, E.; VIVANCO, J. M. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. **Food Chemistry**, Barking, v.83, p.547-550, 2003.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E. Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. **Food Chemistry**, Barking, v.92, p.193-202, 2005.

LADIKOS, D.; LOUGOVOIS, V. Lipid oxidation in muscle foods: A review. **Food Chemistry**, Barking, v.35, p. 295-314, 1990.

LINDLEY, M.G. The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. **Food Science Technology**, Shinfield, v.9, p.336-340, 1998.

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

MADARI, H; JACOBS, R.S. An analysis of cytotoxic botanical formulations used in the traditional medicine of ancient Persia as abortifacients. **Journal of Natural Products**, Pittsburgh, v.67, n.8, p.1204-1210, 2004.

MALCOLMSON, L.J.; VAISEY-JENSER, M.; PRZYBYLSKI, R.; ESKIN, N.A.M. Sensory stability of canola oil: present status of shelf life studies. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.71, p. 435-440, 1994.

MARTÍNEZ-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.

MEHLENBACHER, V.C. **The analysis of fats and oils**. Champaign: Garrard Press, 1960.

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

MELO, E. A.; MANCINI FILHO, J.; GUERRA, N. B. Characterization of antioxidant compounds in aqueous coriander extract (*Coriandrum sativum* L.). **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, London, v.38, p.15-19, 2004.

MORDRET, F. Analysis of oils and fats. In: _____ **Oils and fats manual**. New Jersey: Lavoisier, 1996. p.1155-1191.

NAWAR, W.W. Lipid oxidation of edible oils. In: AKOH, C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. In:_____. Nova York: Marcel Dekker, 1985, p.139-244.

NERY, J.P. Castanha-do-pará. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.20, p.13-25, 1969.

PASSOTTO, J.A.; PENTEADO, M.D.V.C.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante do β -caroteno e da vitamina A: estudo comparativo com antioxidante sintético. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.18, n.1, p.1998.

PECHNIK, E.; BORGES, P.; SIQUEIRA, R. Estudo sobre a castanha -do-pará. **Arquivos Brasileiros de Nutrição**, Rio de Janeiro, v.7, n.1, p.7-41, 1950.

PICCIN, E. **Determinação depolifenóis totais utilizando sistemas de análise por injeção em fluxo**. 2004. 98p. (Mestrado em Química) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

POLITEO, O.; JUKIC, M.; MILOS, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. **Food Chemistry**, Barking, v.101, p.379-385, 2006.

REGITANO-d'ARCE, M.A.B. **Castanha-do-pará: óleo e subprodutos sob a ótica da lipidologia**. Piracicaba. 1998. 64p. (Tese Livre Docência) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

_____. Deterioração de lipídeos – ranço. In: OETTERER, M; REGITANO-d'ARCE, M.A.B; SPOTTO, M.H.F. (Ed.) **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. p.243-270.

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R. Antioxidants. In: AKOH, C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. Nova York: Marcel Dekker, 1998. p.423-448.

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação da capacidade antioxidante. **Química Nova**, Campinas, v.22, n.1, p.94-103, 1998.

SIMÃO, A.M. **Aditivos para alimentos sob o aspecto toxicológico**. São Paulo: Nobel, 1985.

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 biotechnology**. Nova York: Marcel Dekker, 1992. p.377-396.

SHERWIN, E.R. Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. **Journal American Oil Chemists' Society**, Champaing, v.55, n.3, p.809-814, 1978.

SLUIS, A.A.; DEKKER, M.; de JAGER, A.; JONGEN, W.M.F. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Chicago, v.49, p. 3606-3613, 2001.

SOUZA, M.K.; MENEZES, H.C. Processamento de amêndoa e torta de castanha -do-brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.1, p.120-128, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

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

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

TOMÁS-BARBERÁN, F.A. HPLC-DAD-ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, na plums. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Chicago, v.49, p. 4748-4760, 2001.

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

VIEIRA, T.M.F.S.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B Canola oil thermal oxidation during oven test and microwave heating. **Lebensmi Hel.-Wissenschaft und Technologie**, London, v.34, p.215-221, 2001.

VINSON, J.A. SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Chicago, v.49, p. 5315-5321, 2001.

WANGENTEEN, H.; SAMUELSEN, A. B.; MALTERUD, K. E. Antioxidant activity in extracts from coriander. **Food Chemistry**, Barking, v.88, p.293-297, 2004.

WATANABE, M. J. Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moech). **Journal Agricultural Food Chemistry**, Chicago, vol. 46, no. 3, p. 839-845, 1998.

WITISCHI, H.; LOCK, S. Toxicity of butylated hydroxytoluene in mouse following oral administration. **Toxicology**, Amsterdam, v. 9, p. 137-146, 1978.

WHYSNER, J.; WANG, C.X.; IATROPOULOS, M.J.; WILLIAMS, M.G. Dose response of promotions by butylated hydroxyanisole in chemically initiated tumors of the rat forestomach. **Food Chemistry Toxicology**, Bethesda, v.32, n.3, p.215-222, 1994.

WONG, P.Y. Y.; KITTS, D. D. K. Studies on the dual antioxidant and antibacterial properties of parsley (*Petroselinum crispum*) and cilantro (*Coriandrum sativum*) extracts. **Food Chemistry**, Barking, v.97, p.505-515, 2006.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal Agricultural Food Chemistry**, Chicago, v.49, p. 4083-4089, 2002.

ZHANG, H.; CHEN, F.; WNG, X.; YAO, H. Y. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*). **Food Research International**, Essex, v.39, p.833-839, 2006.

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

ZDZISLAW, E.S.; KOLAKOWSKA, A. **Chemical and functional properties of food lipids**. In:_____. New York: CRC Press, 2002. 38 8p.

2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE 5 ERVAS AROMATICAS DE USO CULINÁRIO ADICIONADAS EM ÓLEO EXTRA VIRGEM DE CASTANHA DO PARÁ .

Resumo: O emprego de ervas aromáticas como antioxidantes naturais tem se destacado na indústria de alimentos, quer na forma de extratos, quer *in natura*. Cinco ervas, desidratadas em escala laboratorial e industrial, de reconhecido poder antioxidante, orégano, *Origanum vulgare*; manjerição, *Ocimum basilicum*; coentro, *Coriandrum sativum* L.; salsa, *Petroselinum sativum* e tomilho, *Tymus vulgaris*, foram avaliadas quanto ao teor de compostos fenólicos e quanto à atividade antioxidante através de teste acelerado de oxidação, Schaal Oven Test, em óleo de castanha do Pará a partir das análises de índice de peróxido e absortividade específica em 232 nm. O teor de fenólicos encontrado variou entre as ervas. Orégano, coentro, salsa e manjerição secos industrialmente, apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos. O tomilho não apresentou diferença entre as amostras. O tomilho e o orégano foram as ervas que apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos independentemente do processo de secagem. Nos testes de estufa as ervas tomilho e orégano foram as que demonstraram maior atividade antioxidante nas concentrações de 1,25 e 5% (massa seca/massa óleo). Ambas as ervas estudadas são alternativas promissoras como ingredientes antioxidantes nos alimentos.

Palavras-chave: Ervas, Oxidação, Óleo de castanha do Pará, Schaal Oven Test, Fenólicos, Atividade antioxidante

Abstract: The job of natural aromatic herbs as antirust has if detached in the food industry, it wants in the extract form, wants *in natura*. Five herbs, dehydrated in laboratorial and industrial scale, of recognized being able antirust, oregano, *Origanum vulgare*; basil, *Ocimum basilicum*; coriander, *Coriandrum sativum* L.; parsley, *Petroselinum sativum* and thyme, *Tymus*, had been evaluated how much to the text of phenolic composites and how much to the anti oxidant activity through sped up test of oxidation, Schaal Oven Test, in Brazil nut oil from the analyses of index of peroxide and specific absortividade in 232 nm. The found text of p henolic varied between the herbs. Oregano, coriander, dry parsley and basil industrially, had presented biggest phenolic

composite texts. The thyme did not present difference between the samples. The thyme and the oregano had been the herbs that had independently presented the biggest phenolic composite concentrations of the drying process. In the oven stability test the herbs thyme and oregano had been the ones that had demonstrated to greater antirust activity in the concentrations of 1,25 and 5% (dry mass/m ass oil). Both the studied herbs are alternative promising as antioxidant ingredients in foods.

Key words: Herb, Oxidation, Brazil nut oil, Schaal Oven Test, Phenolic

2.1 Introdução

Com a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos lipídicos são empregados compostos químicos conhecidos como antioxidantes. Neste caso, os compostos mais utilizados, entre outros, são: butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), tércio-butil-hidroquinona (TBHQ), tri-hidroxibutilfenona (THBP) e galato de propila (PG). Contudo estudos toxicológicos mais recentes têm demonstrado a possibilidade desses antioxidantes apresentarem alguma toxidez (BAUER et al., 2001).

Dentro desse cenário, nos últimos anos tem sido dada ênfase à pesquisa de possíveis antioxidantes presentes em produtos naturais, com destaque para as especiarias, mundialmente utilizadas para fins culinários. A atividade antioxidante das especiarias e de seus extratos é atribuída aos compostos fenólicos que também podem atuar como seqüestrantes de radicais livres no organismo reduzindo os riscos de doenças crônicas (GUERRA; LAJOLO, 2005).

Os compostos fenólicos são encontrados em muitas frutas e vegetais. Eles são formados a partir de uma ou mais classes de metabólitos secundários com variadas estruturas e funções e geralmente possuem um anel aromático (ROBARDS et al., 1999).

Atoui et al. (2005) em suas amostras de orégano e salsa obtiveram resultados de 109 e 124 mg de ácido gálico por grama de amostra. Além dessas duas ervas

também analisaram amostras de menta, camomila e eucalipto com respectivamente 106, 106 e 113 mg de ácido gálico por grama de amostra.

Su et al. (2007) encontraram resultados de 5,48 e 18,56 mg de ácido gálico por grama de amostra, respectivamente para orégano e camomila, dentre suas amostras analisadas.

Katalinic et al. (2006) ao trabalharem com 70 amostras de plantas medicinais também mensuraram a concentração de compostos fenólicos pelo método Folin - Ciocalteu. Entre suas amostras analisaram a erva tomilho, encontrando 87,6 mg de ácido gálico por grama de amostra seca.

O total de compostos fenólicos em extratos etanólicos e aquosos de tomilho também foram avaliados por Mata et al (2007) utilizando o método Folin -Ciocalteu. Os valores obtidos pelo extrato etanólico foi de 113 mg de ácido gálico por grama de amostra e os valores do extrato aquoso foi de 74,9 mg de ácido gálico por grama de amostra.

Jayasinghe et al. (2003) examinaram a atividade antioxidante de extratos metanólicos de orégano em diferentes modelos de sistemas in vitro. No extrato bruto foi identificada a concentração de compostos fenólicos entre 7,3 e 227,2 mg de ácido gálico por grama de amostra, nas diferentes frações analisadas.

A atividade antioxidante pode variar de acordo com o tipo de composto e sua concentração (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000). A determinação da eficácia de um antioxidante corresponde frequentemente à medida do aumento do período de indução resultante da sua adição. Esse aumento é por vezes expresso como um índice antioxidante ou fator de proteção (GRAMZA; KORCZAK, 2005).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos e ser crescente o número de consumidores que optam por alimentos com valor agregado e mais atributos relacionados à preservação da saúde, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a viabilidade do uso de ervas aromáticas com potencial antioxidante em óleo de castanha do Pará prensado e filtrado como óleo gourmet para uso culinário.

2.2 Material e método

2.2.1 Materiais

2.2.1.1 Ervas

Foram utilizadas ervas doadas pela empresa CIA das Ervas, secas em estufas de circulação de ar a 60°C e irradiadas e ervas adquiridas em mercado frescas e secas em laboratório em estufa de circulação de ar a 40°C . Ambas foram mantidas ensacadas em sacos plásticos sob temperatura de refrigeração até o momento inicial dos testes. As ervas foram caracterizadas quanto ao teor de compostos fenólicos e umidade.

2.2.1.2 Óleo de castanha do Pará

O óleo de castanha foi fornecido pela empresa Ouro Verde , obtido a partir da prensagem mecânica a frio, filtrado e sem aquecimento prévio. O óleo foi armazenado sob refrigeração até o início dos ensaios.

2.3 Métodos

2.3.1 Teste de estufa para seleção das ervas (Oven test)

Foram utilizadas 5 ervas aromáticas orégano, *Origanum vulgare*; manjerição, *Ocimum basilicum*; coentro, *Coriandrum sativum* L; salsa, *Petroselinum sativum* e tomilho, *Tymus vulgaris* adquiridas *in natura* e secas em escala laboratorial e secas e irradiadas em escala industrial.

Foram realizados 5 diferentes ensaios, sendo que no primeiro ensaio foi adicionado aos béqueres contendo 20 gr de óleo de castanha do Pará concentrações de 0,5, 1,25 e 2,5% de cada erva seca em escala laboratorial , separadamente, permanecendo em estufa por 120 horas com temperatura de 60°C $\pm$ 2°C. No segundo ensaio foram selecionadas novas concentrações para orégano (0,05, 0,1 e 0,5%), tomilho (0,25 e 2,5%) e manjerição (0,25 e 2,5%) somente para coentro e salsa é que se repetiram as concentrações do ensaio anterior, permanecendo por 120 horas em

estufa com temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Já no terceiro ensaio foram utilizadas as ervas secas em escala industrial nas mesmas condições do primeiro ensaio. Durante o quarto ensaio foram utilizadas concentrações de 1,25, 2,5 e 5% para as cinco ervas secas em escala industrial, permanecendo também por 120 horas sob temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. E para finalizar, no quinto ensaio foram utilizadas concentrações entre 5 e 10% para as cinco ervas, permanecendo esse ensaio em estufa por 72 horas em temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

As determinações realizadas nos cinco ensaios foram índice de peróxido e absorbância específica no UV 232 nm. Os béqueres foram distribuídos em ordem aleatória na estufa.

2.3.2 Obtenção dos extratos e teor de compostos fenólicos

Foi pesado em tubo de ensaio 0,5g de erva e adicionado 10 mL de solução metanólica a 80%. Os tubos permaneceram em banho com ultra-som durante 5 minutos para serem centrifugados durante 10 minutos sob velocidade de 3000rpm. O sobrenadante foi separado e assim realizado uma nova extração seguindo as mesmas etapas anteriores (RACANICCI et al., 2004). Desse extrato foi pipetado 0,5 mL da amostra em tubo de ensaio e acrescentado 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu diluído em água destilada a 1:10. Após 5 minutos de repouso, adicionou-se 2,0 mL de solução de Na_2CO_3 a 4%. Também foi necessário fazer um branco usando 0,5 mL de água destilada, Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio. Após 2 horas de repouso protegido da luz, as leituras foram realizadas em 740 nm, zerando o espectrofotômetro com o branco (WOISKY; SALATINO, 1998). Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico.

2.3.3 Umidade

Foi pesado em placa de Petri um grama de amostra das 5 ervas secas em escala industrial e em escala laboratorial. Assim que foram pesadas foram colocadas em estufa por 12 horas com temperatura de $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para a realização da primeira

pesagem, após essas 12 horas as placas com amostra voltavam para a estufa para permanência de 1 hora até que o peso se tornasse constante.

2.3.4 Índice de Peróxido

Segundo o método Cd 8b-90 (AOCS, 2003), foram pesados 3g da amostra em frasco de iodo de 125 mL. Adicionou-se 50 mL de solução de ácido acético/isooctano (3:1) e solução de iodeto de potássio saturada e água destilada. A seguir foi realizada titulação com solução de tiossulfato de sódio 0,1N e o volume gasto o, após adição de goma de amido, forneceu a concentração em peróxidos em meq O₂/Kg de amostra através da fórmula:

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

N = normalidade da solução de tiossulfato de sódio

a = valor gasto na titulação

b = valor gasto na titulação do branco

2.3.5 Absorbância específica no UV – 232 nm

Foi determinado espectrofotometricamente nos comprimentos de onda de 232 nm no qual se quantificaram os dienos, conforme a recomendação do método II.d.22 (IUPAC, 1979). Os resultados foram expressos em extinção específica ($E^{1\%}_{1\text{cm}}$).

$$E^{1\%} = \frac{A_1}{C \times D}$$

Onde: A₁ = média da absorbância no comprimento de onda

C = concentração da solução em g/100ml de solução

D = comprimento da célula (1cm)

2.4 Resultados

2.4.1 Compostos fenólicos e umidade

Antioxidantes podem prevenir os processos de oxidação causados pelos radicais livres e por espécies reativas de oxigênio em alimentos e em sistemas biológicos. Certas especiarias e extratos de especiarias, usadas em diferentes preparações culinárias para intensificar as características organolépticas, são excelentes fontes de compostos fenólicos que têm sido reportados por mostrarem boa atividade antioxidante (HINNEBURG; DORMAN A; HILTUNEN, 2006). Compostos que proporcionam estabilidade oxidativa têm sido identificados em várias especiarias, tais como, tomilho, orégano, sálvia, entre outros.

O total de fenólicos, estimados através do método Folin-Ciocalteu, encontrado variou entre as ervas adquiridas no mercado e as industrializadas. De um modo geral, as ervas compradas no mercado e secas no laboratório apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos para coentro, salsa, tomilho e manjerição. Somente o orégano seco em escala industrial (39,2 mg de ácido gálico por grama de amostra) apresentou maior concentração do que o adquirido *in natura* (11,73 mg de ácido gálico por grama de amostra). Essa variação pode ocorrer por haver diferenças no cultivar, na variedade, nas condições climáticas, no manejo, na pós-colheita, no armazenamento, entre outros manejos (MARTINS et al, 2004).

Além das possíveis diferenças encontradas durante todo o manejo, há uma diferença na forma de secagem das ervas em escala industrial e laboratorial. As ervas secas em escala industrial apesar de permanecerem em temperaturas mais elevadas o tempo de secagem é menor do que as secas em laboratório o que faz com que a perda de compostos fenólicos possa ser menor quanto menor for o tempo de exposição a temperatura.

Porém, em ambas as amostras analisadas, orégano e tomilho foram as ervas que se destacaram apresentando maiores concentrações de compostos fenólicos. Os resultados encontrados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Teor de compostos fenólicos expressos em equivalentes de ácido gálico em mg/g de erva

<i>Ervas</i>	<i>Desidratadas no laboratório</i>	<i>Desidratadas industrialmente</i>
Coentro	8,21	2,50
Orégano	11,73	39,20
Salsa	3,87	2,90
Tomilho	25,75	21,90
Manjeriço	3,15	2,70

Zheng e Wang (2001) determinaram a capacidade antioxidante e o total de compostos fenólicos de 27 ervas culinárias e 12 ervas medicinais. Entre as amostras analisadas estão tomilho, orégano, salsa e manjeriço que respectivamente apresentaram 2,13, 11,8, 1,12, 2,23 mg de ácido gálico por grama de amostra seca e seus resultados indicam que os compostos fenólicos tiveram maior contribuição para a capacidade antioxidante das ervas estudadas. Esses resultados estão abaixo dos resultados encontrados tanto para as amostras de ervas secas no laboratório quanto para as ervas secas na indústria.

Piedade (2007) estimou as concentrações dessas cinco ervas, secas em escala laboratorial, pelo mesmo método de extração e identificação, encontrando maiores concentrações de compostos fenólicos para as amostras de coentro, orégano, salsa e manjeriço quando comparadas as amostras desse estudo. Quando comparado com os resultados das ervas secas em escala industrial as ervas orégano e tomilho apresentaram maiores concentrações do que as descritas no estudo.

Hinneburg, Dormana e Hiltuen (2006) estimaram as concentrações de compostos fenólicos em diversas espécies de plantas, utilizando o mesmo método Folin-Ciocalteu. Dentre as ervas estudadas foi analisado amostras de salsa no qual obteve-se uma concentração de 29,2 equivalentes de ácido gálico em mg/g de amostra. Esta concentração está acima da encontrada nesse estudo, para ambas as ervas secas em escala laboratorial e industrial.

Dormana et al. (2003) encontraram concentrações de 149 mg de ácido gálico por grama de amostra de orégano e 95,6 mg de ácido gálico por grama de amostra de tomilho. Esses resultados também estão acima das concentrações aqui encontradas.

Na tabela 2 estão as porcentagens de umidade encontradas em cada uma das ervas estudadas. Houve uma variação entre as amostras de ervas e entre os tipos de secagem. De uma forma geral as amostras de ervas secas em escala laboratorial apresentaram maior porcentagem de umidade, somente as amostras de orégano e tomilho apresentaram valores menores.

Tabela 2 - Porcentagem de umidade das ervas utilizadas durante os ensaios

<i>Ervas</i>	<i>Umidade-Secas em laboratório</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>Umidade-Secas industrialmente</i>	<i>Desvio Padrão</i>
Coentro	12,75%	0,78	4,24%	0,08
Orégano	8,96%	0,21	10,30%	0,24
Salsa	11,57%	0,01	7,30%	0,34
Tomilho	7,88%	0,41	12,10%	0,25
Manjerição	17,33%	0,04	9,60%	0,02

Analisando os resultados das concentrações de compostos fenólicos e de umidade encontra-se uma relação, sendo que as ervas que apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos também apresentaram os maiores porcentagens de umidade. Somente a amostra de tomilho não apresentou essa relação.

2.4.2 Shaal Oven Test

A oxidação lipídica é um fenômeno espontâneo e inevitável, com uma implicação direta no valor comercial quer das matérias graxas, quer de todos os

produtos que a partir deles são formulados (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1998). O índice de peróxido e a absorbância específica em 232 nm são os indicativos mais usados para expressar o grau de oxidação (MEHLENBACHER, 1960; VANHANEN; SAVAGE, 2006).

No primeiro ensaio foram utilizadas as ervas adquiridas no mercado *in natura* e secas em escala laboratorial. As concentrações em porcentagens variaram em 0,5, 1,25 e 2,5%.

O índice de peróxido do óleo inicial era 3,99 meq O_2 /Kg e absorbância específica em 232 nm 2,87 $E^{1\%}_{1cm}$, sendo que esses valores ao final de 120 horas em estufa de circulação de ar passaram para 75,89 e 11,83 respectivamente.

Apesar de o orégano apresentar uma das mais altas concentrações dentre as ervas desse estudo, somente os tratamentos de orégano a 1,25 e 2,5% obtiveram valores superiores ao encontrado no tratamento controle, 78,23 e 76,89 meq O_2 /Kg respectivamente, quando analisado o índice de peróxido.

O tratamento que obteve o melhor resultado nesse ensaio foi coentro a 2,5%, apresentando em média 20 meq O_2 /Kg, com uma porcentagem de proteção de 70,9% em relação à amostra controle oxidada. Porém esses resultados apresentaram um desvio padrão muito alto, fazendo com que se tornem variáveis.

Os tratamentos tomilho 1,25%, salsa 0,5%, coentro 0,5%, coentro 1,25% e manjerição 1,25% também apresentaram porcentagens de proteção acima de 50%, sendo 54,1, 56,3, 61,5 e 62,5% respectivamente. Em relação ao índice de peróxido não há uma correlação entre os melhores tratamentos e as concentrações de compostos fenólicos, pois, coentro e manjerição que se destacaram foram os que apresentaram as menores concentrações (figura 6).

Figura 6 - Valores de índice de peróxido (meq O₂/Kg) do óleo de castanha do Pará após 120 horas em estufa de circulação de ar a 60°C $\pm$ 2°C utilizando ervas secas em escala laboratorial

Analisando os resultados da absorvância específica em 232 nm observa-se que os tratamentos manjeriço 0,5%, tomilho 0,5% e orégano 2,5% e 1,25% apresentaram valores maiores que o encontrado no controle final. Nessa análise o melhor resultado foi encontrado no tratamento salsa a 2,5% apresentando $8 \text{ E}^{1\%}_{1\text{cm}}$ em média seguido por manjeriço 2,5% apresentando $9 \text{ E}^{1\%}_{1\text{cm}}$ em média, dando um fator de proteção de 27,6 e 21,3% respectivamente. Os resultados estão apresentados na figura 7.

Porém novamente os tratamentos que obtiveram os melhores resultados não fazem correlação com as concentrações de compostos fenólicos encontrados, ou seja, novamente as amostras que apresentaram as menores concentrações se destacaram. Não foi possível correlacionar os resultados encontrados através da análise de índice de peróxido e absorvância específica em 232 nm, pois, possivelmente, a oxidação

lipídica não havia alcançado a produção de compostos secundários de oxidação, nos quais são medidos pela absorvância específica em 232 nm.

Figura 7 - Valores de absorvância específica em 232 nm ($E^{1\%}_{1cm}$) do óleo de castanha do Pará após 120 horas em estufa de circulação de ar a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ utilizando ervas secas em escala laboratorial

Mesmo não sendo encontrado correlação no ensaio anterior entre índice de peróxido e absorvância específica foram selecionadas novas concentrações para orégano (0,05%, 0,1% e 0,5%), tomilho (0,25% e 2,5%) e manjeriçao (0,25% e 2,5 %), mas sempre mantendo entre esses uma concentração semelhante ao ensaio anterior. Somente para coentro (1,25% e 2,5%) e salsa (1,25% e 2,5%) é que se repetiram duas concentrações anteriores.

Novamente não foi possível realizar uma correlação entre os resultados de índice de peróxido e absorvância específica. Os resultados de índice de peróxido variaram muito entre os tratamentos, mantendo ainda desvio padrão alto, já os

resultados de absorvância específica não variaram entre si, mantiveram valores entre 12 e 13 $E^{1\%}_{1cm}$, valores esses que não apresentam proteção contra a oxidação lipídica pois estão muito próximos ao resultado da amostra controle final, oxidada .

Analisando os valores para índice de peróxido o melhor tratamento nesse ensaio foi manjerição a 2,5%, apresentando em média 8,45 meq O_2 /Kg e somente o tratamento de manjerição 0,25% apresentou resultado acima do encontrado no controle final. Já para a análise de absorvância específica vê -se que somente os tratamentos de manjerição 2,5%, coentro 2,5%, salsa 2,5% e 1,25% e tomilho 2,5% apresentaram valores abaixo do encontrado no controle final. O que apresentou o maior resultado foi orégano a 0,5%.

Para os tratamentos que foram repetidos pode -se observar através do índice de peróxido que não se repetiu os resultados para orégano 0,5%, tomilho 2,5%, salsa 1,25%, coentro 1,25 e 2,5% e manjerição 2,5%, somente a salsa com 2,5% o resultado obtido nesse segundo ensaio foi próximo ao encontrado no ensaio anterior.

Quando se observa absorvância específica os tratamentos também repetidos obtiveram resultados mais baixos do que os encontrados nesse segundo ensaio e que de uma forma geral, no ensaio anterior, houve uma variação maior entre os tratamentos estudados. Os resultados obtidos estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Valores de índice de peróxido (meq O₂/Kg) e absorbância específica em 232 nm ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$) do óleo de castanha do Pará após 120 horas em estufa de circulação de ar a 60°C $\pm$ 2°C utilizando ervas secas em escala laboratorial

Tratamentos	IP	232nm
Orégano 0,05%	50,48 $\pm$ 18,24	13,066 $\pm$ 0,59
Orégano 0,1%	64,31 $\pm$ 1,55	13,701 $\pm$ 0,44
Orégano 0,5%	71,57 $\pm$ 4,89	13,989 $\pm$ 0,76
Tomilho 0,25%	35,39 $\pm$ 8,28	13,383 $\pm$ 1,02
Tomilho 2,5%	67,09 $\pm$ 1,76	12,571 $\pm$ 0,23
Salsa 1,25%	67,21 $\pm$ 8,35	12,664 $\pm$ 1,56
Salsa 2,5%	52,68 $\pm$ 5,27	12,323 $\pm$ 0,61
Coentro 1,25%	69,32 $\pm$ 6,89	13,083 $\pm$ 0,74
Coentro 2,5%	65,36 $\pm$ 7,05	12,672 $\pm$ 0,64
Manjerição 0,25%	73,43 $\pm$ 13,17	13,144 $\pm$ 0,36
Manjerição 2,5%	8,45 $\pm$ 2,17	12,764 $\pm$ 1,49
Controle Final	72,00 $\pm$ 5,45	13,007 $\pm$ 0,59
Controle Inicial		5,52 $\pm$ 0,12

No terceiro ensaio foram utilizadas ervas seca em escala industrial ao invés das ervas adquiridas *in natura* e secas em escala laboratorial. Para se obter uma comparação aos resultados encontrados no primeiro ensaio foram utilizadas as mesmas concentrações.

Em relação ao índice de peróxido os tratamentos, tomilho 2,5, 1,25 e 0,5% e orégano 2,5, 1,25 e 0,5% apresentaram resultados abaixo do encontrado no controle final. O melhor resultado encontrado foi no tratamento tomilho 2,5% que apresentou em média 7,5 meq O₂/Kg seguido por orégano 2,5% que apresentou 9,6 meq O₂/Kg em média. Respectivamente, esses tratamentos apresentaram 59,9 e 45,5% de proteção a oxidação em relação à amostra final oxidada.

Os tratamentos manjeriço 0,5%, salsa 0,5% e coentro 0,5% apresentaram os resultados mais elevados nesse ensaio, chegando a valores acima de 30 meq O₂/Kg e suas repetições tiveram muitas variações, gerando alto desvio padrão (figura 8).

Figura 8 - Valores de índice de peróxido (meq O₂/Kg) do óleo de castanha do Pará após 120 horas em estufa de circulação de ar a 60°C $\pm$ 2°C utilizando ervas secas em escala industrial

Para a análise de absorvância específica os melhores resultados foram encontrados nos tratamentos de salsa 2,5%, tomilho 2,5, 1,25, 0,5% e orégano 2,5, 1,25, 0,5%. O melhor resultado foi apresentado pelo tratamento orégano 2,5% com valor de 3,1 E^{1%}_{1cm} em média seguido por tomilho 2,5% com 3,8 E^{1%}_{1cm} em média. Esses dois tratamentos apresentaram 42,35 e 28,09% de proteção a oxidação em relação a amostra final oxidada. O maior resultado foi apresentado pelo tratamento

manjerição 0,5% com aproximadamente $14 \text{ E}^{1\%}_{1\text{cm}}$ seguido por coentro a 0,5% com $10,7 \text{ E}^{1\%}_{1\text{cm}}$ em média.

Como pode se observar nas figuras 8 e 9 os resultados obtidos foram mais baixos, do que os encontrados no primeiro e segundo ensaio, tanto para índice de peróxido como para absorbância específica em 232nm, a variação entre as repetições foi bem menor. Há uma correlação entre os resultados de índice de peróxido e absorbância específica em 232 nm. Deste modo, os melhores tratamentos, considerando ambas as análises, foram tomilho 2,5% e orégano 2,5% seguidos por tomilho 1,25% e orégano 1,25%.

Nesse ensaio também foi possível analisar que há uma correlação entre os resultados das melhores ervas utilizadas como antioxidantes e as maiores concentrações em compostos fenólicos encontradas. Nas ervas secas em escala industrial, orégano seguido por tomilho foram as ervas que apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos e também as que apresentaram maiores fatores de proteção a oxidação em relação à amostra final de óleo de castanha do Pará oxidada. A atividade antioxidante das especiarias e seus extratos são atribuídos aos compostos fenólicos que podem atuar como sequestrante de radicais livres (BRACCO; LOLIGER; VIRET, 1981; CHANG, et al., 1977).

Figura 9 - Valores de absorvância específica em 232 nm ($E^{1\%}_{1cm}$) do óleo de castanha do Pará após 120 horas em estufa de circulação de ar a $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ utilizando ervas secas em escala industrial

Na figura 10 estão representados os resultados obtidos no quarto ensaio, onde foram utilizadas concentrações de 1,25%, 2,5% e 5% para as cinco ervas estudadas. Nesse ensaio foi realizado somente a avaliação do índice de peróxido.

Para as ervas e concentrações estudadas nesse ensaio as que tiveram melhor poder antioxidante foram 4: tomilho 5%, orégano 5%, tomilho 2,5% e tomilho 1,25% respectivamente 7,07 meq O_2/Kg , 9,14 meq O_2/Kg , 13,11 meq O_2/Kg e 19,3 meq O_2/Kg de índice de peróxido. Essas quatro concentrações apresentaram 84,5, 80, 71,3 e 57,8% de proteção a oxidação em comparação a amostra de óleo final oxidada.

Os tratamentos de manjeriçao 5%, salsa 5%, coentro 5, 2,5 e 1,25% e orégano 2,5% apresentaram valores de índice de peróxido abaixo do tratamento controle, mas com valores bem acima das 4 melhores concentrações que se destacaram. Para esses tratamentos o valor do índice de peróxido variou entre 28,5 e 45,5 meq O_2/kg .

O tratamento que obteve o melhor resultado foi tomilho 5% apresentando resultado menor que 10 meq O₂/1Kg sendo o tratamento salsa 1,25% o que apresentou o maior valor, em média 70 meq O₂/Kg, sendo a amostra controle final oxidada ter em média 45,7 meq O₂/Kg.

Mas pode-se observar nesse ensaio que quanto maior a concentração da erva no óleo menor foi o valor encontrado para o índice de peróxido, e isso se repetiu para todas as ervas estudadas. E que novamente há uma correlação com a a concentração de compostos fenólicos e os resultados de índice de peróxidos d as amostras oxidadas. As ervas que apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos também apresentaram as melhores atividades antioxidantes.

Figura 10 - Índice de peróxido após 120 horas em estufa com circulação com temperatura de 60°C $\pm$ 2°C utilizando ervas secas industrialmente

Seguindo os resultados encontrados no quarto ensaio foi realizado o quinto ensaio onde as concentrações utilizadas foram de 5% a 10%. Nesse ensaio foi possível observar a ação antioxidante de todas as ervas e concentrações estudadas, pois todos os tratamentos apresentaram resultados a baixo do tratamento controle final oxidado. Somente manjerição 5, 7,5 e 10% e salsa 5% apresentaram fatores de proteção a baixo de 50% em relação a amostra final oxidada.

O melhor resultado da atividade antioxidante foi tomilho a 10% seguido por tomilho a 5%, respectivamente 4,68 e 4,97 meq O_2 /Kg, indicando que usando concentrações a cima de 5% não há alterações no resultado de índice de peróxido.

E seguindo um comportamento já observado no ensaio anterior tomilho e orégano foram as duas ervas que se destacaram mantendo o valor de peróxido, após 72 horas de estufa a $60^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$, muito próximo a amostra de óleo inicial, indicando que foram capazes de decompor os hidroperóxidos formados em espécies não reativas. Os resultados estão representados na figura 11.

Figura 11 - Índice de peróxido após 72 horas em estufa com circulação com temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ utilizando ervas secas em escala industrial

As ervas e suas concentrações descritas na tabela 4 apresentaram os melhores resultados em relação ao índice de peróxido, pois foram as ervas que com as menores concentrações resultaram nos mais baixos valores de índice de peróxido. As demais ervas necessitavam de maiores concentrações para obterem índices de peróxidos mais baixos. Desta forma, considera-se o melhor resultado as ervas que em menor concentração possam resultar em maior proteção, ou seja, maior atividade antioxidante. Não é viável apenas esperar que o antioxidante natural tenha ótima atividade antioxidante.

Tabela 4 – Os melhores resultados de índice de peróxido encontrados nos quatro ensaios realizados

<i>Erva</i>	<i>Concentração</i>	<i>Teor de compostos fenólicos (mg/g)</i>	<i>Resultado de IP (meq O₂/Kg)</i>
*Tomilho	10%	2,19	4,68
*Tomilho	5%	1,1	7,07
*Tomilho	2,5%	0,54	13,11
*Tomilho	1,5%	0,33	19,28
*Orégano	10%	3,9	6,25
*Orégano	5%	1,96	9,14

* secas em esacala industrial

A atividade antioxidante de alguns compostos fenólicos tem realmente sido descrita por sistemáticos trabalhos. Entretanto, somente poucos estudos tem considerado a possível interação entre eles, no passo que um potente antioxidante pode aumentar ou diminuir a atividade na mistura de antioxidantes e muitos fenômenos são envolvidos nessas interações e é complexo e diversificado a mistura natural de compostos fenólicos em vários extratos de ervas (Zheng; Wang, 2001; Peyrat-Maillard; Cuvelier; Berset, 2003).

2.4 Conclusão

Somente orégano, seco industrialmente, apresentou o maior teor de compostos fenólicos e tomilho não apresentou diferença entre as amostras. Tomilho e orégano foram as ervas que apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos independentemente do processo de secagem. Todas as ervas secas em escala industrial apresentaram melhores resultados do que as ervas secas em escala laboratorial como explicado anteriormente.

Nos testes de estufa as ervas tomilho e orégano foram as que demonstraram maior atividade antioxidante nas concentrações de 1,25 e 5% (massa seca/massa

óleo), pois a 10% não se observa muita alteração nos valores de índice de peróxido . Ambas as ervas estudadas são alternativas promissoras como ingredientes antioxidantes nos alimentos.

Referências

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

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official and tentative methods**. 3th ed. Champaign, 2003.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile . **Food Chemistry**, Barking, v. 87, p. 27-36, 2005.

BAUER, A.K.; DWYER-NIELD, L.D; HANKIN, J.A; MURPHY, R.C ; MALKINSON, A.M.. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion -resistant C57BL/6 mice, **Toxicology**, Amsterdam, v. 169, p. 1-5, 2001.

BRACCO, U.; LOLIGER, J.; VIRET, J.I. Production and use of natural antioxidants, **Journal American Oil Chemistry Society**, Champaign, v.58, p.686-690, 1981.

CHANG, S.S.; OSTRICH-MATIJEVIC, B.; HSIEH, O.; HUANG, C.L. Natural antioxidant from rosemary and sage, **Journal of Food Science**, New York, v.42, p.1102-1106, 1977.

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

GRAMZA, A.; KORCZAK, J.. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. **Food Science and Technology**, Shinfield, v.16, p. 351-358, 2005.

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

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

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

JAYASINGHE, C.; GOTOH, N.; AOKI, T.; WADA, S. Phenolics Composition and Antioxidant Activity of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 51, p. 4442-4449, 2003.

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

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

MEHLENBACHER, V.C., **The analysis of fats and oils**. Champaign: Garrard Press, 1960.

PEYRAT-MAILLARD, M.N., CUVELIER, M.E. BERSET, C. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,22-Azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: synergistic and antagonistic effects. **Journal American Oil Chemistry Society**, Champaign, v. 80, p.1007-1012, 2003.

PIEIDADE, K.R. **Uso de ervas aromáticas na estabilidade oxidativa de filés de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) processados**. 2007. 159p. (Mestrado em Ciência e tecnologia de alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

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

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

SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação da capacidade antioxidante. **Química Nova**, Campinas, v. 22, p. 94-103, 1998.

SU, L.; YIN, J.J; CHARLES, D.; ZHOU, K.; MOORE, J.; LIANG, Y. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. **Food Chemistry**, Barking, v.100, p. 990-907, 2007.

VANHANEN, L. P.; SAVAGE, G. P. The use of peroxide value as a measure of quality for walnut flour stored at five different temperatures using three different types of packaging. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, p. 64-69, 2006.

WOISKY R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, New York, v. 32, p. 99-105, 1998.

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

3 DESEMPENHO DE MISTURAS BINÁRIAS DE ERVAS AROMÁTICAS NA ESTABILIDADE OXIDATIVA ADICIONADA A ÓLEO DE CASTANHA DO PARÁ

Resumo: Recentemente, o interesse na adição de aditivos em alimentos derivados de plantas tem aumentado, deste modo, o uso de ervas e seus extratos têm mostrado possuir propriedades tanto para a preservação da saúde como dos alimentos. No presente estudo, folhas secas de tomilho e orégano foram avaliadas quanto ao total de compostos fenólicos e atividade antioxidante de suas misturas, em concentrações variáveis entre 1 e 7%, através do índice de peróxido e medida espectrofotométrica entre 200 e 300 nm, seguindo um planejamento experimental durante a realização do Schaal Oven Test. Tomilho e orégano apresentaram 21,66 e 34,27 de equivalente s de ácido gálico em mg/g de erva, respectivamente. Todas as combinações realizadas apresentaram desempenhos satisfatórios revelando status oxidativo próximo ao da amostra de óleo inicial após 72 e 120 horas de estufa 60°C $\pm$ 2°C. Apesar da atividade antioxidante das ervas poder ser relacionada à presença dos composto s fenólicos poucos estudos têm considerado os efeitos da sua interação.

Palavra chave: Compostos fenólicos, Índice de peróxido, Schaal Oven Test.

Abstract: Recently, the interest in the additive addition in foods derived from plants has increased, in this way, the use of herbs and its extracts have shown in such a way to possess properties for the preservation of the health as of foods. In the present study, falling leaves of thyme and oregano had been evaluated how much to the total of phenolic composites and antioxidant activity of its mixtures, in changeable concentrations between 1 and 7%, through the index of peroxide and spectrophotometric measure between 200 and 300 nm, following an experimental planning during the accomplishment of the Schaal Oven Test. Thyme and oregano had presented 21,66 and 34,27 of equivalents of acid Gallic in mg/g of herbs, respectively. All the carried through combinations had presented satisfactory performances after disclosing to oxidative status next to the one to the initial oil sample 72 and 120 hours of greenhouse 60°C + 2°C. Although the antirust activity of the herbs to be able to be

related to the presence of phenolic composites few studies has considered the effect of its interaction.

Key Words: Phenolic, Peroxide value, Schaal Oven Test

3.1 Introdução

A autoxidação dos lipídios, que pode ser induzida pela luz, pela temperatura, pelo oxigênio e por alguns outros fatores, diminui significativamente a qualidade do alimento que contém lipídeos. Sabe-se também que o consumo de tal alimento está associado com o envelhecimento, as doenças de coração e o câncer; conseqüentemente, os antioxidantes são usados extensamente nos alimentos. Por causa da possível toxicidade de antioxidantes sintéticos, tais como o hidroxitolueno butilado (BHT) e hidroxianisol butilado (BHA), a busca para o desenvolvimento de substitutos naturais foi muito intensiva nos últimos 10 anos (HINNEBURG; DORMANA; HILTUNEN, 2005).

Os antioxidantes naturais podem ser tocoferóis, carotenóides, polifenóis, alguns ácidos orgânicos (ácido cítrico), fosfolipídeos, melanoidinas, entre outros. Esses podem ser encontrados e isolados de uma variedade de plantas. Os antioxidantes fenólicos são ácidos fenólicos incluindo ácidos clorogênico, isoclorogênico, p-cumárico, caféico, ferrúlico, vanílico, siríngico e p-hidroxibenzóico, presente em soja, algodão e amendoim. Há outros tipos de ácidos fenólicos presente em outros tipos de plantas. Os flavonóides e seus precursores estão presentes especialmente em folhas e frutas como glicosídeos e agliconas. Os tocoferóis e tocotrienóis estão presentes em cereais, sementes oleaginosas, nozes e vegetais como ervilhas, feijão e cenoura. As especiarias e ervas são importantes fontes de antioxidantes naturais como ácido rosmarínico, curcuminóide, carnosol, ácido carnósico e uma variedade de outros compostos (DUGAN, 1980; CUPPET; SCNEPF; HALL, 1996; SIX, 1994).

De acordo com seu modo de ação os antioxidantes podem ser classificados como terminadores de radicais livres, quelantes de íons metálicos, que são catalisadores da oxidação lipídica, ou como sequestradores de oxigênio, reagindo com o oxigênio em sistemas fechados (ZHENG; WANG, 2001).

Os antioxidantes são divididos em primários e secundários. Os antioxidantes primários interrompem a reação em cadeia, cedendo um radical de hidrogênio a um radical lipídico livre, de alta energia, convertendo-o em produtos termodinamicamente estáveis (CHIPAULT et al., 1952). Os antioxidantes secundários, também conhecidos como antioxidantes preventivos, agem pelo retardamento da velocidade da reação de iniciação, pela redução de hidroperóxido (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1992).

Certas especiarias e extratos de especiarias, usadas em diferentes pre parações culinárias para intensificar as características organolépticas, são excelentes fontes de compostos fenólicos que têm sido reportados por mostrarem boa atividade antioxidante (HINNEBURG; DORMANA; HILTUNEN, 2006). Os compostos fenólicos e os fenóis se incluem aos antioxidantes primários. Atuam bloqueando a ação de radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis por meio da doação de hidrogênio ou elétrons, além de atuarem nas reações com os radicais lipídicos, formando o complexo antioxidante-lipídico.

O extrato etanólico de tomilho foi analisado quanto a sua concentração em compostos fenólicos por Mata et al (2007) e o resultado encontrado foi de 113 mg de ácido gálico por grama de amostra.

Zheng e Wang (2001) determinaram a capacidade antioxidante e o total de compostos fenólicos de 27 ervas culinárias e 12 ervas medicinais. Entre as amostras analisadas estavam tomilho e orégano que respectivamente apresentaram 2,13 e 11,8 mg de ácido gálico por grama de amostra seca e seus resultados indicam que os compostos fenólicos tiveram maior contribuição para a capacidade antioxidante das ervas estudadas.

Su et al. (2007) encontraram resultados de 5,48 e 18,56 mg de ácido gálico por grama de amostra, respectivamente para orégano e camomila, dentre suas amostras analisadas.

Já Atoui et al. (2005) em suas amostras de orégano e salsa obtiveram resultados de 109 e 124 mg de ácido gálico por grama de amostra. Além dessas duas ervas também analisaram amostras de menta, camomila e eucalípto com respectivamente 106, 106 e 113 mg de ácido gálico por grama de amostra.

Katalinic et al. (2006) ao trabalharem com 70 amostras de plantas medicinais também mensuraram a concentração de compostos fenólicos pelo método Folin - Ciocalteu. Entre suas amostras analisaram a erva tomilho, encontrando 87,6 mg de ácido gálico por grama de amostra seca.

Jayasinghe et al. (2003) examinaram a atividade antioxidante de extratos metanólicos de orégano em diferentes modelos de sistemas in vitro. No extrato bruto foi identificada a concentração de compostos fenólicos entre 7,3 e 227,2 mg de ácido gálico por grama de amostra, nas diferentes frações analisadas.

Piedade (2007) encontrou 31,10 mg de ácido gálico por grama de amostra de orégano e 18,87 mg de ácido gálico por grama de amostra de tomilho. Resultados esses próximos ao encontrado. Já Dormana et al. (2003) encontraram concentrações de 149 mg de ácido gálico por grama de amostra de orégano e 95,6 mg de ácido gálico por grama de amostra de tomilho.

Através da identificação e quantificação feita por HPLC vê-se que orégano e tomilho têm alta quantidade de ácido rosmarínico e compostos de ácido hidroxicinâmico e ambos tem demonstrado forte poder antioxidante. A atividade do ácido rosmarínico é muito maior que -tocoferol e BHT (ZHENG; WANG, 2001)

3.2 Material e Método

3.2.1 Materiais

3.2.1.1 Ervas

Foram utilizadas as ervas tomilho, *Tymus vulgaris*, e orégano, *Origanum vulgare*, secas em escala industrial, doadas pela empresa CIA das Ervas, secas em estufas de circulação de ar a 60°C e irradiadas. As ervas foram caracterizadas quando ao teor de compostos fenólicos e umidade e foram mantidas ensacadas sob refrigeração até o início dos ensaios.

3.2.1.2 Óleo de castanha do Pará

O óleo de castanha foi fornecido pela empresa Ouro Verde, obtido de castanhas descascadas e prensadas a frio em prensa mecânica sem aquecimento prévio. O óleo foi armazenado sob refrigeração até o início dos ensaios.

3.3 Métodos

3.3.1 Teste de estufa (Schaal Oven Test)

Foi aplicado um planejamento experimental fatorial completo, do tipo composto rotacional central, envolvendo 2 variáveis independentes tomilho e orégano. Os níveis das variáveis independentes também foram definidos com base nos resultados do teste de seleção de ervas, compreendendo os pontos inferiores (-1), superiores (+1) e axiais ($+\alpha$ e $-\alpha$). O delineamento experimental aplicado é apresentado na Tabela 4. Os níveis foram definidos com base em resultados preliminares, visando a avaliação de contrastes e a interação entre as duas ervas. Após a definição dos extremos, foram previstas repetições no ponto central.

Tabela 5 - Delineamento experimental do planejamento fatorial completo do tipo 2^2 (valores codificados e valores reais) aplicado ao teste de estufa para seleção de antioxidante

<i>Ensaio</i>	<i>Variáveis independentes</i>			
	Tomilho (%)		Orégano (%)	
	<i>Valor codificado</i>	<i>Valor real</i>	<i>Valor codificado</i>	<i>Valor real</i>
1	-1	1	-1	3
2	-1	1	+1	9
3	+1	6	-1	3
4	+1	6	+1	9
5	-1,41	0	0	6
6	+1,41	7	0	6
7	0	3,5	-1,41	2
8	0	3,5	+1,41	9
9	0	3,5	0	6
10	0	3,5	0	6
11	0	3,5	0	6

As amostras foram mantidas em estufa ($60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante o período de 72 e 120 horas. As variáveis dependentes foram índice de peróxido e absortividade na faixa do UV.

3.3.2 Obtenção dos extratos e teor de compostos fenólicos

Foi pesado em tubo de ensaio 0,5g de erva e adicionado 10 mL de solução metanólica a 80%. Os tubos permaneceram em banho com ultrason durante 5 minutos para serem centrifugados durante 10 minutos sob velocidade de 3000rpm. O sobrenadante foi separado e assim realizado uma nova extração seguindo as mesmas etapas anteriores (RACANICCI et al, 2004). Desse extrato foi pipetado 0,5 mL da amostra em tubo de ensaio e acrescentado 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu diluído em água destilada a 1:10. Após 5 minutos de repouso, adicionou-se 2,0 mL de solução de Na_2CO_3 a 4%. Também foi necessário fazer um branco usando 0,5 mL de água destilada, Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio. Após 2 horas de repouso protegido da luz, as leituras foram realizadas em 740 nm, zerando o espectrofotômetro com o branco (WOISKY; SALATINO, 1998). Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico.

3.3.3 Umidade

Foi pesado em placa de Petri um grama de amostra das ervas tomilho e orégano, secas em escala industrial. Assim que foram pesadas foram colocadas em estufa por 12 horas com temperatura de $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para a realização da primeira pesagem, após essas 12 horas as placas com amostra voltavam para a estufa para permanência de 1 hora até que o peso se tornasse constante.

3.3.4 Índice de Peróxido

Segundo o método Cd 8b-90 (AOCS, 2003), foram pesados 3g da amostra em frasco de iodo de 125 mL. Adicionou-se 50 mL de solução de ácido acético/isooctano (3:1) e solução de iodeto de potássio saturada e água destilada. A seguir foi realizada

titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,1N e o volume gasto, após adição de goma de amido, forneceu a concentração em peróxidos em meq O₂/Kg de amostra através da fórmula:

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

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio

a = valor gasto na titulação

b = valor gasto na titulação do branco

3.3.5 Medida espectrofotométrica da absorbância entre 200 e 300 nm

Foi determinado espectrofotometricamente entre os comprimentos de onda de 200 e 300 nm no qual se quantificaram os dienos e os trienos conjugados, aldeídos e cetonas, conforme a recomendação do método II.d.22 (IUPAC, 1979).

3.4 Resultados

3.4.1 Compostos fenólicos e umidade

Foi encontrado no tomilho e no orégano 21,66 e 34,27 de equivalentes de ácido gálico em mg/g de erva, respectivamente, sendo a porcentagem de umidade 8,7 % $\pm$ 0,13 para o orégano e 11,86% $\pm$ 0,23 para o tomilho.

Para a amostra de tomilho a concentração de compostos fenólicos encontrada foi menor do que a encontrada nos estudos de Mata et al. (2007) e Katalinic et al. (2006). Porém a concentração foi maior do que a encontrada nos estudos de Zheng e Wang (2001) e Piedade (2007).

Já a concentração de compostos fenólicos encontrada na amostra de orégano foi maior que a encontrada nos estudos de Piedade (2007), Sue t al. (2007) e Zheng e Wang (2001) e menor que os estudos de Atoui et al. (2005) e Jayasinghe et al. (2003).

3.4.2 Schaal Oven Test

No primeiro ensaio, com a aplicação do planejamento experimental, a amostra de óleo de castanha do Pará apresentou peróxido de 8,9 meq/Kg e ao final de 72 horas de estufa, peróxido de 32,51 meq/Kg.

Tomando por base esses dois valores pode-se observar que todos os tratamentos foram efetivos no controle do mecanismo de autooxidação do óleo (figura 12), pois o tratamento que apresentou o maior índice de peróxido, 14,66 meq/Kg, foi o tratamento tomilho 0% e orégano 6% e esse valor apresentado está mais próximo ao valor de peróxido da amostra inicial do que da amostra oxidada final, considerando que o valor do índice de peróxido inicial do óleo utilizado nesse ensaio já estava elevado, o que poderia levar a uma autooxidação mais acelerada, como observa-se no tratamento controle.

Nesse caso, o tratamento que apresentou o menor valor de índice de peróxido, 10,61 meq/Kg, foi tomilho 6% e orégano 3%, também um valor bem aproximado do peróxido da amostra inicial.

Diferentes tipos de antioxidantes estão presentes naturalmente nas ervas em diferentes combinações e a interação dessas combinações são importantes para o resultado do efeito antioxidante final (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

Todos os tratamentos utilizados tiveram fatores de proteção à oxidação em comparação com a amostra final oxidada maior que 60%, indicando que há um efeito sinérgico entre os compostos fenólicos existente nas duas ervas estudadas.

Almeida-Doria (1999) ao misturar os extratos etanólicos de orégano (1000mg/Kg), alecrim (500mg/Kg) obteve um resultado sinérgico onde a mistura dos

extratos poderiam ser utilizados como antioxidantes naturais, apresentando a mesma eficiência em retardar a oxidação dos óleos que a mistura de antioxidantes sintéticos BHA+BHT, podendo assim substituí-los.

Figura 12 - Índices de peróxido (meq O₂/kg) obtidos no teste em estufa após 72 horas com temperatura de 60°C ± 2°C com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha (planejamento experimental fatorial completo - 2²)

Analisando os resultados obtidos pela medida espectrofotométrica da absorbância entre 200 e 300 nm (figura 13) também se pode observar que todos os tratamentos foram efetivos no controle da formação de dienos e tri enos conjugados, ou seja, compostos secundários da oxidação.

Todos os tratamentos apresentaram em 232 nm valores de absortividade entre 5 e 6 E^{1%}_{1cm}, mostrando que nenhum tratamento se destacou, pois, esses valores estão

próximos dos valores encontrados na amostra inicial, absorvância de $4,42 \text{ E } 1\%_{1\text{cm}}$, e abaixo do valor da amostra oxidada final, absorvância $7,51 \text{ E } 1\%_{1\text{cm}}$. Deste modo todos os tratamentos apresentaram em média 30% de proteção a oxidação em relação a amostra de óleo final oxidada.

Figura 13 - Medida espectrofotométrica da absorvância entre 200 e 300 nm obtida no teste em estufa após 72 horas com temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha (planejamento experimental fatorial completo - 2^2)

Seguindo o mesmo planejamento experimental, foi realizado um segundo ensaio, mas com um novo óleo de castanha, cujo índice de peróxido era de $2,43 \text{ meq/Kg}$. Com esse novo óleo foram realizados dois ensaios, um com 72 horas e outro com 120 horas de estufa a temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Como esperado, os resultados encontrados nesse ensaio foram mais baixos e com menor variação do que os encontrados no ensaio anterior, apesar de realizados sob a mesma condição de temperatura e tratamentos, o valor do índice de peróxido da amostra inicial, nesse caso, era mais baixo.

Todos os tratamentos mostraram enorme efetividade no controle da autoxidação, pois o maior índice de peróxido encontrado foi de 3,4 meq/Kg, sendo a amostra inicial 2,43 meq/Kg e a oxidada, final, 16,2 meq/Kg (figura 14).

As combinações de ervas utilizadas nesse ensaio apresentaram maiores fatores de proteção de oxidação em relação a amostra final oxidada, valores que variaram entre 80 e 91%, mostrando que quanto melhor a qualidade do óleo melhor será a ação do antioxidante utilizado.

Figura 14 - Índices de peróxido (meq O₂/kg) obtidos no teste em estufa após 72 horas com temperatura de 60°C ± 2°C com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha (planejamento experimental fatorial completo - 2²)

O mesmo resultado foi observado na medida espectrofotométrica entre 200 e 300 nm, pois ao analisar o gráfico de varredura se vê que em 232 nm todos os tratamentos utilizados se encontram muito próximos à amostra inicial (figura 15).

Por esse mesmo motivo pode-se afirmar que todos os tratamentos tiveram bom desempenho em assegurar a estabilidade oxidativa do óleo de castanha do Pará, apresentando em média fatores de proteção a oxidação 40%.

Para que se pudesse ter amostras mais oxidadas e que poderiam resultar em dados discriminativos foi realizado o terceiro ensaio, com a mesma qualidade do óleo, mesmas condições de temperaturas, porém, com 120 horas de estufa.

Figura 15 - Medida espectrofotométrica da absorvância entre 200 e 300 nm obtida no teste em estufa após 72 horas com temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha (planejamento experimental fatorial completo - 2^2)

Nesse último ensaio a amostra inicial tinha o mesmo índice de peróxido do ensaio anterior 2,43 meq/Kg e ao final das 120 horas em estufa 24,22 meq/Kg.

Entre os tratamentos estudados o índice de peróxido das amostras variaram entre 3,4 meq/Kg, tomilho 6% e orégano 9%, e 5,6 meq/Kg, tomilho 3,5% e orégano 2%, indicando mais uma vez que todos os tratamentos foram eficientes no controle da autoxidação do óleo de castanha do Pará como mostra a figura 16.

Figura 16 - Índices de peróxido (meq O₂/kg) obtidos no teste em estufa após 120 horas com temperatura de 60°C $\pm$ 2°C com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha (planejamento experimental fatorial completo - 2²)

Como se pode observar na figura 17 de absorvidade entre 200 e 300 nm os resultados são semelhantes aos encontrados no índice de peróxido, pois todos os tratamentos foram efetivos no controle da oxidação lipídica do óleo de castanha do Pará.

Os resultados variaram entre $2,8 E^{1\%}_{1cm}$, tomilho 3,5% e orégano 10%, e $4,3 E^{1\%}_{1cm}$, tomilho 3,5% e orégano 2%, originando uma curva muito semelhante o da amostra inicial e apresentando em média 50% de proteção a oxidação e m relação a amostra final oxidada. A amostra inicial em 232 nm teve uma absorvidade de $2,4 E^{1\%}_{1cm}$ e ao final de 120 horas de estufa $5,9 E^{1\%}_{1cm}$

Figura 17 - Medida espectrofotométrica da absorbância entre 200 e 300 nm obtida no teste em estufa após 120 horas com temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha (planejamento experimental fatorial completo - 2^2)

A atividade antioxidante de alguns compostos fenólicos tem sido descrita por sistemáticos trabalhos, entretanto, somente poucos estudos têm considerado a possível interação entre eles, ao passo que um potente antioxidante pode aumentar ou diminuir a atividade na mistura de antioxidantes e muitos fenômenos são envolvidos nessas interações, nesse caso, observa-se um efeito sinérgico (ZHENG; WANG, 2001; PEYRAT-MAILLARD; CUVELIER; BERSSET, 2003).

Dormana et al. (2003) estudaram as propriedades antioxidantes de extratos aquosos de quatro ervas geralmente consumidas, pertencentes à família das

Labiaceae, sendo orégano, alecrim, sálvia e tomilho. Vários modelos experimentais foram usados para a caracterização da atividade, incluindo a capacidade de redução do ferro, DPPH e ABTS. Os extratos mostraram variados graus de capacidade seqüestrante de radicais. As características antioxidantes observadas não foram relacionadas aos teores de fenólicos dos extratos.

É complexo e diversificado a mistura natural de compostos fenólicos em vários extratos de ervas (ZHENG; WANG, 2001), entretanto foi positiva a correlação entre a quantidade de compostos fenólicos encontrado e a capacidade antioxidante, o que afirma que as ervas são efetivamente antioxidantes naturais.

3.5 Conclusão

Todas as combinações realizadas apresentaram desempenhos satisfatórios revelando status oxidativo próximo ao da a mostra de óleo inicial após 72 e 120 horas de estufa $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Apesar de a atividade antioxidante das ervas poder ser relacionada à presença dos compostos fenólicos poucos estudos têm considerado os efeitos da sua interação.

Referências

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. 71p. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official and tentative methods**. 3th ed. Champaign, 2003.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, Barking, v. 87, p. 27-36, 2005.

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

CHIPAULT, J.R.; MIZUNO, G.R.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, Champaign, v. 17, p. 47-55, 1952.

CUPPETT, S.; SCNEPF, M.; HALL III, C. Natural antioxidant – Are they a reality? In: SHAHIDI, F. (Ed.) **Natural antioxidants**: chemistry, health effects and applications. Champaign: AOCS Press, 1996. chap 2, p. 13-24.

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

DUGAN, L.R. Natural antioxidant. **Autoxidation in food and biological systems**. New York: Plenum Press, 1980, p.261 -281.

HINNEBURG, I.; DORMANA, D.H.J.; HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, Barking, v.97, p. 122-129, 2005.

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

JAYASINGHE, C.; GOTOH, N.; AOKI, T.; WADA, S. Phenolics Composition and Antioxidant Activity of Sweet Basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 51, p. 4442-4449, 2003.

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

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

PEYRAT-MAILLARD, M.N.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in 2,2 -Azobis (2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH) - Induced Oxidation: Synergistic and Antagonistic Effects. **Journal American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 80, p.1007-1012, 2003.

PIEIDADE, K.R. **Uso de ervas aromáticas na estabilidade oxidativa de filés de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) processados** . 2007. 159p. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007 .

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

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 biotechnology** . Nova York: Marcel Dekker, 1992. p.377-396.

SIX, P. Current research in natural food antioxidants. **Inform**. Champaign, v.5, n.6, p. 679-687, 1994.

SU, L.; YIN, J.J.; CHARLES, D.; ZHOU, K.; MOORE, J.; LIANGLI, Y. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. **Food Chemistry**, Barking, v.100, p. 990-907, 2007.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, New York, v.32, n.2, p.99-105, 1998

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

4 ESTUDO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA EM TEMPERATURA AMBIENTE DO ÓLEO EXTRA-VIRGEM DE CASTANHA DO PARÁ COM ERVAS AROMÁTICAS ANTIOXIDANTE

Resumo: A peroxidação lipídica é bem conhecida por ser a maior causa da deterioração oxidativa durante o processo e o armazenamento de alimentos, podendo levar a uma diminuição da qualidade nutricional e a produção de substâncias potencialmente tóxicas. Os compostos fenólicos são substâncias naturalmente encontradas em frutas, vegetais e ervas. Muitos estudos têm indicado uma correlação entre a quantidade total de fenólicos e a atividade antioxidante, podendo assim, serem substitutos naturais dos aditivos sintéticos normalmente utilizados no processamento de alimentos. Esse presente trabalho teve como objetivo estudar a estabilidade oxidativa do óleo de castanha do Pará, adicionado de ervas aromáticas, caracterizadas quanto ao teor de compostos fenólicos e umidade, como antioxidantes naturais, armazenado sob temperatura ambiente em condições normais de comercialização por seis meses. As variáveis estudadas foram índice de iodo, índice de peróxido, índice de acidez, absorvibilidade no UV entre 200 e 300nm, Rancimat e composição em ácidos graxos.

Palavras-chave: Estabilidade oxidativa, Compostos fenólicos, Óleo de castanha do Pará

Abstract: The lipid oxidation well is known by being the biggest cause of oxidative deterioration during the process and the food storage, having been able to take to a reduction of the nutritional quality and the potentially toxic substance production. The phenolic composites are substances of course found in fruits, vegetables and herbs. Many studies have indicated a correlation enter the total amount of phenolic and the antirust activity, thus being able, to be substitute natural of synthetic additives normally used in the food processing. This work had as object ive to study the oxidative stability of Brazil nut crude oil, added of herbs, characterized how much to the text of phenolic composites and humidity, aromatic as anti oxidant, stored under ambient temperature in normal conditions of commercialization for si x months. The studied variable had been

index of iodine, peroxide index, acid value, absorptivity in the UV between 200 and 300nm, oxidation stability and fatty acids composition.

Key Words: Oxidation Stability, Phenolic, Brazil nut oil

4.1 Introdução

A oxidação lipídica pode afetar o valor nutricional, a qualidade sensorial e o *shelf-life* de alimentos. Com altas concentrações de duplas ligações insaturadas, o óleo tem maior instabilidade e conseqüentemente maior susceptibilidade para oxidação. A relação da velocidade de oxidação para os ácidos esteárico, oléico, linoléico e linolênico são 1, 100, 1.200 e 2.500, respectivamente. A estimada relação da velocidade de oxidação para ácido araquidônico, ácido docosapentaenóico e ácido docosahexaenóico é cerca de 3.600, 4.800 e 6.000 baseado no número de grupos metilênicos separados por duplas ligações (FRANKEL, 1993).

A estabilidade oxidativa pode ser determinada pela mensuração do período de indução, índice de peróxido, dienos e trienos conjugados e voláteis. A fase inicial da oxidação é chamada de período de indução. A oxidação ocorre com uma velocidade uniforme durante o período de indução, passando a uma escala próxima à logarítmica no período pós-indução. Antioxidantes têm sido adicionados em óleos na tentativa de prolongar o período de indução e assim diminuir a velocidade de instalação da deterioração oxidativa. O período de indução pode ser usado como uma medida da estabilidade oxidativa de óleos como um bom índice comparativo da efetiva proteção antioxidante (SHAHIDI; WANASUNDARA, 1998).

Antioxidantes sintéticos são normalmente utilizados nas indústrias de óleos e de alimentos lipídicos. Entretanto, estes compostos podem apresentar alguns inconvenientes; estudos têm demonstrado que essas substâncias podem causar efeitos adversos em animais, como por exemplo, hemorragia massiva nas cavidades pleurais e peritoneais ou extensa proliferação de células no pulmão, com mudanças bioquímicas, atuando como agente promotor no desenvolvimento de adenoma (WITSCHI; LOCK, 1978; WHYSNER et al., 1993; BAUER et al., 2001; THOMPSON et al., 2001).

Dentro desse cenário, nos últimos anos tem sido dada ênfase à pesquisa de possíveis antioxidantes presentes em produtos naturais, com destaque para as especiarias, mundialmente utilizadas para fins culinários. A atividade antioxidante das especiarias e de seus extratos é atribuída aos compostos fenólicos que também podem atuar como seqüestrantes de radicais livres no organismo reduzindo os riscos de doenças crônicas (GUERRA; LAJOLO, 2005).

Zheng e Wang (2001) determinaram a capacidade antioxidante e o total de compostos fenólicos de 27 ervas culinárias e 12 ervas medicinais. Entre as amostras analisadas estavam tomilho e orégano que respectivamente apresentaram 2,13 e 11,8 mg de ácido gálico por grama de amostra seca e seus resultados indicaram que os compostos fenólicos tiveram maior contribuição para a capacidade antioxidante das ervas estudadas, apesar desses resultados serem muito inferiores aos encontrados nas amostras desse estudo.

Através da identificação e quantificação feita por HPLC, observa-se que orégano e tomilho têm alta quantidade de ácido rosmarínico e de compostos de ácido hidroxicinâmico, ambos com forte poder antioxidante. A atividade do ácido rosmarínico é muito maior que α -tocoferol e BHT (ZHENG; WANG, 2001)

Antioxidantes podem prevenir os processos de oxidação causados pelos radicais livres e por espécies reativas de oxigênio em alimentos e em sistemas biológicos. Certas especiarias e seus extratos, usados em diferentes preparações culinárias para intensificar as características organolépticas, são excelentes fontes de compostos fenólicos associados com boa atividade antioxidante (HINNEBURG; DORMANA; HILTUNEN, 2006). Os compostos fenólicos e os fenóis se incluem na categoria dos antioxidantes primários, bloqueando a ação de radicais livres, convertendo-os em produtos estáveis por meio da doação de hidrogênio ou elétrons, além de atuarem nas reações com os radicais lipídicos, formando o complexo antioxidante-lipídico (NAWAR, 1985).

Piedade (2007) estimou as concentrações de orégano e tomilho e encontrou resultados semelhantes a esse trabalho, porém, Dormana et al. (2003) encontraram

concentrações de 149 mg de ácido gálico por grama de orégano e 95,6 mg de ácido gálico por grama de tomilho.

Su et al. (2007) encontraram resultados de 5,48 e 18,56 mg de ácido gálico por grama, respectivamente, para orégano e camomila. Já Atoui et al. (2005) em suas amostras de orégano e salsa obtiveram resultados de 109 e 124 mg de ácido gálico por grama de amostra. Além dessas duas ervas também analisaram amostras de menta, camomila e eucalipto com respectivamente 106, 106 e 113 mg de ácido gálico por grama de amostra.

Katalinic et al. (2006) ao trabalharem com 70 amostras de plantas medicinais analisaram a erva tomilho, encontrando 87,6 mg de ácido gálico por grama de amostra seca.

Jayasinghe et al. (2003) examinaram a atividade antioxidante de extratos metanólicos de orégano em diferentes modelos de sistemas in vitro. No extrato bruto foi identificada a concentração de 7,3 e 227,2 mg de ácido gálico por grama nas diferentes frações analisadas.

Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo o emprego das especiarias orégano e tomilho como antioxidantes naturais para a conservação das qualidades organolépticas do óleo de castanha do Pará em armazenamento à temperatura ambiente.

4.2 Material e método

4.2.1 Materiais

4.2.1.1 Ervas

Foram utilizadas as ervas tomilho, *Tymus vulgaris*, e orégano, *Origanum vulgare*, industrializadas, doadas pela empresa CIA das Ervas, secas em estufas de circulação de ar a 60°C e irradiadas. As ervas foram classificadas quanto a sua composição em compostos fenólicos e umidade.

4.2.1.2 Óleo de castanha do Pará

O óleo de castanha foi fornecido pela empresa Ouro Verde, obtido de castanhas descascadas e prensadas a frio em prensa mecânica sem aquecimento prévio. O óleo foi armazenado sob refrigeração até o início dos ensaios.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Armazenamento em condições normais de temperatura e luminosidade

Uma combinação das ervas (tomilho 0,5% e orégano 0,5%), definidas em ensaios preliminares, além das concentrações isoladas de tomilho (1%) e orégano (0,5%) foram adicionadas ao óleo, sendo mantida a amostra sem adição de ervas, como controle. As amostras foram envasadas em frascos de vidro (200 mL), fechados com tampas metálicas rosqueáveis, e armazenadas durante um período de 6 meses. A cada 30 dias, três amostras de cada tratamento foram analisadas quanto à medida espectrofotométrica entre 200 e 300 nm, índice de peróxido, acidez e iodo. A estabilidade oxidativa no Rancimat foram determinadas no tempo inicial, após 60, 90 e 180 dias de armazenamento. Isto foi feito também para perfil de ácidos graxos. A iluminação da sala onde as garrafas de vidro foram armazenadas aconteceu com lâmpadas fluorescentes, mantidas acesas de forma intermitente (12 horas de claro e 12 horas de escuro).

O ensaio foi conduzido em triplicata no esquema fatorial, modelo inteiramente casualizado, considerando os fatores “ervas” e período de amostragem. Foi realizada análise de variância e aplicado teste de Tukey para médias do fator antioxidante, médias do fator período de amostragem e para médias da interação entre antioxidante e período de amostragem, ao nível de significância de 5 %. Foi utilizado o programa de análise estatística SAS.

4.2.2.2 Schaal Oven Test

As mesmas concentrações das ervas utilizadas no ensaio a temperatura ambiente foram utilizadas para a realização do teste de estufa. As amostras foram

mantidas em estufa ($60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante o período de 120 horas. As variáveis dependentes foram índice de peróxido e absorvidade na faixa do UV.

4.2.2.3 Teor de Compostos Fenólicos

Foi realizada a extração dos compostos fenólicos conforme Racanicci et al. (2004). Foi pesado 0,5g de erva em tubo de ensaio e adicionado 10 mL de solução metanólica a 80%. Os tubos permaneceram em banho com ultrassom durante 5 minutos antes de serem centrifugados durante 10 minutos sob velocidade de 3000 rpm. O sobrenadante foi separado e assim realizado uma nova extração conforme as mesmas etapas anteriores. Desse extrato foi pipetado 0,5 mL da amostra em tubo de ensaio e acrescentado 2,5 mL da solução de Folin-Ciocalteu diluído em água destilada a 1:10. Após 5 minutos de repouso, foi adicionado 2,0 mL de solução de Na_2CO_3 a 4%. Também foi necessário fazer um branco usando 0,5 mL de água destilada, Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio. Após 2 horas de repouso protegido da luz, as leituras foram realizadas em 740 nm, zerando o espectrofotômetro com a amostra controle (WOISKY; SALATINO, 1998). O resultado foi expresso em equivalentes de ácido gálico.

4.2.2.4 Umidade

Foi pesado em placa de Petri um grama de amostra das duas ervas, tomilho e orégano, secas em escala industrial. Após 12 horas de estufa a $100^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, realizou-se a primeira pesagem, e assim sucessivamente até que o peso se tornasse constante.

4.2.2.5 Índice de Peróxido

Segundo o método Cd 8b-90 (AOCS, 2003), foram pesados 3g da amostra em frasco de iodo de 125 mL. Foram adicionados 50 mL de solução de ácido acético/isooctano (3:1) e 0,5 mL solução de iodeto de potássio saturada e água destilada. Foi realizada uma titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,01 N e o

volume gasto, após adição de goma de amido, forneceu a concentração em peróxidos em meq O₂/Kg de amostra através da fórmula:

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

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio

a = valor gasto na titulação

b = valor gasto na titulação da testemunha

4.2.2.6 Acidez

Segundo o método Cd 3d-63 (AOCS, 2003), foi conduzido com a dissolução de 5g de amostra de óleo em álcool etílico a quente (60 – 65°C) e posterior titulação com solução de hidróxido de sódio padronizada. O ponto de viragem foi verificado com a adição do indicador fenolftaleína e o resultado obtido através da fórmula:

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

N = normalidade da solução de hidróxido de sódio

V = volume gasto na titulação da amostra

4.2.2.7 Medida espectrofotométrica da absorbância entre 200 e 300 nm

Foi determinado espectrofotometricamente entre os comprimentos de onda de 200 e 300 nm no qual se quantificaram os dienos e os trienos conjugados, aldeídos e cetonas, conforme a recomendação do método II.d.22 (IUPAC, 1979).

4.2.2.8 Índice de Iodo

Segundo o método Cd 1d – 92 (AOCS, 2003), foi pesado 0,2g de amostra em frasco para determinação iodométrica de 500 mL. Foram acrescentados 15 mL de ciclohexano:ácido acético 1:1 e 25 mL de solução de Wijs e colocados no escuro por 30 minutos. Após esses 30 minutos foram adicionados 20 mL de KI 10% e 100 mL de água destilada para a titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,1N padronizada, utilizando goma de amido como indicador. Foi conduzida uma determinação testemunha. O resultado foi determinado pela fórmula:

$$\text{Índice de Iodo (mg/100mg)} = \frac{(B-A) \times 12,69 \times N}{\text{Massa da amostra (g)}} \times 100$$

B = mL de solução de tiosulfato de sódio gastos com a testemunha

A = mL de solução de tiosulfato de sódio gastos com a amostra

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio

4.2.2.9 Composição em ácidos graxos

As amostras foram metiladas segundo o método Hartman e Lago (1973) para análise em cromatógrafo a gás HP 5890 com detector FID, coluna DB23 de 60 m x 0,25 mm x 0,25 µm o gás de arraste utilizado foi Hélio a uma vazão de 1,5 mL/minuto com temperatura entre 130 - 260°C. Os padrões utilizados foram Supelco Part número 18919 Mix C4-C24.

4.2.2.10 Estabilidade oxidativa

Uma amostra de 5g de óleo foi submetida a aquecimento a uma temperatura de 110°C, $t = 1^\circ\text{C}$, sob um fluxo de ar seco de 9L/h em tubo inserido no aparelho Rancimat (Metrohm AG, CH-9100 Herisau Switzerland). As leituras de condutividade crescente em função do acúmulo de compostos de quebra dos ácidos graxos

compuseram a curva que traçada em função do tempo de reação permitiu o cálculo do período de indução (PI). Um controle também foi preparado com óleo extra-virgem de castanha do Pará sem antioxidante. Os resultados foram expressos em porcentagem de aumento do período de indução em relação ao controle.

4.3 Resultados

4.3.1 Compostos fenólicos e umidade

Substâncias fenólicas derivadas de plantas têm-se mostrado responsáveis por atividades antioxidantes, desse modo, o total de compostos fenólicos das ervas tomilho e orégano foi determinado e expresso em equivalentes de ácido gálico em mg/g de erva. Foram encontrados no tomilho e no orégano 21,66 e 34,27 de equivalentes de ácido gálico em mg/g de erva, respectivamente, sendo a porcentagem de umidade $8,7\% \pm 0,13$ para o orégano e $11,86\% \pm 0,23$ para o tomilho.

4.3.2 Schaal Oven Test

O teste de estufa foi realizado com as mesmas concentrações utilizadas no ensaio em temperatura ambiente com o objetivo de prever os resultados e permitir uma correlação entre teste de estufa e armazenamento em temperatura ambiente. Como apresentado na figura 18, os três tratamentos utilizados foram eficazes na estabilidade oxidativa do óleo de castanha do Pará, baseada no resultado do índice de peróxido, pois os resultados obtidos foram inferiores aos da amostra controle, sem adição de antioxidantes. O tratamento que se mostrou com menor eficácia foi orégano 0,5%, apresentando 20% de proteção à oxidação em relação à amostra de óleo final oxidada. Os tratamentos tomilho 1% e mistura (tomilho 0,5% e orégano 0,5%) tiveram resultados mais satisfatórios do que o tratamento orégano 0,5%, apresentando respectivamente 61,2 e 56,6% de proteção.

Figura 18 - Índices de peróxido (meq O₂/kg) obtidos no teste em estufa após 120 horas com temperatura de 60°C $\pm$ 2°C com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha

Os mesmos resultados foram encontrados quando analisada a medida espectrofotométrica entre 200 e 300nm, permitindo uma boa correlação entre os resultados obtidos em ambas as análises. Os tratamentos analisados apresentaram uma curva de absorvidade abaixo da curva da amostra controle, destacando como melhores tratamentos as curvas de tomilho 1% e mistura, com semelhante resultado. As curvas estão representadas na figura 19.

A partir desses resultados encontrados no teste acelerado de estufa espera-se que no ensaio em temperatura ambiente esse comportamento fosse confirmado. Como o teste de estufa foi realizado em 120 horas, 5 dias, espera-se que esses resultados pudessem ser os mesmos encontrados até o quinto mês de armazenamento em temperatura ambiente.

Figura 19 - Medida espectrofotométrica da absorvância entre 200 e 300 nm obtida no teste em estufa após 120 horas com temperatura de $60^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ com adição de tomilho e orégano em óleo de castanha do Pará

4.3.3 Ensaio em temperatura ambiente

O índice de acidez é um método que quantifica os ácidos graxos livres que existem na amostra. Aplica-se a todo óleo bruto e refinado, além de gorduras de animais. Os ácidos graxos livres são freqüentemente expressos em termos de % de ácido graxo livre (AOCS, 2003).

A análise estatística dos resultados de índice de acidez dos óleos armazenados à temperatura ambiente constatou que não houve diferença significativa entre os tratamentos estudados, com e sem adição de ervas como antioxidantes. Através da figura 20 pode-se observar que o comportamento dos tratamentos até o terceiro mês não diferiu entre si, após o terceiro mês os tratamentos estudados começaram a

apresentar um mesmo comportamento. O índice de acidez inicial foi em média 0,24 mg KOH/g chegando ao final do sexto mês com 0,39 mg KOH/g em média. Isso era esperado, pois o vidro é uma embalagem que não permite a troca de vapor de água com o ambiente, protegendo o óleo da hidrólise. Embalagens PET já não têm a mesma eficiência como se verá a partir dos resultados relatados a seguir.

Figura 20 - Índice de acidez (mg KOH/g) dos óleos de castanha do Pará armazenados à temperatura ambiente durante 6 meses com adição das ervas tomilho, orégano e mistura

Gutierrez (1995) ao armazenar óleo de castanha do Pará em temperatura ambiente em vidro âmbar também não encontrou diferença significativa entre os seus tratamentos com e sem adição de antioxidantes sintéticos. Porém seus valores foram maiores, pois variaram de 2,4 mg KOH/g a 5,8 mg KOH/g em média.

Siqueira (1998) analisou óleos de soja, milho e canola em temperatura ambiente durante 6 meses em garrafas PET e encontrou diferenças significativas entre os tratamentos estudados. O óleo de soja foi o que apresentou os maiores resultados, chegando a 0,42 mg KOH/g e o óleo de milho apresentou as menores variações ao decorrer dos meses.

Oliveira (2003) armazenou óleo de milho e canola em temperatura ambiente com diferentes concentrações de TBHQ em frascos PET e não encontrou diferença significativa entre os tratamentos estudados quando analisado o índice de acidez, porém os resultados já foram menores apresentando em média 0,11 e 0,12 mg KOH/g.

Segundo a Resolução RDC 270, de 22 de setembro de 2005, que aprovou o regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal, o índice de acidez máximo permitido para um óleo vegetal prensado a frio e não refinado é de 4 mg KOH/g (BRASIL, 2005). Deste modo todos tratamentos estão dentro dos parâmetros para índice de acidez para serem comercializados.

O índice de peróxido é um indicador muito sensível no estágio inicial da oxidação, e sua presença é indício de que a deterioração do sabor e odor, está por acontecer. Quando sua concentração atinge certo nível, mudanças complexas ocorrem, formando compostos de baixo peso molecular, oriundos de sua degradação.

Na análise estatística observou-se que houve diferença quando analisados os tratamentos com o tempo de armazenamento. Em relação aos tratamentos, através do teste de Tukey a 5% de significância o tratamento controle, ou seja, ausência de ervas foi o que apresentou diferença significativa e o melhor resultado, indicando assim que a adição de ervas como antioxidantes no armazenamento em temperatura ambiente não teve a ação esperada. O coeficiente de variação para os tratamentos foi de 0,83280%.

Em relação ao tempo de armazenamento observou-se que a partir do segundo mês as amostras já apresentam resultados com diferenças significativas entre os valores de índice de peróxido. O coeficiente de variação foi de 1,27091%.

O índice de peróxido inicial foi de 5,92 meq O₂/Kg, chegando ao final dos seis meses de armazenamento com 13 meq O₂/Kg, em média, para o tratamento tomilho, sendo este o que apresentou o resultado mais elevado. As amostras do controle, que

apresentaram os melhores resultados, ao final dos seis meses apresentaram em média 8,7 meq O₂/kg (figura 21).

Figura 21 - Índices de peróxido (meq O₂/Kg) de óleos de castanha do Pará armazenados à temperatura ambiente durante 6 meses com adição das ervas tomilho, orégano e mistura

Segundo a resolução RDC 270 de 22 de setembro de 2005, o limite máximo para óleos vegetais prensados a frio e sem refino é de 15 meq O₂/kg, deste modo, todos os tratamentos ao final de 6 meses apresentaram resultados satisfatórios de comercialização e consumo (BRASIL, 2005).

Gutierrez (1995), no armazenamento sob temperatura ambiente de óleo de castanha do Pará, encontrou diferenças nos índices de peróxido a partir do primeiro mês de armazenamento, encontrando também variação em relação ao tempo e ao tratamento. O tratamento com antioxidante BHT a 0,01% apresentou resultados mais

elevados do que o tratamento controle chegando à conclusão de que a adição de antioxidante, neste caso BHT, produziu pouco efeito nesse período de 6 meses.

Siqueira (1998) não encontrou nenhuma diferença estatística significativa durante os 6 meses de armazenamento sob temperatura ambiente de óleo de canola, milho e soja com adição de BHT, BHA e ácido cítrico. Isso demonstrou que a adição de antioxidante não apresentou efeito em controle de oxidação lipídica. Porém, todos os tratamentos avaliados apresentaram resultados abaixo do limite máximo permitido pela legislação vigente.

Almeida-Doria (1999) armazenou óleo de soja por 6 meses com a adição de antioxidante TBHQ e extratos etanólicos de orégano e alecrim e encontrou variações em relação ao tempo de armazenamento e em relação aos tratamentos. Os melhores resultados foram encontrados nos tratamentos com o antioxidante sintético TBHQ e os extratos de orégano e alecrim não diferiram do tratamento controle.

Já Oliveira (2003) encontrou diferenças estatísticas no armazenamento em temperatura ambiente de óleo de milho adicionado de diferentes doses de TBHQ e armazenamento em frascos de PET. Neste caso os tratamentos com diferentes doses de TBHQ tiveram os melhores resultados quando comparados ao tratamento controle.

O exame espectrofotométrico na faixa do ultravioleta indica a qualidade de uma substância graxa podendo prover informações sobre a qualidade do óleo, seu estado de preservação e refletir as modificações provocadas pelos processos tecnológicos, pois os produtos da autooxidação de óleos e gorduras exibem espectros característicos (IUPAC, 1979; AOCS, 2003).

Na análise estatística não foi encontrada nenhuma diferença significativa ao nível de 5% quando comparados os tratamentos, ou seja, a adição ou não de ervas como antioxidantes não alterou o resultado de absorvidade em 232 nm, apresentando um coeficiente de variação de 0,53571%. Já em relação ao tempo de armazenamento foi encontrada uma diferença significativa somente no último mês em comparação aos meses anteriores, coeficiente de variação foi de 0,81754%.

Analisando a figura 22, de uma forma geral todos os tratamentos tiveram um mesmo comportamento durante os 6 meses de armazenamento sob temperatura ambiente e a diferença nos resultados entre os tratamentos realmente foi muito

pequena. Os resultados variaram entre 2,777 $E1\%_{1cm}$, inicial e 3,13 $E1\%_{1cm}$ ao final dos 6 meses com o tratamento tomilho.

Figura 22 - Absortividade específica em 232 nm em óleo de castanha do Pará armazenado à temperatura ambiente durante 6 meses com adição das ervas tomilho, orégano e mistura

Já Oliveira (2003) encontrou diferenças significativas a partir do quinto mês de armazenamento de óleo de milho e canola com a adição de TBHQ, sendo o melhor resultado apresentado pelo tratamento com 200 mg/Kg de TBHQ. Porém, a variação dos resultados esteve muito próxima da encontrada na presente pesquisa o que permite concluir que o óleo de castanha está se apresentando mais estável por ser um óleo prensado a frio e sem refino e já os óleos utilizados foram óleos refinados.

Almeida-Doria (1999) também encontrou diferenças significativas nos resultados de 232 nm a partir do quinto mês de armazenamento, porém não encontrou

diferença entre os tratamentos, ou seja, a adição de antioxidante também não trouxe uma proteção extra ao óleo de soja.

Gutierrez (1995) encontrou diferença significativa entre todos os seus tratamentos estudados. Os melhores tratamentos foram o óleo bruto com baixo índice de acidez e baixo de peróxido e esse mesmo óleo com a adição de 0,01% de BHT e 0,01% de ácido cítrico. Mas, de uma forma geral os tratamentos com antioxidante apresentaram resultados mais elevados do que os tratamentos sem antioxidante.

Siqueira (1998) não encontrou diferença significativa entre seus tratamentos estudados e em relação ao tempo de armazenamento a variação do coeficiente de extinção foi bem pequena não apresentando aumento significativo com o tempo.

O índice de iodo é a medida de insaturação de óleos e ou gorduras, expressa em número de gramas de iodo absorvido por 100 g de amostra. Estatisticamente, somente houve diferença significativa entre o tempo de armazenamento. Em relação aos tratamentos adotados não houve diferenças, mais uma vez a adição de ervas como antioxidantes não altera o resultado. O coeficiente de variação foi de 0,35758%. O índice de iodo variou muito pouco durante os meses e entre os tratamentos estudados, o índice de iodo inicial foi de 97,15 mg/100mg chegando ao final dos 6 meses de armazenamento com 93,8 mg/100mg com o tratamento orégano, sendo esse o valor mais baixo dentre os tratamentos (figura 23).

Figura 23 - Índice de iodo de óleo de castanha do Pará armazenado à temperatura ambiente durante 6 meses com adição das ervas tomilho, orégano e mistura

Siqueira (1998) também não encontrou diferenças estatísticas quando armazenou óleo de soja, milho e canola em garrafas PET por 6 meses. O que foi possível observar, como neste caso, é uma tendência à diminuição no índice de iodo.

Gutierrez (1995) encontrou diferença significativa em seus tratamentos quando armazenou por 6 meses óleo de castanha do Pará em garrafas de vidro âmbar. O índice de iodo variou entre 97 e 109 mg/100mg de óleo, muito próximo do encontrado na presente pesquisa.

Oliveira (2003) ao armazenar óleo de milho e canola por 6 meses não encontrou diferença estatística, somente uma tendência à redução numérica ao longo do período estudado como também observado nesses resultados.

A composição em ácidos graxos foi determinada no tempo zero, no terceiro e no sexto mês de armazenamento. Como o índice de iodo não apresentou variações já se esperava que a composição em ácidos graxos também não diferisse da inicial.

Como pode-se observar na figura 24 não houve diferenças significativas entre os tratamentos e entre o tempo de armazenamento. Para todos os tempos e tratamentos a concentração destaque foi para o ácido linoléico, que apresentou concentrações em média de 40%, seguido pelo ácido oléico, com concentrações em média de 29%, ácido palmítico com 18% em média e ácido esteárico com 10%. Apesar de apresentarem ácido palmitoléico e araquídico, esses estão em concentrações muito baixas.

Figura 24 - Composição em ácidos graxos (porcentagem) dos tratamentos estudados analisados no início, terceiro e sexto mês do armazenamento

Gutierrez (1995) analisou a composição em ácidos graxos do óleo de castanha do Pará armazenado por 6 meses em garrafas de vidro âmbar e os resultados encontrados estão bem próximos ao encontrados na presente pesquisa. Em ordem

decrecente de concentração o resultado encontrado foi ácido linoléico>ácido oléico>ácido palmítico>ácido esteárico.

Em relação ao período de indução analisado pelo Rancimat observou-se uma diferença significativa tanto para o tempo de armazenamento quanto para os tratamentos estudados.

Estatisticamente o melhor tratamento segundo essa análise foi o orégano, que apresentou o maior período de indução, diferentemente do controle que apresentou o período de indução mais baixo dentre os tratamentos analisados, como esperado. Somente nessa análise é que se pode observar o poder antioxidante das ervas adicionadas no óleo de castanha do Pará (figura 24).

Figura 25 - Período de indução, em horas, em Rancimat do óleo de castanha do Pará armazenado à temperatura ambiente durante 6 meses adicionado das ervas tomilho, orégano e um mistura

O período de indução de seis horas, obtido pelo tratamento controle, dá uma noção próxima da realidade, durante a comercialização, ou de ensaios de

armazenamento, em temperatura ambiente, e os antioxidantes naturais ainda contam com a termolabilidade, o que tenderia a diminuir a sua ação protetora.

Em relação ao tempo, no sexto mês o período de indução se apresentou como o melhor resultado, permitindo uma visualização do comportamento antioxidante individual de cada tratamento ao nível de significância de 5%, coeficiente de variação de 0,53038%.

O comportamento normalmente esperado seria que ao aumentar o tempo de armazenamento o período de indução tenderia a diminuir, porém nesse caso ocorreu o contrário, quanto maior o período de indução maior foi o período de armazenamento. Uma hipótese para a explicação desses resultados seria que ao passar maior tempo o óleo em contato com a erva libera maior quantidade de compostos fenólicos para o meio o que aumentaria a sua estabilidade.

Esse mesmo resultado não foi observado nas demais análises, pois como no *schaal oven test*, a análise de estabilidade oxidativa é realizada sob alta temperatura e ausência de luz o que explicaria a maior ação dos compostos fenólicos versus a clorofila presente nas ervas.

A atividade antioxidante de alguns compostos fenólicos tem sido descrita sistematicamente pelos trabalhos, entretanto, somente poucos estudos têm considerado a possível interação entre eles, tal como um sinergismo ou antagonismo, em que um antioxidante tenha ação regeneradora, pode aumentar ou diminuir a atividade na mistura de antioxidantes, respectivamente (PEYRAT-MAILLARD; CUVELIER; BERSET, 2003).

É complexa e diversificada a mistura natural de compostos fenólicos em vários extratos de ervas e isso dificulta a sua caracterização e a comparação da atividade antioxidante. Entretanto também algumas atividades antioxidantes das ervas podem ser atribuídas a outras substâncias não identificáveis ou mesmo decorrência do sinergismo e interação entre elas (ZHENG; WANG, 2001).

Na última década, muitos trabalhos têm sido apresentados na comunidade científica com focos nas quantidades e as estruturas químicas de diferentes fenólicos em diversas plantas comestíveis, aromáticas e vários materiais de plantas; o possível

desempenho de fenólicos das plantas na prevenção de várias doenças com estresse oxidativo como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer; e a habilidade de compostos fenólicos de plantas em modular a atividade de enzimas; na estabilização de óleos brutos e proteção da produção de off-flavours e preparação de suplementos alimentares (DIMITRIOS, 2006).

4.4 Conclusão

Não foi possível encontrar uma correlação entre os resultados obtidos nos testes de estufa e os resultados encontrados no armazenamento a temperatura ambiente.

Ao contrário do encontrado nos testes de estufa as ervas utilizadas como antioxidantes não apresentaram esse efeito sobre o óleo, nas análises de índice de peróxido os tratamentos com ervas apresentaram os maiores valores.

Somente na análise realizada em Rancimat é que se obteve a correlação do uso de ervas e a melhora na estabilidade do óleo de castanha do Pará, possivelmente pela análise ser realizada sob a ausência de luz e maior temperatura. Vários testes preliminares de estufa haviam sido feitos anteriormente da montagem do ensaio em temperatura ambiente e em todos havia a indicação do poder antioxidante das ervas ao serem adicionadas em meio lipídico.

Referências

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. 71p. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official and tentative methods**. 3th ed. Champaign, 2003. 1v.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, Barking, v. 87, p. 27-36, 2005.

BAUER, A.K.; DWYER-NIELD, L.D.; HANKIN, J.A.; MURPHY, R.C.; MALKINSON, A.M. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant C57BL/6 mice. **Toxicology**, Amsterdam, v.169, p.1-5, 2001.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, p. 505–512, 2006.

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

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

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

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

HARTMAN, L.; LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, London, v.22, p.475-477, 1973.

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

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

JAYASINGHE, C.; GOTOH, N.; AOKI, T.; WADA, S. Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Chicago, v. 51, p. 4442-4449, 2003.

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

NAWAR, W.W. Lipid oxidation of edible oils. In: AKOH, C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. In:_____. Nova York: Marcel Dekker, 1985, p.139-244.

OLIVEIRA, J.T.G.S.B. **Melhor dose e dose econômica de TBHQ nos óleos de milho e canola**. 2003. 75p. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

PEYRAT-MAILLARD, M.N.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Antioxidant Activity of Phenolic Compounds in 2,2 -Azobis (2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH) - Induced Oxidation: Synergistic and Antagonistic Effects . **Journal American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 80, p.1007-1012, 2003.

PIEIDADE, K.R. **Uso de ervas aromáticas na estabilidade oxidativa de filés de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) processados** . 2007. 159p. (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007 .

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

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 biotechnology**. Nova York: Marcel Dekker, 1998, p.377-396.

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

SU, L.; YIN, J.J; CHARLES, D.; ZHOU, K.; MOORE, J.; LIANGLI, Y. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical -scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. **Food Chemistry**, Barking, v.100, p. 990-907, 2007.

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

WITISCHI, H.; LOCK, S. Toxicity of butylated hydroxytoluene in mouse following oral administration. **Toxicology**, Amsterdam, v. 9, p. 137-146, 1978.

WHYSNER, J.; WANG, C.X.; IATROPOULOS, M.J.; WILLIAMS, M.G. Dose response of promotions by butylated hydroxyanisole in chemically initiated tumors of the rat fore stomach. **Food Chemistry Toxicology**, Bethesda, v.32, n.3, p.215-222, 1993.

WOISKY, R.G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procederes for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, New York, v.32, n.2, p.99-105, 1998

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

Considerações gerais

Apesar dos resultados encontrados nos capítulos 2 e 3 indicarem que as concentrações ervas mais eficientes na proteção do óleo contra a oxidação em teste acelerado variaram entre 5 e 10%, foi inviável tecnologicamente aplica-las no envase das garrafas de óleo de castanha do Pará, sendo assim, foi necessário utilizar concentrações mais baixas.

As concentrações utilizadas no ensaio de vida útil a temperatura ambiente foram determinadas com base em resultados dos testes acelerados e aspecto visual da embalagem.

Os resultados dos testes acelerados (Schaal Oven Test) foram positivamente correlacionados à estabilidade oxidativa em Rancimat das amostras, a temperaturas elevadas e com ausência de luz. Entretanto, no ensaio a temperatura ambiente, com presença de luz, o efeito da liberação de clorofilas presentes nas ervas parece ter sido maior do que ação do que os compostos fenólicos das ervas.

Para avaliação do efeito de ervas secas, o Schaal Oven Test não se mostrou adequado para a reprodução do comportamento de óleo bruto em temperatura ambiente, pois as interações e reações químicas são diferentes nas duas condições.