MELHOR DOSE E DOSE ECONÔMICA DE TBHQ NOS ÓLEOS DE MILHO E CANOLA

JANAINA TAVARES GOULART DE SÁ BELCHIOR DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciência, Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho – 2003

MELHOR DOSAGEM E DOSE ECONÔMICA DE TBHQ NOS ÓLEOS DE MILHO E CANOLA

JANAINA TAVARES GOULART DE SÁ BELCHIOR DE OLIVEIRA

Engenheiro de Alimentos

Orientador: Prof. Dr. **MARISA APARECIDA BISMARA REGITANO D'ARCE**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciência, Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA

Estado de São Paulo - Brasil

Junho – 2003

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

Oliveira, Janaina Tavares Goulart de Sá Belchior de
Melhor dose e dose econômica de TBHQ nos óleos de milho e canola
/ Janaina Tavares Goulart de Sá Belchior de Oliveira. - - Piracicaba,
2003.
75p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de
Queiroz, 2003.
Bibliografia.

1. Análise sensorial 2. Antioxidantes 3. Bioquímica de alimentos 4. Colza
5. Conservação de alimentos 6. Milho 7. Tecnologia de óleos, gorduras e
graxas I. Título

CDD 664.369

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

Este trabalho é dedicado ao meu marido Sidney, que sempre esteve presente ativamente com muito amor, sabedoria e conhecimento, sem sua preciosa ajuda este trabalho não poderia ter sido realizado, e a meus pais Arthur e Maria Alice, que sempre me deram muito estímulo, amor e coragem, e sempre estiveram presentes em todos os momentos, acreditando em mim.

A estes anjos presentes em minha vida, o meu muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Marisa A. B. Regitano d'Arce, pela amizade, carinho e apoio técnico durante a elaboração desta dissertação;

Aos professores e funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, especialmente à Maria Fernanda Almeida Prado e à Juliana Antunes Galvão;

À amiga Selma Guidorizzi A. Pacheco pelo companheirismo, pela ajuda e pelo apoio.

À empresa Cargill Agrícola S.A. pelo fornecimento dos óleos refinados de milho e canola.

À empresa Crown pelo fornecimento das embalagens.

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiv
SUMMARY.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Colza (e canola).....	2
2.2 Milho.....	4
2.3 Química de óleos.....	5
2.3.1 Autoxidação.....	6
2.3.2 Termoxidação.....	11
2.3.3 Fotoxidação.....	11
2.3.3.1 Fotoxidação e embalagem.....	13
2.3.4 Implicações da oxidação de lipídios àsaúde.....	15
2.4 Antioxidantes fenólicos.....	16
2.4.1 Tercbutil hidroquinona (TBHQ).....	17
2.5 Testes acelerados e avaliação da estabilidade oxidativa de óleos	21
2.5.1 Métodos de análise.....	24
2.5.1.1 Índice de peróxido.....	24
2.5.1.2 Espectrofotometria na faixa do ultravioleta.....	25
2.5.1.3 Análise sensorial.....	26

3	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1	Óleos refinados de canola e milho.....	28
3.2	Métodos.....	28
3.2.1	Análises Químicas.....	28
3.2.1.1	Índice de acidez.....	28
3.2.1.2	Índice de iodo	29
3.2.1.3	Índice de peróxido.....	29
3.2.2	Análises Físicas.....	30
3.2.2.1	Absortividade em 232 e 270 nm.....	30
3.2.2.2	Espectro de absortividade na faixa do ultravioleta.....	31
3.2.3	Análise Sensorial	31
3.3	Ensaio.....	33
3.3.1	Oxidação acelerada em estufa.....	33
3.3.2	Fotoxidação acelerada em câmara de luz.....	33
3.3.3	Melhor dose e dose econômica.....	34
3.3.4	Armazenamento ao ambiente.....	35
3.3.5	Análise estatística.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1	Óleo de milho.....	37
4.1.1	Caracterização inicial do óleo.....	37
4.1.2	Teste acelerado em estufa.....	38
4.1.3	Teste acelerado em câmara de luz.....	39
4.1.4	Melhor dose e dose econômica.....	41
4.1.5	Ensaio ao ambiente.....	42
4.2	Óleo de canola.....	50
4.2.1	Caracterização inicial do óleo.....	50
4.2.2	Teste acelerado em estufa.....	51
4.2.3	Teste acelerado em câmara de luz.....	53
4.2.4	Melhor dose e dose econômica.....	54

4.2.5	Ensaio ao ambiente.....	56
5	CONCLUSÕES.....	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

LISTA DE TABELAS

		Página
1	Composição em ácidos graxos do óleo de canola.....	4
2	Composição em ácidos graxos do óleo de milho.....	5
3	Compostos da oxidação lipídica e suas respectivas faixas de absorção no espectro do ultravioleta.....	26
4	Caracterização do óleo de milho refinado.....	37
5	Índice de peróxido (meq O ₂ /kg de óleo), absortividade em 232 e 270 nm do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ em estufa por 5 dias a 63°C.....	39
6	Índice de peróxido (meq O ₂ /kg de óleo), absortividade em 232 e 270 nm do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ em câmara de fotoxidação por 7 dias.....	40
7	Caracterização do óleo de milho refinado.....	42
8	Índice de peróxido (meq O ₂ /kg de óleo) do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionados em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.....	43
9	Absortividade em 232 nm do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionados em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.....	44

10	Absortividade em 270 nm do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionados em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.....	44
11	Índice de acidez (ácido oléico - %) do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionados em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.....	45
12	Índice de iodo (mg/100 mg de óleo) do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionados em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.....	45
13	Caracterização do óleo de canola refinado.....	51
14	Índice de peróxido (meq O ₂ /kg de óleo), absortividade em 232 e 270 nm do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ em estufa por 5 dias a 63°C.....	52
15	Índice de peróxido (meq O ₂ /kg de óleo), absortividade em 232 e 270 nm do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ em câmara de fotoxidação por 7 dias.....	54
16	Caracterização do óleo de canola refinado.....	56

17	Índice de peróxido (meq O ₂ /kg de óleo) do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionados em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.....	58
18	Absortividade em 232 nm do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionados em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.....	58
19	Absortividade em 270 nm do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionados em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.....	59
20	Índice de acidez (ácido oléico - %) do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionados em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.....	60
21	Índice de iodo (mg/100 mg de óleo) do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionados em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.....	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Esquema geral para autooxidação dos ácidos graxos insaturados e conseqüências.....	8
2 Esquema de formação do radical livre nos ácidos oléico (A) e linoléico (B).....	9
3 Estrutura de um peróxido polimérico (A) e um peróxido polimérico cíclico (B).....	10
4 Estrutura e características de solubilidade do TBHQ refinado.....	18
5 Questionário empregado na análise sensorial.....	32
6 Esquema da câmara de fotoxidação.....	34
7 Espectros de absortividade na faixa do UV do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenados por 1 mês..	46
8 Espectros de absortividade na faixa do UV do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenados por 2 meses.....	47
9 Espectros de absortividade na faixa do UV do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenados por 3 meses.....	47

10	Espectros de absorvidade na faixa do UV do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenados por 4 meses.....	48
11	Espectros de absorvidade na faixa do UV do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenados por 5 meses.....	48
12	Espectros de absorvidade na faixa do UV do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenados por 6 meses.....	49
13	Média das notas dadas pelos provadores, em análise sensorial, durante o período de estocagem do óleo de milho.....	50
14	Espectros de absorvidade na faixa do UV do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenados por 1 mês.....	61
15	Espectros de absorvidade na faixa do UV do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenados por 2 meses.....	62
16	Espectros de absorvidade na faixa do UV do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenados por 3 meses.....	62

17	Espectros de absorvidade na faixa do UV do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenados por 4 meses.....	63
18	Espectros de absorvidade na faixa do UV do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenados por 5 meses.....	63
19	Espectros de absorvidade na faixa do UV do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenados por 6 meses.....	64
20	Média das notas dadas pelos provadores, em análise sensorial, durante o período de estocagem do óleo de canola.	65

MELHOR DOSE E DOSE ECONÔMICA DE TBHQ EM ÓLEOS DE MILHO E CANOLA

Autora: JANAINA TAVARES GOULART DE SÁ BELCHIOR DE OLIVEIRA

Orientadora: Profa. Dra. MARISA APARECIDA BISMARA REGITANO D'ARCE

RESUMO

O aumento da utilização de embalagens do tipo PET nos últimos anos tem feito com que produtores de óleo se preocupem com a oxidação. Neste trabalho, óleos de milho e canola isentos de antioxidante e ácido cítrico foram adicionados de diferentes concentrações de TBHQ e submetidos a testes acelerados de oxidação acelerada em estufa a 63⁰C por 120 horas e em câmara de fotoxidação por 168 horas. Foram analisados o índice de peróxido e as absorvidades em 232 nm e 270 nm nestes óleos. A partir dos resultados de índice de peróxido obtidos nos óleos com as diferentes concentrações de TBHQ no teste em estufa, foram calculadas as melhores doses e doses econômicas de 119 mg/kg e 115 mg/kg TBHQ para o óleo de milho e de 116 mg/kg e 108 mg/kg TBHQ, respectivamente, para o óleo de canola em estudo. Um ensaio ao ambiente foi conduzido usando 115 mg/kg de TBHQ, para o óleo de milho e 108 mg/kg de TBHQ, para o óleo de canola, valores menores que o máximo permitido pela legislação. Ambos os óleos foram armazenados em

frascos de PET por 6 meses em condições tão satisfatórias quanto quando adicionados do máximo permitido pela legislação.

BEST AND ECONOMICAL DOSES OF TBHQ IN CORN AND CANOLA OILS

Author: JANAINA TAVARES GOULART DE SÁ BELCHIOR DE OLIVEIRA

Adviser: Profa. Dra. MARISA APARECIDA BISMARA REGITANO D'ARCE.

SUMMARY

The increasing utilization of PET packaging in the last years in Brazil has concerned oil producers regarding oxidation. In this work, corn and canola oils, free from antioxidants and citric acid, were added of different TBHQ concentrations, and submitted to accelerated (thermo and light induced) oxidation in a Schaal oven test at 63⁰C for 120 hours and in a photooxidation chamber for 168 hours. Peroxide and absorbance values at 232 nm and 270 nm were analysed in these oils. From the Schaal oven test, oil peroxide values were plotted against TBHQ concentrations and the best and the economical doses were determinated to be 119 mg/kg and 115 mg/kg TBHQ, respectively, for corn oil and 116 mg/kg and 108 mg/kg TBHQ, respectively, for canola oil. A shelf life test in PET flasks was conducted using 115 mg/kg TBHQ, for corn oil, and 108 mg/kg TBHQ, for canola oil, values that are lower than the maximum allowed by legislation and both oils were kept for 6 months.

1 INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais são muito suscetíveis a processos oxidativos, que os deterioram, diminuindo sua vida de prateleira. Estes processos oxidativos causam alterações organolépticas e nutricionais nos óleos.

A utilização de embalagens de PET (polietileno tereftalato) têm tido uma grande aceitação pelo consumidor brasileiro, que por sua vez tem suas exigências satisfeitas pela indústria. O PET tem sido cada vez mais utilizado pela indústria de óleos, entretanto, esta embalagem não oferece uma barreira total de proteção ao óleo contra os raios ultravioletas como a embalagem metálica, daí a necessidade de se utilizar um antioxidante, isto é, uma substância que promova o aumento de tempo de vida útil do óleo.

O TBHQ (tercbutil hidroquinona) é o antioxidante sintético mais recentemente aprovado pela legislação brasileira e pelo FDA (Food and Drug Administration), nos EUA. Seu modo de atuação, bem como suas implicações à saúde, vêm sendo pesquisadas há mais de 20 anos. Muitos trabalhos têm comprovado a maior eficiência do TBHQ, frente a outros antioxidantes presentes no mercado. Apesar desta eficiência, seu custo é muito mais alto. No entanto, uma dose menor e igualmente eficiente pode ser estabelecida, para que as necessidades da indústria possam estar de acordo com a competitividade da economia de mercado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Colza (e canola)

De acordo com “Óleos e gorduras de várias procedências...” (2000), a história conta que as civilizações antigas da Ásia e Europa usavam o óleo de colza em suas lamparinas. Seu uso se intensificou na Europa após o uso da energia a vapor, quando se descobriu que o óleo de colza aderiu muito mais às superfícies banhadas por água ou vapor do que qualquer outro lubrificante. Além disso, o óleo de colza era conhecido por conter alto teor de ácidos eicosanóico e erúcico.

Em 1970, no Rapeseed Congress Meeting, em Quebec, anunciou-se que o conteúdo alto de ácido erúcico era suspeito de causar lesões no coração e formar uma camada de gordura ao redor do coração de alguns animais experimentais (Carr, 1990). Em 1974, o Dr. Baldur Stefansson, um fitogeneticista da Universidade de Manitoba, no Canadá, desenvolveu a primeira variedade de colza “double low”, com níveis reduzidos de ácido erúcico e glucosinolatos. Esta variedade de *Brassica napus*, batizada de “Tower”, foi a primeira a preencher todos os requisitos de qualidade usados para identificar o cultivo desta semente fortemente melhorada, e conhecida pelo nome de canola. Este nome, derivado de CANadian Oil Low Acid, foi registrado inicialmente pela *Western Canadian Oilseed Crushers Association*, para referir-se ao óleo, torta, e semente

provenientes de variedades contendo menos de 5% de ácido erúxico no óleo e 3 mg ou menos de glucosinolatos por grama normalmente medidos na torta.

Em 1980, os direitos de registro da marca foram transferidos para o *Canola Council of Canada* e, em setembro de 1986, foi definido que os requisitos para o uso da marca exigiam que o óleo tivesse menos de 2% de ácido erúxico e os componentes sólidos da semente deveriam conter menos de 30 μ moles de glucosinolatos por grama.

Os maiores produtores de colza são, segundo “Óleos e gorduras de várias procedências...” (2000), a CEE, que está suplantando a China, tradicional líder no cultivo desta oleaginosa; em terceiro lugar encontra-se o Canadá, seguido pela Índia e um grupo formado por países do Leste Europeu. É uma cultura que se encontra em fase de expansão. Isto se deve ao fato de que, quando comparado com os outros óleos existentes, o óleo de canola apresenta o menor teor de ácidos graxos saturados, tem alto teor de monoinsaturados e de poliinsaturados (Tabela 1).

A canola cultivada no Brasil (Paraná e Rio Grande do Sul, principalmente) é uma seleção geneticamente modificada da colza (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). É uma crucífera que possui de 40 a 46% de óleo no grão, e de 34 a 38% de proteína no farelo. Além do alto teor, o óleo obtido é de excelente qualidade pela composição em ácidos graxos. O interesse dos produtores no plantio de canola tem crescido em função da garantia de compra e do preço pago, constituindo-se uma alternativa de cultura de inverno (Tomm, 2000).

Tabela 1. Composição em ácidos graxos do óleo de canola.

Ácido Graxo	Composição (%)
C 14:0 mirístico	< 0,2
C 16:0 palmítico	2,5 – 6,5
C 16:1 palmitoléico	< 0,6
C18:0 esteárico	0,8 – 3,0
C18:1 oléico	53,0 – 70,0
C18:2 linoléico	15,0 – 30,0
C18:3 linolênico	5,0 – 13,0
C20:0 araquídico	0,1 – 1,2
C 20:1 eicosenóico	0,1 – 4,3
C 22:0 behênico	< 0,6
C22:1 erúcico	< 2
C 24:0 lignocérico	< 0,2
C 24:1 tetracosenóico	< 0,2

Fonte: Brasil (2001)

2.2 Milho

O milho, ou *Zea mays L.*, é uma planta pertencente à família das gramíneas, e é provavelmente o grão mais antigo cultivado nas Américas. Era uma fonte essencial de alimento das civilizações que aí habitavam, e se tornou um alimento básico e uma “commodity” da agricultura nos Estados Unidos. Originário provavelmente do México Central, onde há evidências arqueológicas de seu uso que datam de 5.000 a.C., com o descobrimento das Américas foi introduzido na Europa, África e Ásia. Tolerante a várias condições ambientais, o milho se adaptou a vários climas diferentes (de tropical a temperado), altitudes diferentes

(desde o nível do mar até 3.500 m) e diferentes estações de crescimento para a planta. O milho não é cultivado por seu teor de óleo, mas por seu conteúdo em amido e proteína, que é de 61-78% e 6-12%, respectivamente (Strecker et al., 1990).

Tabela 2. Composição em ácidos graxos de óleo de milho.

Ácido Graxo	Composição (%)
C <14	< 0,3
C 14:0 mirístico	< 0,1
C 16:0 palmítico	9,0 – 14,0
C 16:1 palmitoléico	< 0,5
C18:0 esteárico	0,5 – 4,0
C18:1 oléico	24,0 – 42,0
C18:2 linoléico	34,0 – 62,0
C18:3 linolênico	< 2,0
C20:0 araquídico	< 1,0
C 20:1 eicosenóico	< 0,5
C 22:0 behênico	< 0,5
C 24:0 lignocérico	< 0,5

Fonte: Brasil (2001)

2.3 Química de óleos

O principal componente do óleo é o triglicerídeo, que é uma substância composta de uma molécula de glicerina e três moléculas de ácidos graxos. As propriedades físicas e químicas de um óleo estão relacionadas principalmente com o comprimento da cadeia carbônica e o seu grau de insaturação.

Normalmente, quanto menor a cadeia carbônica, menor seu ponto de fusão, e quanto maior o número de insaturações dos ácidos graxos, menor será seu ponto de fusão e sua estabilidade para oxidação. Os ácidos graxos poliinsaturados com duplas ligações conjugadas são oxidados mais rapidamente que aqueles com duplas ligações não conjugadas (Lin, 1991).

Existem três caminhos nos quais os óleos podem sofrer oxidação, a saber: autooxidação, a termoxidação e fotooxidação. Todas estas rotas causam odores estranhos ao óleo (Berger & Hamilton, 1995).

2.3.1 Autooxidação

A autooxidação é um processo que ocorre em cadeia e que ainda não foi completamente entendido. Existem algumas evidências de que a fotooxidação seja a responsável pelos primeiros hidroperóxidos formados, e a iniciação pelo efeito da temperatura também é possível para amostras aquecidas (Gunstone, 1994).

A oxidação de lipídios pode ser iniciada por espécies endógenas (H_2O_2 , ROOH) e radicais ($\cdot O_2$, $ROO\cdot$, $\cdot OH$, GS) ou por espécies exógenas (1O_2 , O_3), radicais (NO_x , $SO_3\cdot$), e agentes (UV, radiação ionizante, calor) (Simic et al., 1992). Metais são conhecidos por serem pró-oxidantes mesmo quando há presença de traços; calor também é um grande acelerador de oxidação, especialmente em temperaturas acima de $60^\circ C$, a partir do qual foi estimado que, para cada acréscimo de temperatura da ordem de $15^\circ C$, a velocidade da reação de oxidação dobra (Sherwin, 1978).

A grande diferença no grau de oxidação de ácidos graxos com diferentes graus de insaturação está relacionado com seu mecanismo de oxidação. A oxidação de um óleo é uma reação em cadeia de radicais livres numa seqüência de reações: formação do radical livre, formação do hidroperóxido, decomposição do hidroperóxido e formação de produtos de oxidação (Lin, 1991).

Na formação do radical livre, o grupamento metílico adjacente a uma ligação dupla é ativado pelo elétron da dupla ligação, tornando-se um sítio mais vulnerável para o ataque de uma molécula de oxigênio. Assim, haverá a formação de um radical livre, que levará a formação de um hidroperóxido, segundo o esquema da Figura 2, segue com a adição do oxigênio, para formar o radical peróxido, que retira uma molécula de hidrogênio de uma molécula intacta, produzindo um outro radical hidroperóxido. O radical livre na cadeia do ácido graxo é estabilizado pela dupla ligação pelo efeito de ressonância (Lin, 1991; Rovellini et al., 1997). A ressonância ocorre para reduzir a energia das moléculas, já que as mesmas procuram a situação de menor energia possível, tornando-as mais estáveis (Allinger et al., 1978) e o elétron não pareado de um radical livre pode interagir com outros átomos ou grupamentos. Como resultado o elétron não pareado é deslocado e a densidade eletrônica cai (Rovellini et al., 1997).

A ativação do grupamento metílico adjacente a uma dupla ligação facilita a iniciação do radical livre no grupamento metílico. O efeito da ressonância, além de estabilizar os radicais livres, acelera a formação do hidroperóxido, no qual o radical livre foi formado (Lin, 1991).

A formação do hidroperóxido inicia-se na cadeia de ácidos graxos mais insaturados (Lin, 1991). A velocidade de oxidação é duas vezes mais alta em triglicerídeos que possuem ácido linolênico que ácido linoléico. Além disso, o triglicerídeo que contém LnLnL (ácido linolênico, ácido linolênico, ácido linoléico) é oxidado mais rapidamente que o LnLLn, já que a interação do grupamento LnLn é maior que a do grupamento LnL (Rovellini et al., 1997). Devido ao efeito da ressonância, o grupamento hidroperóxido pode atacar uma única cadeia de ácidos graxos em várias posições (Lin, 1991).

Figura 1 - Esquema geral para autooxidação dos ácidos graxos insaturados e conseqüências.

Fonte: Shahidi et al. (1996)

Figura 2 - Esquema de formação de radical livre nos ácidos oléico (A) e linoléico (B).

Fonte: Rovellini et al. (1997)

Figura 3 - Estrutura de um peróxido polimérico (A) e um peróxido polimérico cíclico (B).

Fonte: Rovellini et al. (1997)

A oxidação de substâncias com duplas ligações conjugadas pelo ataque do oxigênio forma principalmente um peróxido polimérico cíclico (Rovellini et al., 1997).

Após a oxidação do óleo, com acúmulo de peróxidos, o hidroperóxido se decompõe e forma três categorias de produtos oxidados: os compostos voláteis, os polares e os polímeros. A ligação carbono-carbono entre o carbono onde está o peróxido e os carbonos adjacentes se dividirá para formar uma pequena molécula e uma molécula grande (com o glicerídeo remanescente). Por isso, muitos hidroperóxidos são formados em diferentes posições na mesma cadeia de ácido graxo e também em outras cadeias. Esta divisão ocorrerá em várias posições diferentes e formará uma grande variedade de compostos (Lin, 1991).

Para inibir a autoxidação, substâncias antioxidantes podem estabilizar seletivamente radicais e peróxidos em função de sua estrutura e concentração, durante o período de indução. Também podem-se utilizar substâncias que retêm radicais livres para que se interrompa a reação em cadeia. A eliminação de metais através de sua quelação age como uma proteção (Rovellini et al., 1997).

2.3.2 Termoxidação

Um ácido graxo insaturado, sob ação do calor, tem como primeiros produtos de reação os mono-hidroperóxidos, que são formados rapidamente e reagem para formar uma variedade de produtos secundários da oxidação, polares, incluindo dímeros, polímeros e produtos de degradação voláteis e não voláteis (Awl et al., 1987).

A temperatura afeta tanto a propagação ao longo da cadeia quanto a distribuição dos produtos resultantes da reação. A distribuição dos produtos da termoxidação pode ser um pouco diferente de 50 a 70⁰C (temperatura dos testes acelerados) da distribuição à temperatura ambiente, pois esta distribuição está relacionada com as diferentes energias de ativação para diferentes reações envolvendo diferentes ligações GH. Assim, a temperatura afeta a distribuição estereoquímica dos produtos, isto é, a relação de produção de cis, trans/ trans, trans (Simic et al., 1992).

2.3.3 Fotoxidação

A fotoxidação envolve a interação entre a dupla ligação e o oxigênio singlete, produzido pelo efeito da luz (especialmente a luz ultravioleta ou próxima a sua faixa) no oxigênio tripleto, na presença de sensitizadores como a clorofila (Gunstone, 1994; Sherwin, 1978).

Esta não é uma reação em cadeia e não possui período de indução, mas pode ser inibida por supressores de oxigênio singlete, como o caroteno (Gunstone, 1994, Rovellini et al., 1997).

O oxigênio singlete é formado pela transferência de energia da luz (absorção) para a molécula de oxigênio, através de um pigmento (fotosensibilizador), formando estados singlete excitados que podem ser diferentes para cada comprimento de onda e que podem atacar o substrato, no caso o óleo (Ogryzlo, 1970; Wilson & Hastings, 1970). Isto ocorre, pois ao absorver um quantum de energia, um dos elétrons do subnível mais externo do átomo é promovido a um orbital acima, gerando spins paralelos, que possuem menor conteúdo energético (Atkins, 1991). Este estado intermediário do oxigênio molecular é de maior durabilidade, tendo uma baixa energia de ativação quando comparada com a energia de muitas ligações químicas (Wilson & Hastings, 1970).

A autooxidação e a fotoxidação ocorrem através de mecanismos diferentes e produzem diferentes quantidades de hidroperóxidos. Assim, o produto primário da fotoxidação é o hidroperóxido e sua velocidade de formação é de 10 a 30 vezes maior que na autooxidação, pois não há período de indução (Rovellini et al., 1997).

A fotoxidação é uma reação mais rápida que a autooxidação (Gunstone, 1994). O oxigênio singlete reage 1500 vezes mais rápido que o oxigênio normal (Rovellini et al., 1997). Na autooxidação, um grupamento metílico associado a uma dupla ligação é mais reativo que uma simples insaturação. Na fotoxidação, a reatividade está relacionada ao número de duplas ligações na cadeia (Gunstone, 1994).

O ataque do oxigênio pode ocorrer à temperatura ambiente ou abaixo dela, como na estocagem do óleo ou de produtos que o utilizaram em sua formulação.

O mecanismo básico de oxidação é similar em diferentes temperaturas, mas a razão em que ocorrem é diferente (Lin, 1991).

2.3.3.1 Fotoxidação e embalagem

A função principal da embalagem é proteger o alimento, aumentando o seu tempo de prateleira, devendo agir como uma barreira ao oxigênio, à umidade e às radiações luminosas (Faria, 1991).

As embalagens tipo PET (polietileno tereftalato) apresentam má permeabilidade a gases, evitando a oxidação do produto; excelente resistência mecânica a impactos e quedas; boa rigidez e estabilidade a deformações; transparente, permite a visualização do produto pelo consumidor; permite o desenvolvimento de desenhos modernos, atraentes e diferenciados; permite o uso de tampas e bicos dosadores exclusivos; e é reciclável. Entretanto, apresenta dificuldades na sua estocagem e empilhamento no ponto de venda (Leme, 1994).

A exposição à luz pode causar alguns efeitos indesejáveis aos alimentos. Quanto maior a frequência da luz, maior será a energia de sua fonte. O efeito quântico depende da energia absorvida, que varia com o tipo de material da embalagem e com o alimento. A radiação ultravioleta, por possuir maior frequência, induz maior oxidação. Por outro lado, os pigmentos no óleo favorecem a absorção de radiações no espectro visível. O efeito protetor da embalagem depende de seu espectro de transmissão, absorção e reflexão. São importantes o tipo de luz e a intensidade absorvida (Faria, 1991).

Além disso, na fotoxidação há a formação do oxigênio singlete, ou pela ação dos raios ultravioleta ou gerado por descargas de microondas e reações químicas e fotoquímicas (Kanner, 1992), que é 1500 vezes mais reativo que o comum, triplete (Faria, 1991). O oxigênio singlete, formado age sobre os óleos em embalagens transparentes, já que estão mais expostos à fotoxidação,

diminuindo assim sua vida de prateleira (Lugasi et al., 1995). Por fotólise, os hidroperóxidos são degradados, formando compostos voláteis como aldeídos, cetonas e álcoois (Espinoza-Atencia & Faria, 1994).

No espectro magnético, a sua parte denominada luz visível está na faixa de comprimento de onda entre 400 e 700 nm, e pode ser natural (solar) e artificial (fluorescente e incandescente). Estas fontes podem conter espectros com teores de radiação ultravioleta que induzirão a fotoxidação de alimentos fotossensíveis (Gatcher & Muller, 1987).

Num estudo sobre o efeito da luz na composição de óleos de diferentes origens, Riahi & Marzouk (2000) mostraram que a ausência de luz é favorável ao armazenamento de óleos, já que os parâmetros físico-químicos indicaram uma quase estabilidade durante o período de testes. Com a luz artificial, são produzidas degradações, uma perda total de clorofilas, uma diminuição acentuada das quantidades de polifenóis totais (que identificam óleos virgens, já que os polifenóis são perdidos no refino), bem como variações nas quantidades de ácidos graxos insaturados de 18 carbonos.

Óleos de soja, girassol, oliva, margarina e banha foram expostos à luz ultravioleta, por períodos de 20 minutos a 6 horas. Foram verificadas a peroxidação lipídica, a composição em ácidos graxos e as quantidades de tocoferol e colesterol após cada tratamento. Houve aumento significativo do índice de peróxidos e valor de TBA (ácido tiobarbitúrico), principalmente após 6 horas de tratamento (Lugasi et al., 1995).

Além disso, Riahi & Marzouk (2000) observaram também que o teor de clorofila é o único parâmetro que mostra que a luz artificial provoca uma alteração muito mais rápida que a luz natural, nos demais parâmetros a luz artificial comparou-se à luz natural. Além disso, as alterações dependem da natureza do óleo (se são de frutos ou grãos), da variedade dos mesmos e dos processos tecnológicos utilizados na obtenção do óleo.

Bekbölet (1990) acrescentou que os ácidos graxos insaturados e seus ésteres absorvem radiações ultravioleta em comprimentos de onda entre 184 e 192 nm. Embalagens que transmitem comprimentos de onda entre 490 e 589,5 nm, correspondentes ao azul-esverdeado, verde e amarelo, podem prevenir o desenvolvimento da rancidez em óleos.

Espinoza-Atencia & Faria (1993) observaram a influência da coloração de embalagens de PVC na fotoxidação do óleo de soja. O experimento consistiu em um teste acelerado em câmara de fotoxidação (2500 lux, a 35⁰C), usando placas de Petri cobertas com discos do material dos frascos de PVC utilizados (transparentes e nas cores amarela, verde e vermelha). Foi demonstrada que a ordem quanto ao grau crescente de proteção luminosa foi: transparente < amarela < verde < vermelha < controle (placa coberta com alumínio). Assim, concluiu-se que a taxa de fotoxidação depende das características da transmissão, absorção e reflectância da embalagem e do produto. Além disso, a fonte de radiação, a intensidade da luz, a área da embalagem e o tempo de exposição são fatores importantes a serem considerados. Os filmes de PET absorvem cerca de 80% dos raios ultravioleta abaixo de 300 nm, não os transmitindo para os produtos contidos nas embalagens (Espinoza-Atencia & Faria, 1993).

Apesar de oferecerem resistência química a ácidos, bases e vários solventes, as embalagens de PET não oferecem barreira total à passagem de luz, fazendo-se necessária a adição de antioxidantes nos óleos para retardar sua oxidação (Albuquerque & Anjos, 1991).

2.3.4 Implicações da oxidação de lipídios à saúde

A oxidação e produção de radicais livres são partes integrais do metabolismo humano. O oxigênio é o último receptor de elétrons na síntese de

ATP (Papavasiliou, 1996). Excesso de exercícios e condições de vida e trabalho desgastantes podem causar estresse oxidativo fisiológico (Ferrari, 1998).

Os componentes que agem no sistema antioxidativo podem ser endógenos, como a glutatona, o NADPH, o ubiquinol-10 e as enzimas superóxido-dismutase; ou exógenos, isto é, presentes na dieta, como os tocoferóis, vitamina A, carotenóides, licopenos e os antioxidantes sintéticos, como o BHA, BHT, PG e TBHQ, que também podem apresentar efeito antioxidante no corpo (Papavasiliou, 1996).

Entretanto, a oxidação lipídica pode causar a destruição parcial dos ácidos linoléico e linolênico, da vitamina A e carotenóides, dos tocoferóis e da vitamina C. Além disso, a formação de compostos secundários da oxidação, como o malonaldeído, e compostos da reação de Maillard podem reagir com proteínas, diminuindo sua absorção. Os peróxidos formados também causam irritação a mucosa intestinal, provocando diarreia e diminuição da capacidade de absorção (Kirk, 1984; Kanner, 1994).

Um estudo feito por Staprans et al. (1996) mostrou que animais que receberam uma dieta com grande quantidade de lipídios oxidados, provenientes de óleo aquecido, tiveram mais lesões ateroscleróticas que animais que receberam alimentação com baixa concentração destes.

A dieta de ácidos graxos oxidados pode ser absorvida pelo intestino e incorporada às lipoproteínas, levando a um estresse oxidativo, provocando uma aterosclerose exacerbada (Penumetcha et al, 2000).

A autooxidação de ácidos graxos poliinsaturados de óleos comestíveis resulta na formação de hidroperóxidos que sofrem transformações químicas com uma variedade de rearranjos (Perjési et al., 2002). Por exemplo, da quebra do ácido graxo ômega-6 há a produção de 4-hidróxi-nonenal que tem efeitos tóxicos sobre células hepáticas e linfócitos. Tanto o 4-hidróxi-nonenal quanto o malonaldeído produzido pela peroxidação lipídica, causam a modificação do

LDL, gerando lesões na parede dos vasos sanguíneos, levando à formação de aterosclerose (Esterbauer, 1993).

2.4 Antioxidantes fenólicos

Antioxidantes fenólicos são compostos ou substâncias que são capazes de inibir ou interferir na formação do radical livre. Esta habilidade está na sua estrutura fenólica, pois o fenol, serve de doador de prótons, suprime a formação do radical livre inicial, assim este radical não será capaz de propagar a reação, retardando o processo oxidativo (Sherwin, 1990).

2.4.1 Tercbutil hidroquinona (TBHQ)

O TBHQ foi introduzido na década de 70 e aprovado como antioxidante alimentício em 1972. Ele é um pó cristalino branco e brilhoso, de odor muito leve e ponto de ebulição mínimo na faixa de 125-126⁰C. O TBHQ é de levemente solúvel a insolúvel em água e moderadamente solúvel em óleos e gorduras, não forma complexo com o ferro e com o cobre, e é conhecido por ser um bom antioxidante para óleos de fritura ou produtos fritos (Madhavi & Salunkhe, 1995; Sherwin & Thompson, 1967).

Solubilidade aproximada em:	% p/p
Etanol, a 25 ^o C	60
Acetona, a 25 ^o C	112
Propileno glicol, a 25 ^o C	30-50
Óleo de milho, a 25 ^o C	5-10
Gordura, a 50 ^o C	3

Figura 4 - Estrutura e características de solubilidade do TBHQ refinado.*

Fonte: Sherwin & Thompson (1967)

*O TBHQ usado para a determinação foi especialmente purificado e obtido por recristalização de grau industrial, mas adequado ao uso alimentício.

Chahine & Macneill (1974) observaram que o efeito de antioxidantes para retardar a deterioração oxidativa de óleo bruto de baleia durante a estocagem, em ordem decrescente foi TBHQ, BHA (butil hidroxi anisol), di-BHA e PG (galato de propila). Com relação à sinergia com ácido cítrico, não foi encontrada qualquer alteração nos resultados quando comparado ao resultado utilizando somente TBHQ.

Em relação à solubilidade, Sherwin & Thompson (1967), em trabalho com banha, óleos de soja, algodão e açafrão e gordura de ave, concluíram que o BHA

tem uma solubilidade similar ao TBHQ, enquanto que o BHT (butil hidroxi tolueno) e o PG apresentaram dificuldades.

O TBHQ, em relação à gordura animal, é tão efetivo quanto o BHA e mais efetivo que o BHT ou o PG. Contudo, o TBHQ não sobrevive às condições de processamento como o PG (Chahine & Macneill, 1974).

Com relação aos óleos vegetais insaturados, Sherwin & Thompson (1967) verificaram que o poder antioxidante do TBHQ é superior ao BHA, ao BHT, e ao PG, o que indica que o TBHQ confere um poder protetor em operações de fritura. Além disso, também não foi encontrada a presença de descoloração com o TBHQ, como ocorre com o PG.

Em estudos bioquímicos sobre a absorção, metabolismo e excreção, Madhavi & Salunkhe (1995) citaram que, no ser humano, doses únicas de 0,5 a 4 mg/Kg em veículo rico em gordura tiveram a maior parte eliminada na urina, após 40 horas. Em estudos toxicológicos, não foram observados efeitos deletérios em ratos no crescimento, mortalidade e peso de órgãos, após 20 meses. Também não se observaram anormalidades histopatológicas em cachorros, por 2 anos, em dosagens até 0,5%. Contudo, dosagens maiores podem ter causado diminuições na contagem de células vermelhas, hemoglobina e hematócritos. Com respeito à reprodução, não foram encontrados efeitos teratogênicos.

O limite máximo do TBHQ é de 0,02 g/100 g de óleo, tendo uma boa estabilidade térmica (Brasil, 2001).

Em “O ANTIOXIDANTE TENOX ...” (1995) foi observada a superioridade do TBHQ em relação ao BHT, nos óleos de soja, girassol, canola, milho e azeite de dendê através do índice de estabilidade oxidativa (OSI), que mede a resistência à oxidação para cada tratamento com antioxidante nos óleos.

Ainda em “O ANTIOXIDANTE TENOX ...” (1995) foi comprovado também que o uso do TBHQ é mais econômico que o BHT. Por exemplo, para o óleo de soja, o TBHQ pode proporcionar uma estabilidade 250% superior ao do BHT.

Para uma OSI de 13 horas, seriam necessários 212 mg/kg de BHT, a um custo de US\$ 0,98/ton de óleo de soja, enquanto usar-se-ia para a mesma OSI, 10 mg/kg de TBHQ, com um custo de US\$ 0,30/ton óleo de soja. Além disso, 212 mg/kg de BHT já estão fora dos limites da legislação. Com 200 mg/kg de TBHQ, obter-se ia uma OSI de 34 horas, a um custo de US\$ 5,96/ton de óleo de soja.

Gutierrez (1995) observou que o TBHQ se mostrou mais eficiente que o BHA e que o BHT na prevenção da oxidação do óleo bruto da castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*), sendo a dosagem econômica de 82,37 mg/kg para este óleo, bem abaixo do valor limite previsto pela legislação para óleos refinados.

O TBHQ demonstrou ser mais eficiente que o BHA e o BHT, em ensaios de fotoxidação acelerada para óleos de soja, milho e canola (Siqueira, 1998).

Almeida-Doria (1999) também verificou a superioridade do TBHQ com relação a extratos etanólicos de alecrim e orégano, e mistura de BHA+BHT, a partir de 5 e 7 dias, em testes de oxidação de óleo de soja. Com base neste resultado, determinou-se a dosagem econômica de TBHQ no óleo de soja que foi de 126,09 mg/Kg, abaixo do limite estipulado pela legislação.

Lin et al. (1981) demonstraram que uma alteração química pode ocorrer no BHA ou no TBHQ adicionados a óleos em temperaturas próximas à fritura.

A perda de antioxidantes em altas temperaturas ocorre tanto pelo resultado da evaporação quanto pela decomposição. Hamama & Nawar (1991) encontraram a seguinte ordem decrescente de estabilidade a 185°C: BHT>PG>BHA>TBHQ. Estes antioxidantes possuem diferentes graus de volatilidade. Warner et al. (1996) verificaram que o TBHQ é muito instável em condições normais de armazenamento e processamento. No entanto, é eficaz no aumento da tempo de prateleira dos produtos. Além disso, os produtos provenientes da decomposição do TBHQ também podem ter efeito antioxidante.

Asap & Augustin (1996), em estudos sobre o efeito do TBHQ na fritura com oleína refinada, branqueada e desodorizada, notaram que a readição do TBHQ a

cada novo dia de fritura retarda o grau de oxidação do óleo. Este efeito deve-se provavelmente ao efeito combinado do TBHQ propriamente dito e os produtos de sua decomposição.

Foi demonstrado por Kurechi et al. (1983b), que pelo menos quatro destes produtos possuem efeito antioxidante. Eles examinaram a estrutura e atividade antioxidativa de produtos da fotoxidação de solução de TBHQ em benzeno pela irradiação com raios ultravioleta. Identificaram-se quatro compostos como possuidores de atividade antioxidante. São eles: 2,2-dimetil-5-hidróxi-2,3-diidrobenzo(b) furano (ARE); 2-(2-[3'-tercbutil-4'-hidróxi-fenóxi]-2-metil-1-propil) hidroquinona; 2-(2-hidróxi-2-metil-1-propil) hidroquinona; e 2-tercbutil-4-etóxi-fenol, sendo que para banha e oleato metílico, os que tiveram melhor ação antioxidante (inclusive melhor que o próprio TBHQ) foram 2-(2-[3'-tercbutil-4'-hidróxi-fenóxi]-2-metil-1-propil) hidroquinona e 2-(2-hidróxi-2-metil-1-propil) hidroquinona. ARE também teve um bom efeito antioxidante, com uma AOM da ordem de 30 horas, com exceção quando utilizado em óleo de soja (Kurechi et al., 1983a).

2.5 Testes acelerados e avaliação da estabilidade oxidativa de óleos

A temperatura acelera a velocidade das reações, dentre elas a oxidação. Os testes acelerados baseiam-se na elevação da temperatura para aumentar a velocidade de reação de oxidação. A dificuldade está em se trabalhar com temperaturas que possibilitem correlações com o comportamento ao ambiente. A estabilidade de óleos adicionados de antioxidantes pode ser avaliada pela sua estocagem em condições normais de armazenamento e em condições aceleradas, nas quais análises periódicas são realizadas para acompanhar alterações químicas, físicas ou organolépticas. Além disso, pode-se mensurar alterações primárias e secundárias, contudo não há um padrão para detectar alterações oxidativas em todos os tipos de alimentos. Os métodos mais utilizados

são o Método do Oxigênio Ativo (AOM) e o teste em estufa ("Schaal Oven Test") (Dutton, 1978; Faria, 1994; Hill, 1994; Shahidi, 1995).

O AOM ou teste de Swift corresponde a uma corrente de ar purificado que atravessa a matéria graxa aquecida a 98^oC em um banho de óleo mineral. O teor de peróxidos é determinado em intervalos regulares, por método iodométrico até que este atinja o valor de 100 meq/kg de óleo. Este método possui o problema de que a taxa de peróxidos produzida é resultante da formação e decomposição de peróxidos, porém as duas reações têm velocidade diferentes de acordo com a temperatura. A formação de peróxidos ocorre de 60 a 70^oC e a decomposição se torna mais rápida acima disso. Já os testes de estufa têm a vantagem de trabalhar com temperaturas mais suaves, em torno de 60^oC (Berset & Cuvelier, 1996).

As alterações primárias são avaliadas através das perdas de ácidos graxos insaturados, do oxigênio incorporado através do ganho de peso e da quantidade de hidroperóxidos e dienos conjugados formados. As alterações secundárias são acompanhadas pela formação de compostos carbonila, malonaldeído e outros aldeídos, hidrocarbonetos e produtos fluorescentes (Gray, 1978; Shahidi, 1996).

A taxa inicial de formação de hidroperóxidos excede a sua taxa de decomposição, durante a oxidação de óleos, porém este fato é revertido nos estágios posteriores. Com o ganho de peso e a quantificação de hidroperóxidos formados durante um período de incubação, é possível determinar o efeito de antioxidantes na estabilidade do óleo. O índice de peróxidos é utilizado para quantificar os hidroperóxidos formados (Shahidi, 1995), contudo estes são produtos intermediários na formação de carbonilas e hidróxi-compostos. Em teste acelerado a 100^oC, observou-se que o índice de peróxidos passa por um valor máximo, sendo também muito sensível a variações de temperatura (Gray, 1978).

O Rancimat e o Oil Stability Instrument (OSI) são baseados em um método condutimétrico de análise de produtos secundários de oxidação (Berset & Cuvelier, 1996). São testes analíticos mais rápidos para determinar a suscetibilidade comparativa de um óleo com outro em relação à deterioração autoxidativa. Entretanto estes métodos são utilizados para estudos de estabilidade pelas indústrias (Shahidi, 1995) e não servem para prever vida de prateleira de óleos. Já os testes de estufa são mais utilizados para verificar o efeito de antioxidantes e servem para a análise tanto de produtos primários quanto secundários da oxidação (Berset & Cuvelier, 1996).

Foram avaliados vários antioxidantes sintéticos e um extrato etanólico de canola em teste acelerado em estufa a 65⁰C, utilizando amostras de 25 mL de óleo de canola, acondicionadas em frascos abertos por até 17 dias. O índice de peróxidos e a absortividade em 234 nm mostraram que o TBHQ (200 mg/Kg) foi o antioxidante mais eficiente, quando comparado à mistura de BHA/BHT (200 mg/Kg) e ao extrato de canola (500 e 1000 mg/Kg) (Wanasundara & Shahidi, 1994).

Regitano-d'Arce & Vieira (1996) observaram que 200 mg/kg de TBHQ foram mais eficientes que 200 mg/kg de BHA e 100 mg/kg de BHT para proteger o óleo bruto de castanha do Pará da oxidação, durante um ensaio acelerado em estufa a 63⁰C e que a adição do antioxidante ao óleo retardou a degradação oxidativa durante o armazenamento em condições ambientes (frasco de vidro) por 180 dias.

Lee & Min (1988) observaram que na fotoxidação em câmara de luz, em curto intervalo de tempo foi possível observar a ação de substâncias envolvidas na fotoxidação do óleo de soja com clorofila e β -caroteno, em caixas retangulares, uma de vidro de dimensões 60 x 30 x 50 cm, onde foram colocadas amostras para serem fotoxidadas e outra caixa de madeira de dimensões 70 x 50 x 60 cm, com quatro lâmpadas fluorescentes de 15 W embutidas no seu fundo. A

caixa de vidro foi colocada a 12 cm da fonte de luz e as amostras colocadas a 10 cm do fundo da caixa de vidro, ficando a 22 cm da fonte de luz. A intensidade da luz foi de 4000 lux e a temperatura constante de 10⁰C.

Segundo Faria & Espinoza-Atencia (1993), testes acelerados para alimentos fotossensíveis devem simular as reais condições dos sistemas de embalagem, para obter uma melhor estimativa do tempo de prateleira. Eles estudaram a fotoxidação em cabines com dimensões de 58 x 30 x 20 cm, termicamente isoladas, com lâmpadas fluorescentes de radiação espectral principal entre 400-650 nm. A intensidade da luz foi de 2500 lux e as temperaturas usadas foram de 25⁰C, 30⁰C, 35⁰C. Usaram-se 20 g de óleo em placas de Petri cobertas com amostras das paredes das garrafas, por tempos 0 a 120 horas, retirando-se as amostras a cada 24 horas.

Almeida-Doria (1999) observou aumento dos valores de peróxido, absorvidade em 232 e 270 nm com o tempo de exposição à luz, concluindo que houve formação de compostos primários e secundários. O teste foi realizado em uma caixa retangular de dimensões 80 x 35 x 60 cm, de alvenaria, com 6 lâmpadas fluorescentes de 20 W, 3 lâmpadas na parte superior e 3 na parte inferior da caixa, com intensidade luminosa de 8.370 lux.

Este trabalho teve por objetivo definir a dose econômica de TBHQ nos óleos de milho e de canola, através de testes de estufa e de fotoxidação, e avaliar a sua eficiência em ensaios ao ambiente, comparando com a dose máxima permitida pela legislação.

2.5.1 Métodos de análise

2.5.1.1 Índice de Peróxido

Durante a análise do índice de peróxido, a amostra com solvente é adicionada de solução de iodeto de potássio saturada. Os íons iodeto reagem com os peróxidos, produzindo I_2 . O excesso de I^- não reage e fica em solução. Ao titular-se a solução com tiosulfato de sódio, este é oxidado a tetrationato de sódio e o iodo é reduzido a I^- , causando a perda da cor azulada. Assim, a quantidade de tiosulfato consumida é proporcional a quantidade de peróxidos presentes na amostra (Baccan et al., 1985).

2.5.1.2 Espectrofotometria na faixa do espectro ultravioleta

A oxidação de ácidos graxos poliinsaturados pode ser analisada pelo aumento da absorvidade na faixa do espectro ultravioleta. Durante a oxidação, lipídios contendo dienos ou polienos apresentam uma alteração na posição de suas duplas ligações, resultado da isomerização e conjugação. A formação de dienos e trienos é proporcional ao ganho de oxigênio e à formação de peróxidos durante os estágios iniciais de oxidação. Estes dienos e trienos conjugados apresentam intensa absorção em 234 nm e 268 nm, respectivamente, conforme a Tabela 4 (Rovellini et al., 1997).

Tabela 3. Compostos da oxidação lipídica e suas respectivas faixas de absorção no espectro do ultravioleta.

Composto	UV (máximo nm)
Monoeno	190
Dieno	220-230
Trieno	265-270
Tetraeno	310-320
Aldeído cetônico	265-280
Aldeído cetônico α,β etilênico	220-250
	310-330
Cetona dietilênica conjugada	265-280
α -dicetona	280
α -cetoaldeído	282
Forma enólica de α -dicetona e	270
α -cetoaldeído	
β -dicetona	271
Ácido α -cetônico	210
	230
Ácido dietilênico conjugado	260
Ácido trietilênico conjugado	315

Fonte: Rovellini et al. (1997)

2.5.1.3 Análise sensorial

Utiliza-se a análise sensorial para estabelecer a diferença, caracterizar e medir atributos sensoriais de produtos, ou para estabelecer diferenças entre produtos aceitáveis ou não pelo consumidor (Lyon et al., 1992). A análise sensorial é o método final para assegurar a qualidade e a estabilidade de óleos e

gorduras, nenhum método instrumental pode substituir os receptores sensoriais (Warner, 1996).

O aroma de óleos e gorduras torna-se mais intenso de acordo com a natureza dos ácidos graxos presentes, principalmente ácidos graxos insaturados, que absorvem o oxigênio do ambiente, formando hidroperóxidos primários. Destes se origina uma série de aldeídos, saturados ou insaturados, através de diferentes vias levando à reversão do flavor, até ao aparecimento do odor de peixe (Ney, 1987).

Às vezes, análises químicas ou físicas apresentam valores discrepantes entre si. Nesse caso, a decisão deve ficar por conta da análise sensorial (Warner, 1996).

Pelo armazenamento do óleo de soja, em pouco tempo há o aparecimento de aroma desagradável de “grão” ou “verde”, indicando mudança ou reversão do flavor. Isto é o resultado da formação de aldeídos insaturados de 2 a 9 carbonos, como 2-pentenal, 2-hexenal, 2-octenal e 2-nonenal, bem como aldeídos com duplas insaturações, como 2,4-hexadienal, 2,4-heptadienal, 2,4-octadienal, 2,4-decadienal, 2,4-undecadienal. A ligação destes dienais resulta da oxidação do ácido linoléico e do ácido linolênico. Tanto os enais, como os dienais apresentam configuração trans (Ney, 1987).

Compostos de odor entram na cavidade nasal e são absorvidos pela mucosa nasal, reagem com os receptores desta e enviam sinais pelo sistema nervoso periférico para o bulbo olfativo. Então sinais eletroquímicos entram no sistema nervoso central, onde a informação é processada (Warner, 1996).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Óleos refinados de canola e milho

Os óleos usados no experimento foram obtidos de uma indústria brasileira, refinados e isentos de antioxidante ou ácido cítrico. Estes óleos foram analisados e em seguida foram envasados em embalagens PET (polietileno tereftalato), obtida de uma indústria produtora de embalagem para óleos vegetais.

Para caracterizar os óleos foram feitas as análises que se seguem.

3.2 Métodos

3.2.1 Análises químicas

3.2.1.1 Índice de acidez

Foram realizadas segundo as normas da AOCS-Ca 5a-40 (1983), através da dissolução de amostras de 5 g de óleo em álcool etílico a quente (60-65⁰C) e titulação com hidróxido de sódio 0,1 N. O volume gasto indicou a porcentagem de ácidos graxos livres (em ácido oléico) através da fórmula:

$$\%AGL = \frac{(\text{mL de hidróxido de sódio} \times 28,2 \times N)}{5} \quad (1)$$

p

Sendo: N = normalidade da solução de hidróxido de sódio

p = peso da amostra em (g)

3.2.1.2 Índice de iodo

Esta análise foi realizada segundo AOCS-Cd 1b-87 (1990), com a dissolução de amostras de 0,2 a 0,22 g de óleo em ciclohexano e ácido acético e em solução de Wijs, durante 60 minutos no escuro e titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,1 N e goma de amido, após adição de KI 15% em excesso e água destilada. Pela diferença entre os volumes gastos na titulação do branco e da amostra, foi obtido o número de mg de iodo absorvido por 100 mg de óleo.

$$I.I. = \frac{[(B-A) \times 12,69 \times N]}{P} \quad (2)$$

Sendo: B = mL de tiosulfato de sódio gastos com o branco

A = mL de tiosulfato de sódio gastos com a amostra

N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio

p = peso da amostra

3.2.1.3 Índice de peróxido

Segundo as normas da AOCS-Cd 8-53 (1983), o índice de peróxido foi realizado através da dissolução de amostras de 5 g de óleo em solução de ácido acético (3:2) e adição de solução de iodeto de potássio saturada, seguida de titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,01 N. O volume gasto após a

adição da goma de amido indicou a concentração de peróxidos em meq/Kg, através da fórmula:

$$IP = \frac{N \times (\text{mL de tiosulfato amostra} - \text{mL de tiosulfato branco}) \times 1000}{p} \quad (3)$$

Sendo: N = Normalidade da solução de tiosulfato de sódio

p = peso da amostra (g)

3.2.2 Análises físicas

3.2.2.1 Absortividade em 232 e 270 nm

De acordo com a NDG C-40 (SSOG, 1976), o óleo foi diluído em isoctano, para que a leitura de absorbância estivesse entre 0,2 e 0,8. Foram utilizados balões de 25 ou 50 mL de capacidade, dependendo do estado oxidativo do óleo. O espectrofotômetro utilizado foi o Shimadzu, modelo UV 1203, sendo os resultados expressos em absortividade pela fórmula:

$$E = A / (c \cdot d) \quad (4)$$

Sendo: E = extinção específica ou absortividade

A = absorbância registrada no comprimento de onda utilizado

c = concentração (g/100 mL) da solução da amostra

d = largura da cubeta utilizada (cm)

3.2.2.2 Espectro de absortividade na faixa do espectro ultravioleta - 220 a 320 nm

Esta análise foi feita de acordo com IUPAC (1979), método II.D.23, com as mesmas diluições em isoctano e o mesmo espectrofotômetro mencionado no item 3.1.2.1. Foi utilizado o programa “Personal Spectroscopy” versão 1.1, e cada valor de absorbância foi convertido em absortividade através do fator de concentração.

3.2.3 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada nos óleos mensalmente, durante os seis meses de armazenamento ao ambiente no Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, da ESALQ/USP, com o objetivo de avaliar o grau de diferença do óleo em relação ao parâmetro odor, entre cada um dos tratamentos aplicados aos dois óleos e um padrão, utilizando uma escala estruturada de 9 categorias, conforme a figura 4, sendo 0 = “igual ao controle” a 8 = “extremamente diferente do controle”. O padrão foi definido como sendo um óleo recém fabricado, adquirido no mercado. O método utilizado foi o de “diferença do controle” (Meilgaard et al., 1999).

Foram utilizados 20 provadores para o óleo de milho e 24 provadores para o óleo de canola. Em cada sessão, os provadores receberam uma amostra padrão (P) e quatro amostras codificadas, sendo uma delas idêntica ao padrão. Para o óleo de milho, as outras amostras corresponderam aos três tratamentos empregados. Para o óleo de canola, como havia quatro tratamentos, utilizou-se análise com blocos incompletos, para se evitar fadiga olfativa dos provadores.

Cada bquer continha 30 mL de amostra, coberto com papel alumnio, as amostras foram codificadas com nmeros de trs dgitos e apresentadas em ordem aleatria.

Avaliação Sensorial – Diferença do Controle – �leo de Milho.	
Nome: _____ tel.: _____	
<p>Você está recebendo uma amostra padrão (P) e 4 amostras codificadas de óleo de milho. Por favor, cheire a amostra padrão, e em seguida, avalie cada uma das amostras codificadas, de acordo com a escala abaixo, o quanto cada amostra difere da amostra padrão, em termos de odor.</p> <p>0 = nenhuma diferença.</p> <p>1</p> <p>2 = ligeiramente diferente do controle.</p> <p>3</p> <p>4 = moderadamente diferente do controle.</p> <p>5</p> <p>6 = muito diferente do controle.</p> <p>7</p> <p>8 = extremamente diferente do controle.</p>	
N� da amostra	Grau de Diferença.
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
Comentários:	

Figura 5 - Questionrio empregado na anlise sensorial.

Fonte: Azeredo (2001)

3.3 Ensaaios

3.3.1 Oxidação acelerada em estufa

Foram feitos testes em estufa, com amostras de 20 g de óleo de canola e milho adicionados de doses crescentes de TBHQ, entre 0 e 200 mg/kg, acondicionadas em béqueres de 50 mL abertos, colocados em estufa a $63 \pm 1^{\circ}\text{C}$, por um período de 120 horas.

As amostras de óleo foram analisadas quanto à absortividade em 232 e 270 nm, espectro na faixa do ultravioleta de 220 a 320 nm e índice de peróxido.

3.3.2 Fotoxidação acelerada em câmara de luz

Neste ensaio foram utilizadas amostras de 20 g de óleo adicionados de doses crescentes de TBHQ, entre 0 e 200 mg/kg, em béqueres de 50 mL abertos, em triplicata, colocadas em uma caixa retangular de dimensões 80 x 35 x 60 cm, de alvenaria, com 6 lâmpadas fluorescentes de 20 W, 3 lâmpadas na parte superior e 3 na parte inferior da caixa (Figura 5), para que a luz atingisse com intensidade máxima todas as amostras. A intensidade luminosa da câmara foi de 2.800 Lux.

O ensaio de fotoxidação acelerada foi conduzido conforme Siqueira (1998) por um período de 168 horas, após o qual as amostras foram submetidas às análises de absortividade em 232 nm e 270 nm e em espectro na faixa de 220 a 320 nm, e índice de peróxido.

Figura 6 - Esquema da Câmara de Fotoxidação.

Fonte: Siqueira (1998)

Os resultados de ambos os testes acelerados serviram de base para a determinação da dose econômica de TBHQ que foi utilizada no ensaio ao ambiente.

3.3.3 Melhor dose e dose econômica

Foi utilizado o programa Microsoft Excel 2000 para obter uma curva de regressão polinomial de doses crescentes do antioxidante TBHQ, e assim determinar sua melhor dose e a dose econômica.

Para obter a curva de regressão polinomial com dados de concentração de TBHQ e índice de peróxido, utilizou-se a seguinte equação quadrática:

$$Y = ax^2 + bx + c \quad (5)$$

Onde: y = índice de peróxido (meq O₂/1000 g de óleo)

x = dose de antioxidante (mg/Kg)

Através da derivada da equação, a melhor dose de TBHQ pode ser calculada.

A dose econômica pode ser calculada através da equação descrita por Gomes (1990):

$$D.E. = [(preço\ do\ óleo / preço\ do\ TBHQ) - b] / 2a \quad (6)$$

Onde: a e b são os valores da equação quadrática.

3.3.4 Armazenamento ao ambiente

As amostras de óleos de canola e milho, adicionados da(s) dose(s) de TBHQ determinadas pela regressão polinomial, além do controle (isento de TBHQ) e da dose máxima estabelecida pela legislação, foram acondicionadas em embalagens PET de 500 mL e armazenadas em condições ambiente, no Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (ESALQ/USP), por seis meses. Foram realizadas análises de absorvidade em 232 e 270 nm espectro na faixa do ultravioleta de 220 a 320 nm e índice de peróxido, mensalmente.

3.3.5 Análise estatística

Os ensaios foram conduzidos em triplicata, no esquema fatorial, modelo inteiramente casualizado, considerando os fatores antioxidante e período de amostragem. Para estes dados foi aplicado teste de Tukey, considerando as médias do fator antioxidante, médias do fator período da amostragem e para médias da interação entre antioxidante e período da amostragem, para cada óleo separadamente, considerando nível de significância de 5 %, através do programa de análise estatística Sanest (Zonta et al., 1992).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Óleo de milho

4.1.1 Caracterização inicial do óleo

O óleo de milho foi analisado no momento da instalação do experimento e apresentou as características encontradas na Tabela 4, em conformidade com o padrão. Segundo a regulamentação do Ministério da Saúde do Brasil, resolução nº 482, anexo 6 (2001), o óleo de milho refinado deve apresentar índice de peróxido menor que 10 meq/kg de óleo e índice de acidez menor que 0,3 g de ácido oléico/100 g de óleo. Além disso, o índice de iodo deve estar entre 103 e 128 mg I/100 mg de óleo.

Tabela 4. Caracterização do óleo de milho refinado.

Análises	Resultados
Acidez (g de ácido oléico/100 g)	0,14
Índice de Peróxido (meq O ₂ /kg)	0,07
Índice de Iodo (mg I/100 mg)	112,10
Absortividade em 232 nm	2,73
Absortividade em 270 nm	1,27

4.1.2 Teste acelerado em estufa

O teste acelerado em estufa para comparar a eficiência do antioxidante TBHQ foi conduzido por 5 dias, pois conforme experimento anterior conduzido por Almeida-Doria (1999) diferenças significativas (5%) nos valores de índice de peróxido dos óleos de soja adicionados de extratos etanólicos de alecrim e de orégano, BHA/BHT e TBHQ só foram encontradas após 5 dias em estufa.

De acordo com a Tabela 5, o óleo de milho adicionado de concentrações crescentes de TBHQ, apresentou valores decrescentes de índice de peróxidos até uma determinada dose, a partir da qual apresentou uma tendência de aumento da concentração de peróxidos, indicando que para o óleo de milho há uma dose de TBHQ mais eficiente e inferior à máxima. Este comportamento também havia sido observado por Gutierrez (1995) em óleo bruto de castanha do Pará, após 5 dias em estufa.

Ainda tendo em vista a Tabela 5, foram observadas alterações nos valores de índice de peróxido em nível de 5% de significância após 5 dias de estufa, sendo a melhor concentração de TBHQ, 125 mg/kg de óleo. Apesar disso, foi observada uma boa estabilidade do óleo de milho ao ensaio em estufa.

Não foi utilizado ácido cítrico como agente sinérgico, pois ensaios preliminares concluíram não haver efeito antioxidante nos óleos utilizados. Contudo, Vieira (1998) observou efeito antioxidante do ácido cítrico em óleo de milho, e, baseada em literatura, atribuiu este efeito à presença de traços de metais no óleo por ela utilizado. A presença de metais de dupla valência, como o ferro, cobalto, manganês e níquel, age sobre os hidroperóxidos, provocando aumento da concentração de radicais livres, aumentando a velocidade de reação, e sua eliminação se dá através do efeito quelante dos ácidos cítrico, fosfórico ou ascórbico, que reduz a atividade de decomposição, exercendo uma atividade de proteção e antioxidante (Rovellini et al., 1997).

Tabela 5. Índice de peróxido (meq O₂/kg de óleo), absorvidade a 232 nm e absorvidade a 270 nm do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ em estufa por 5 dias a 63°C.

Amostra (mg/kg TBHQ)	IP	A _{232 nm}	A _{270 nm}
0	2,32 ^a	6,61 ^a	2,13 ^{ab}
25	2,02 ^{acd}	6,06 ^a	2,17 ^{ab}
50	1,96 ^{acd}	2,74 ^b	1,21 ^c
75	1,70 ^{bcd}	6,61 ^a	2,29 ^{ab}
100	1,96 ^{acd}	2,71 ^b	1,22 ^c
125	1,50 ^b	5,05 ^a	1,87 ^{bc}
150	1,67 ^{bd}	2,66 ^b	1,21 ^c
175	1,56 ^b	9,20 ^a	2,86 ^a
200	1,86 ^{acd}	2,77 ^c	1,23 ^c
CV	4,65%	14,81%	15,86%

CV – coeficiente de variação.

Nota: Os resultados constituem médias de três repetições; as médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%.

4.1.3 Teste acelerado em câmara de luz

Como se vê na Tabela 6, para o teste de fotoxidação acelerada, os valores de peróxido atingidos são, em geral, maiores que os da termoxidação em estufa. Talvez devido a isso, a magnitude dos valores favoreça uma visualização melhor do efeito do TBHQ.

Almeida-Doria (1999) também encontrou uma correlação inversa entre a concentração do TBHQ e o índice de peróxido em óleo de soja sob fotoxidação acelerada por 5 dias de óleo de soja. Siqueira (1998) comparando a estabilidade fotoxidativa de óleos de soja, milho e canola, observou que, dos três óleos, o mais

estável foi o de milho, confirmando que a presença de agentes fotosensibilizadores, como a clorofila, aliada à composição em ácidos graxos do óleo podem acelerar o início da fotoxidação.

Assim como o índice de peróxido, as absorptividades em 232 nm e em 270 nm também acompanharam a tendência de serem menores com o aumento da concentração de TBHQ, apesar de a absorptividade em 232 nm não ter apresentado diferença em 5% de significância para os tratamentos em questão.

Tabela 6. Índice de peróxido (meq O₂/kg de óleo), absorptividade a 232 nm e absorptividade a 270 nm do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ em câmara de fotoxidação por 7 dias.

Amostra (mg/kg TBHQ)	IP	A _{232 nm}	A _{270 nm}
0	33,08 ^a	21,73 ^a	5,16 ^{ab}
25	22,31 ^b	19,19 ^a	4,70 ^{ab}
50	15,81 ^{bc}	15,25 ^a	3,66 ^{ab}
75	22,54 ^b	23,24 ^a	6,43 ^a
100	15,38 ^{bc}	12,49 ^a	3,38 ^{ab}
125	19,07 ^{bc}	15,69 ^a	3,91 ^{ab}
150	16,03 ^{bc}	11,72 ^a	2,94 ^b
175	19,56 ^{bc}	12,75 ^a	3,42 ^{ab}
200	11,29 ^c	11,97 ^a	3,28 ^b
CV	17,96%	37,10%	26,55%

CV – coeficiente de variação.

Nota: Os resultados constituem médias de três repetições; as médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%.

4.1.4 Melhor dose e dose econômica

A partir dos testes de estufa pode-se determinar a melhor dose e a dose econômica de TBHQ para o óleo de milho.

Assim, obteve-se a equação:

$$y = 0,00005 x^2 - 0,0119 x + 2,3313 \quad (7)$$

Onde: y = índice de peróxido (meq O₂/1000 g óleo)

x = dose de TBHQ (mg/kg)

a = 0,00005

b = - 0,0119

c = 2,3313

Derivando-se a equação e igualando-a a zero:

$$dy/dx = 0 \Rightarrow 0,0001 x - 0,0119 = 0$$

calculou-se a melhor dose de TBHQ para o óleo de milho que foi:

$$x = 119 \text{ mg/kg.}$$

A dose econômica foi calculada considerando o preço do óleo de milho refinado como US\$ 701,47/ton e o preço do TBHQ como US\$ 30,00/Kg (setembro/2001). A equação da dose econômica (D.E.) utiliza os coeficientes da equação quadrática em módulo.

$$D.E. = [(preço do óleo / preço do TBHQ) - b] / 2 \times a \quad (8)$$

Assim:

$$D.E. = [(0,70147 / 30,00) - 0,0119] / 2 \times 0,00005 \quad (9)$$

Obteve-se, então, o valor de 115 mg/kg de TBHQ como dose econômica para o óleo de milho.

Como os valores de melhor dose e dose econômica foram muito próximos, resolveu-se utilizar no ensaio ao ambiente o menor valor (115 mg/kg).

Almeida-Doria (1999), após 7 dias de estufa a 63⁰C, utilizando 0, 25, 75, 100 e 200 mg/kg como concentrações de TBHQ em óleo de soja, determinou a melhor dose de TBHQ neste óleo, como 128,85 mg/kg e 126,09 mg/kg, como dose econômica, utilizando a mesma sistemática.

4.1.5 Ensaio ao ambiente

A caracterização do óleo de milho para o ensaio ao ambiente foi realizada no preparo do ensaio ao ambiente e está apresentada na Tabela 8. Foram encontradas características diferentes das observadas antes dos ensaios acelerados, entretanto os valores de índice de peróxido, acidez e iodo se apresentaram dentro do limite da legislação (10meq/kg peróxido, 0,3 g de ácido oléico/100 g e 103-128 mg I/100mg, respectivamente).

Tabela 7. Caracterização do óleo de milho refinado.

Análises	Resultados
Acidez (g de ácido oléico/100 g)	0,12
Índice de Peróxido (meq O ₂ /Kg)	0,95
Índice de Iodo (mg I/100 mg)	110,31
Absortividade em 232 nm	2,40
Absortividade em 270 nm	1,07

Na Tabela 8, pode-se verificar que até 2 meses e no quarto mês, não foram encontradas diferenças significativas (5%) entre os tratamentos. Porém, nos demais meses, uma diferença significativa foi observada, tendo o TBHQ demonstrado uma proteção sobre o óleo de milho, além de comprovar a eficiência de doses menores que a dose máxima de TBHQ contra a oxidação. Apesar disso, o óleo de milho sem adição de antioxidante ainda apresentou um índice de peróxido abaixo do limite da legislação. Isto ratifica o observado no ensaio feito em estufa e o no trabalho de Siqueira (1998).

Tabela 8. Índice de peróxido (meq O₂/kg de óleo) do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.

Tratamentos	Tempo (meses)						
	0	1	2	3	4	5	6
Controle	0,95 ^{aE}	1,41 ^{aE}	2,90 ^{aD}	3,40 ^{aD}	4,11 ^{aC}	6,78 ^{aB}	8,31 ^{aA}
115 mg/kg	0,95 ^{aD}	1,20 ^{aD}	2,34 ^{abC}	2,73 ^{bC}	3,96 ^{aB}	3,96 ^{bB}	4,88 ^{bA}
200 mg/kg	0,95 ^{aD}	1,16 ^{aD}	2,70 ^{bC}	2,74 ^{bC}	3,67 ^{aB}	3,83 ^{bB}	4,77 ^{bA}

CV = 8,21%.

Nota: Os resultados constituem médias de três repetições; as médias seguidas por letras minúscula, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%. E por letras maiúsculas, na horizontal, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%.

Não foram observadas diferenças significativas (5%) na absorvidade em 232 nm até 4 meses, na Tabela 9. A partir do quinto mês, observou-se diferença significativa entre o controle e os demais tratamentos, fazendo-se ver a ação de conservação do antioxidante em duas doses e o mesmo comportamento encontrado com o índice de peróxido.

Através da Tabela 10, percebe-se que a análise de absorvidade em 270 nm não detectou diferenças entre os tratamentos. Siqueira (1998) já havia observado o mesmo comportamento em ensaio ao ambiente para o óleo de milho, adicionado de BHT e BHA.

Para o índice de acidez foram observadas diferenças somente entre o tempo inicial e os demais tempos de armazenamento, não apresentando em cada tempo diferença entre tratamentos.

Pela Tabela 12, observa-se que para o índice de iodo também não houve variações estatísticas entre os tratamentos, apesar de uma diminuição numérica

deste ter ocorrido ao longo do período de armazenamento, como também havia sido observado por Siqueira (1998).

Tabela 9. Absortividade em 232 nm do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.

Tratamentos	Tempo (meses)						
	0	1	2	3	4	5	6
Controle	2,40 ^{aBC}	2,44 ^{aBC}	2,35 ^{aC}	2,34 ^{aC}	2,65 ^{aB}	3,20 ^{aA}	3,14 ^{aA}
115 mg/kg	2,40 ^{aAB}	2,41 ^{aAB}	2,27 ^{aB}	2,25 ^{aB}	2,65 ^{aA}	2,61 ^{bA}	2,62 ^{bA}
200 mg/kg	2,40 ^{aAB}	2,44 ^{aAB}	2,34 ^{aB}	2,39 ^{aAB}	2,61 ^{aA}	2,64 ^{bA}	2,57 ^{bAB}

CV = 4,09%.

Nota: Os resultados constituem médias de três repetições; as médias seguidas por letras minúscula, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%. E por letras maiúsculas, na horizontal, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%.

Tabela 10. Absortividade em 270 nm do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.

Tratamentos	Tempo (meses)						
	0	1	2	3	4	5	6
Controle	1,07 ^{aB}	1,05 ^{aB}	1,04 ^{aBC}	1,04 ^{abBC}	1,10 ^{aA}	1,01 ^{bC}	1,11 ^{aA}
115 mg/kg	1,07 ^{aBC}	1,04 ^{aCD}	1,01 ^{aDE}	1,00 ^{bE}	1,10 ^{aAB}	1,03 ^{aDE}	1,12 ^{aA}
200 mg/kg	1,07 ^{aB}	1,05 ^{aB}	1,04 ^{aB}	1,06 ^{aB}	1,07 ^{bB}	1,05 ^{aB}	1,14 ^{aA}

CV = 2,41%.

Nota: Os resultados constituem médias de três repetições; as médias seguidas por letras minúscula, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%. E por letras maiúsculas, na horizontal, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%.

Tabela 11. Índice de Acidez (ácido oléico - %) do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.

Tratamentos	Tempo (meses)		
	0	3	6
Controle	0,12 ^{aA}	0,11 ^{aB}	0,11 ^{aB}
115 mg/kg	0,12 ^{aA}	0,11 ^{aB}	0,11 ^{aB}
200 mg/kg	0,12 ^{aA}	0,11 ^{aB}	0,11 ^{aB}

CV = 0,03%.

Nota: Os resultados constituem médias de três repetições; as médias seguidas por letras minúscula, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%. E por letras maiúsculas, na horizontal, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%.

Tabela 12. Índice de lodo (mg/100mg de óleo) do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.

Tratamentos	Tempo (meses)		
	0	3	6
Controle	110,31 ^{aA}	107,92 ^{aB}	103,80 ^{bC}
115 mg/kg	110,31 ^{aA}	108,34 ^{aB}	105,11 ^{aC}
200 mg/kg	110,31 ^{aA}	107,65 ^{aB}	103,92 ^{bC}

CV = 0,58%.

Nota: Os resultados constituem médias de três repetições; as médias seguidas por letras minúscula, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%. E por letras maiúsculas, na horizontal, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%.

Nos espectros das figuras de 7 a 10 não foram encontradas diferenças entre as curvas, mostrando não haver diferença entre os tratamentos até o quarto mês, refletindo o comportamento encontrado para a absortividade em 232 nm e indiretamente pelo índice de peróxido, pois estão relacionados. Nas figuras 11 e 12, observou-se diferença nas curvas na faixa 220 e 250 nm entre o controle e os demais tratamentos (quinto e sexto meses), que inclui a absortividade em 232 nm, já comentada na Tabela 9. Para as concentrações de 115 e 200 mg/kg, as curvas não apresentaram diferença entre si, confirmando que a melhor dose não é necessariamente o limite estabelecido pela legislação, mas sim um valor abaixo, ratificando o poder antioxidante do TBHQ em doses mais econômicas.

Figura 7 - Espectros de absortividade na faixa do UV do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado por 1 mês.

Figura 8 - Espectros de absorptividade na faixa do UV do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado por 2 meses.

Figura 9 - Espectros de absorptividade na faixa do UV do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado por 3 meses.

Figura 10 - Espectros de absorptividade na faixa do UV do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado por 4 meses.

Figura 11 - Espectros de absorptividade na faixa do UV do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado por 5 meses.

Figura 12 - Espectros de absorvidade na faixa do UV do óleo de milho adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado por 6 meses.

A análise sensorial do odor dos óleos detectou diferença entre os tratamentos. Observou-se na figura 13 que o melhor tratamento ao fim de 6 meses foi 115 mg/kg TBHQ. Entretanto, durante as análises, pôde-se verificar que provadores não treinados, como o caso dos consumidores, tiveram dificuldade em detectar a diferença de odor entre os tratamentos. Isto pode ser visto ao comparar-se a média dos provadores no tempo 1, por exemplo, com o tempo 6, no qual se observa que os provadores perceberam a maior diferença com o padrão no tempo 1, que físico-quimicamente era mais próximo ao padrão, que no tempo 6, que já estava armazenado pelo período de 6 meses, correspondente ao tempo de vida útil de um óleo embalado em frasco de PET.

Figura 13 - Média das notas dadas pelos provadores, em análise sensorial, durante o período de estocagem do óleo de milho.

4.2 Óleo de canola

4.2.1 Caracterização inicial do óleo

O óleo de canola foi analisado ao se instalar o experimento e apresentou as características encontradas na Tabela 13.

Tabela 13. Caracterização do óleo de canola refinado.

Análises	Resultados
Acidez (g de ácido oléico/100 g)	0,11
Índice de Peróxido (meq O ₂ /kg)	0,17
Índice de Iodo (mg I/100 mg)	123,31
Absortividade em 232 nm	5,21
Absortividade em 270 nm	0,63

4.2.2 Teste acelerado em estufa

Ao compararem-se os dados da Tabela 6 com a Tabela 14, observa-se, além do efeito protetor contra a oxidação do TBHQ, comportamentos bastante diferentes entre os óleos de canola e de milho. Diferentemente do observado por Vieira (1998), pôde-se observar uma reatividade maior do óleo de canola à temperatura de 63⁰C que o óleo de milho, o que pode ser devido à sua composição em ácidos graxos, apresentando diferença em nível de 5% de significância entre o controle e os demais tratamentos.

Com relação à absortividade em 232 nm, foi observada diferença significativa, em nível de 5% entre os tratamentos, sendo o melhor o de 125 mg/kg de TBHQ.

Para a absortividade em 270 nm, não foram observadas diferenças significativas em 5% entre os tratamentos.

Tabela 14. Índice de peróxido (meq Q/kg de óleo), absorvividade a 232 nm e absorvividade a 270 nm do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ em estufa por 5 dias a 63°C.

Amostra (mg/kg TBHQ)	IP	A _{232 nm}	A _{270 nm}
0	13,97 ^a	14,37 ^{bc}	2,56 ^a
25	1,77 ^b	-	2,65 ^a
50	1,77 ^b	12,20 ^{bc}	2,59 ^a
75	1,81 ^b	15,86 ^a	3,14 ^a
100	1,50 ^b	11,73 ^{bc}	2,33 ^a
125	1,84 ^b	11,23 ^{abc}	2,50 ^a
150	1,11 ^b	12,81 ^{bc}	2,63 ^a
175	1,81 ^b	13,12 ^{ab}	2,71 ^a
200	1,29 ^b	11,98 ^c	2,44 ^a
CV	41,77%	5,61%	17,66%

CV – coeficiente de variação.

Nota: Os resultados constituem médias de três repetições; as médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%.

Vieira (1998) havia trabalhado com óleo de canola e a mistura dos antioxidantes fenólicos BHA + BHT (200 mg/kg), ácido cítrico (100 mg/kg) e BHA+BHT (200 mg/kg) + ácido cítrico (100 mg/kg), não encontrando diferença entre os tratamentos citados e o controle (sem adição de antioxidante e ácido cítrico) até o quinto dia de estufa na absorvividade em 232 nm e no índice de peróxido. Em relação à absorvividade em 270 nm, não foram observadas grandes alterações nos valores para os tratamentos utilizados.

4.2.3 Teste acelerado em câmara de luz

Através da Tabela 15, observou-se que ocorreu uma diminuição tanto do índice de peróxido quanto da absortividade em 232 nm com o aumento da concentração do TBHQ no óleo de canola.

Com respeito ao índice de peróxido, entre o controle e a concentração de 25 mg/kg não houve diferença significativa, mas a partir da concentração de 50 mg/kg, pôde-se observar o efeito do TBHQ nas amostras, sendo que a partir da concentração de 75 mg/kg não houve diferença significativa em 5% entre os tratamentos.

Já para as absortividades, em 232 nm só foi observado efeito do TBHQ em nível de 5% de significância para as concentrações de 100 e 150 mg/kg. Em 270 nm, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos.

Siqueira (1998), em ensaio de fotoxidação acelerado com óleos de milho, canola e soja, adicionados de 200 mg/kg de TBHQ, 500 mg/kg de α -tocoferol, 1 mg/kg de β -caroteno, 200 mg/kg de BHA+BHT, 200 mg/kg de BHA+BHT+100 mg/kg de ácido cítrico, e 100 mg/kg de ácido cítrico, observou que somente o tratamento com 200 mg/kg de TBHQ apresentou efeito protetor aos três óleos, a despeito dos demais tratamentos.

Tabela 15. Índice de peróxido (meq Q/kg de óleo), absorvidade a 232 nm e absorvidade a 270 nm do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ em câmara de fotoxidação por 7 dias.

Amostra (mg/kg TBHQ)	IP	A _{232 nm}	A _{270 nm}
0	41,65 ^{ab}	17,44 ^a	2,47 ^a
25	42,65 ^a	16,68 ^{ab}	2,82 ^a
50	31,26 ^{bc}	14,79 ^{ab}	2,53 ^a
75	27,34 ^{cd}	14,78 ^{ab}	2,70 ^a
100	26,50 ^{cd}	11,51 ^b	1,77 ^a
125	20,76 ^{cd}	14,79 ^{ab}	2,81 ^a
150	23,84 ^{cd}	11,66 ^b	1,88 ^a
175	20,31 ^{cd}	15,22 ^{ab}	2,92 ^a
200	19,51 ^d	14,51 ^{ab}	2,53 ^a
CV	13,90%	13,43%	20,30%

CV – coeficiente de variação.

Nota: Os resultados constituem médias de três repetições; as médias seguidas pela mesma letra, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%.

4.2.4 Melhor dose e dose econômica

Foram definidas a melhor dose e a dose econômica de TBHQ para o óleo de canola, após 5 dias de estufa a 63⁰C, cuja equação foi determinada do mesmo modo que para o óleo de milho.

Assim, obteve-se a seguinte equação para o óleo de canola:

$$y = 0,0007 x^2 - 0,1928 x + 12,65 \quad (10)$$

Onde: y = índice de peróxido (meq O₂/1000 g óleo)

x = dose de TBHQ (mg/kg)

a = 0,0007

b = - 0,1928

c = 12,65

Derivando-se a equação e igualando-a a zero:

$$dy/dx = 0 \Rightarrow 0,0014 x - 0,1928 = 0$$

Pender-se-ia calcular a melhor dose de TBHQ para o óleo de canola como 137,7 mg/kg. Porém, este valor de concentração seria referente a um índice de peróxido negativo, já que a equação polinomial quadrática para a melhor curva representativa dos pontos obtidos experimentalmente apresentou duas raízes reais positivas e distintas. Assim, para o cálculo da melhor dose, calcularam-se as duas raízes, e optou-se pela de menor valor, já que ambas apresentariam o valor nulo do índice de peróxido.

Então a concentração para a melhor dose de TBHQ no óleo de canola foi de 108 mg/kg.

A dose econômica foi calculada considerando o preço do óleo de canola refinado como US\$ 900,74/ton (setembro/2001).

$$D.E. = [(preço do óleo / preço do TBHQ) - b] / 2 \times a \quad (11)$$

Assim:

$$D.E. = [(0,90074 / 30,00) - 0,1928] / 2 \times 0,0007 \quad (12)$$

Através da equação 5 obteve-se o valor de 116 mg/kg de TBHQ como dose econômica para o óleo de canola. Por este valor ser maior que o da melhor dose encontrada, foi utilizado no ensaio ao ambiente o valor da melhor dose.

Como no teste em estufa não houve diferença significativa entre os valores de índice de peróxido entre a concentração de 25 mg/kg de TBHQ e as demais concentrações, decidiu-se por verificar como esta se comportaria no ensaio ao

ambiente em comparação com as outras. Assim, para o ensaio ao ambiente utilizou-se óleo sem adição de TBHQ (controle), 25 mg/kg, 108 mg/kg e 200 mg/kg.

Em ensaio em estufa a 62,8°C, por 120 horas, para um intervalo de 0 a 100 mg/kg de TBHQ, Gutierrez (1995) encontrou como melhor dose de TBHQ para óleo bruto de castanha do Pará 84,95 mg/kg, e 82,37 mg/kg como dose econômica.

4.2.5 Ensaio ao ambiente

A caracterização do óleo de canola para o ensaio ao ambiente foi realizada no preparo deste e é apresentada na Tabela 16. Foram encontradas características diferentes das observadas antes dos ensaios acelerados, entretanto os valores de índice de peróxido, acidez e iodo se apresentaram, segundo a regulamentação do Ministério da Saúde do Brasil, resolução nº 482, anexo 4 (2001), dentro do limite da legislação (10meq/kg peróxido, 0,3 g de ácido oléico/100 g e 110-126 mg I/100mg, respectivamente).

Tabela 16. Caracterização do óleo de canola refinado.

Análises	Resultados
Acidez (g de ácido oléico/100 g)	0,11
Índice de Peróxido (meq O ₂ /kg)	0,93
Índice de Iodo (mg I/100 mg)	119,35
Absortividade em 232 nm	5,46
Absortividade em 270 nm	0,67

Através da Tabela 17, pôde-se observar que não houve diferença em nível de 5% para o índice de peróxido no primeiro mês do ensaio. Mas a partir do segundo mês, verifica-se esta diferença entre os tratamentos, apresentando-se

maior no mês 4. Contudo, no mês 5, o índice de peróxido das amostras adicionadas de TBHQ aumentou aproximando-se dos valores da amostra controle, até chegar aos valores do mês 6 quando não houve diferença significativa entre as amostras, em nível de 5%. Contudo, as amostras adicionadas de TBHQ apresentaram valores de índice de peróxido menores que o controle.

Com relação às amostras ao longo do tempo, para a amostra controle, observou-se diferença em nível de 5% já a partir do segundo mês, e então até o sexto mês não houve diferença significativa entre os meses. Para as demais concentrações, tem-se diferença a partir do terceiro mês, sendo que entre o quinto e o sexto mês não foi observada diferença significativa entre as amostras, apresentando as três concentrações em teste comportamentos semelhantes ao longo do tempo. Além disso, observa-se aumento nos valores de índice peróxido do primeiro para o segundo mês para a amostra controle, enquanto que para as amostras adicionadas de TBHQ, este aumento foi retardado, apresentando-se mais lento ainda para as amostras adicionadas de 108 e 200 mg/kg TBHQ.

Através da Tabela 18, pôde-se observar que não houve diferença em nível de 5% para a absorvidade em 232 nm no primeiro mês do ensaio. Mas a partir do segundo mês, verifica-se esta diferença entre a concentração de 200 mg/kg e os demais tratamentos, apresentando-se maior nos meses 5 e 6, sendo a melhor concentração 108 mg/kg no quinto mês. Porém, no sexto mês, todos os tratamentos continuaram apresentando diferenças significativas, como no tempo anterior, sendo o melhor tratamento 108 mg/kg TBHQ.

Com relação às amostras ao longo do tempo, para a amostra controle, observou-se diferença em nível de 5% a partir do terceiro mês, e tendo a partir daí apresentado diferença significativa com o tempo até o fim do ensaio. Para as concentrações de 25 e 108 mg/kg, tem-se diferença a partir do segundo mês, permanecendo estável até o quarto mês, apresentando um pico no quinto mês e

diminuindo no sexto mês. A concentração de 200 mg/kg apresentou-se estável até o quarto mês, aumentando no quinto mês e atingindo o máximo valor no sexto mês.

Tabela 17. Índice de peróxido (meq O₂/kg de óleo) do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.

Tratamentos	Tempo (meses)						
	0	1	2	3	4	5	6
Controle	0,93 ^{aC}	2,51 ^{aC}	6,52 ^{aB}	7,16 ^{aAB}	7,51 ^{aA}	8,20 ^{aA}	8,06 ^{aAB}
25 mg/kg	0,93 ^{aF}	2,38 ^{aEF}	3,48 ^{bDE}	4,61 ^{bCD}	5,90 ^{bBC}	7,12 ^{abAB}	7,88 ^{aA}
108 mg/kg	0,93 ^{aE}	2,26 ^{aDE}	3,53 ^{bCD}	4,51 ^{bBC}	4,79 ^{bcBC}	6,12 ^{bAB}	7,18 ^{aA}
200 mg/kg	0,93 ^{aE}	2,12 ^{aDE}	3,01 ^{bCD}	3,35 ^{bCD}	4,34 ^{cBC}	5,75 ^{bAB}	7,02 ^{aA}

CV = 14,32%.

Nota: Os resultados constituem médias de três repetições; as médias seguidas por letras minúsculas, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%. E por letras maiúsculas, na horizontal, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%.

Tabela 18. Absortividade em 232 nm do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.

Tratamentos	Tempo (meses)						
	0	1	2	3	4	5	6
Controle	5,56 ^{aF}	5,91 ^{aEF}	6,17 ^{abE}	6,60 ^{aD}	10,76 ^{aC}	14,32 ^{cB}	15,20 ^{aA}
25 mg/kg	5,56 ^{aE}	5,88 ^{aDE}	6,32 ^{abC}	6,24 ^{bCD}	6,52 ^{bC}	15,84 ^{aA}	11,97 ^{cB}
108 mg/kg	5,56 ^{aE}	5,93 ^{aDE}	6,47 ^{aC}	6,13 ^{bCD}	6,20 ^{bCD}	15,20 ^{bA}	11,44 ^{dB}
200 mg/kg	5,56 ^{aD}	5,98 ^{aC}	6,07 ^{bC}	6,12 ^{bC}	6,32 ^{bC}	6,89 ^{dB}	13,89 ^{bA}

CV = 1,94%.

Nota: Os resultados constituem médias de três repetições; as médias seguidas por letras minúsculas, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%. E por

letras maiúsculas, na horizontal, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%.

Na Tabela 19, observou-se que não houve diferença em nível de 5% para a absortividade em 270 nm até o terceiro mês do ensaio. Mas a partir do quarto mês, verificou-se diferença em nível de 5% entre o controle e as demais concentrações, apresentando-se maior nos meses 5 e 6. As melhores concentrações de TBHQ foram 25 e 108 mg/kg no sexto mês, não apresentando diferença significativa entre si.

Com relação às amostras ao longo do tempo, para a amostra controle, observou-se diferença em nível de 5% a partir do quarto mês e também no mês 5, porém entre este e o mês 6 não houve diferença significativa. Para as concentrações de 25 e 108 mg/kg, observa-se diferença a partir do quinto e sexto meses, sem que apresentassem entre si diferença significativa. Para o tratamento 200 mg/kg, observa-se uma estabilidade até o quinto mês, aumentando somente no sexto mês.

Tabela 19. Absortividade em 270 nm do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.

Tratamentos	Tempo (meses)						
	0	1	2	3	4	5	6
Controle	0,67 ^{aC}	0,67 ^{aC}	0,68 ^{aC}	0,69 ^{aC}	1,96 ^{aB}	2,58 ^{bA}	2,75 ^{aA}
25 mg/kg	0,67 ^{aC}	0,66 ^{aC}	0,73 ^{aC}	0,70 ^{aC}	0,83 ^{bC}	2,89 ^{aA}	1,89 ^{cB}
108 mg/kg	0,67 ^{aC}	0,67 ^{aC}	0,77 ^{aC}	0,66 ^{aC}	0,70 ^{bC}	2,64 ^{bA}	1,93 ^{cB}
200 mg/kg	0,67 ^{aB}	0,68 ^{aB}	0,70 ^{aB}	0,68 ^{aB}	0,79 ^{bB}	0,91 ^{cB}	2,38 ^{bA}

CV = 8,69%.

Nota: Os resultados constituem médias de três repetições; as médias seguidas por letras minúsculas, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%. E por

letras maiúsculas, na horizontal, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%.

Pela Tabela 20, observa-se que para o índice de acidez houve variações estatísticas entre os tratamentos ao longo do período de armazenamento, mas não de forma homogênea como observado para o óleo de milho.

Pela Tabela 21, observa-se que para o índice de iodo não houve variações estatísticas entre os tratamentos em cada tempo, apesar de ter ocorrido uma diminuição estatística deste ao longo do período de armazenamento, como observado também para o óleo de milho.

Com relação ao espectro de absortividade, ao se observarem as figuras 14 a 19, verifica-se que até o terceiro mês não ocorreram diferenças, mas no quarto mês observa-se que o controle destaca-se dos demais tratamentos. No quinto mês, somente o tratamento de 200 mg/kg de TBHQ não sofreu um aumento significativo, e no sexto mês, verifica-se que os melhores tratamentos foram 25 e 108 mg/kg de TBHQ.

Tabela 20. Índice de Acidez (ácido oléico - %) do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.

Tratamentos	Tempo (meses)		
	0	3	6
Controle	0,11 ^{aA}	0,11 ^{aA}	0,10 ^{bcB}
25 mg/kg	0,11 ^{aA}	0,10 ^{abB}	0,09 ^{cC}
108 mg/kg	0,11 ^{aA}	0,09 ^{bB}	0,11 ^{abA}
200 mg/kg	0,11 ^{aA}	0,10 ^{abB}	0,11 ^{aA}

CV = 5,66%.

Nota: Os resultados constituem médias de três repetições; as médias seguidas por letras minúsculas, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%. E por

letras maiúsculas, na horizontal, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%.

Tabela 21. Índice de lodo (mg/100mg de óleo) do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET e armazenado em condição ambiente.

Tratamentos	Tempo (meses)		
	0	3	6
Controle	119,35 ^{aA}	115,08 ^{bB}	111,24 ^{bC}
25 mg/kg	119,35 ^{aA}	115,17 ^{aB}	111,42 ^{bC}
108 mg/kg	119,35 ^{aA}	115,43 ^{aB}	111,75 ^{aC}
200 mg/kg	119,35 ^{aA}	115,24 ^{aB}	111,44 ^{bC}

CV = 0,25%.

Nota: Os resultados constituem médias de três repetições; as médias seguidas por letras minúsculas, na vertical, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%. E por letras maiúsculas, na horizontal, não diferem significativamente pelo teste de Tukey, em 5%.

Figura 14 - Espectros de absorvidade na faixa do UV do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET armazenado por 1 mês.

Figura 15 - Espectros de absorvidade na faixa do UV do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET armazenado por 2 meses.

Figura 16 - Espectros de absorptividade na faixa do UV do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET armazenado por 3 meses.

Figura 17 - Espectros de absorptividade na faixa do UV do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET armazenado por 4 meses.

Figura 18 - Espectros de absorptividade na faixa do UV do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET armazenado por 5 meses.

Figura 19 - Espectros de absorptividade na faixa do UV do óleo de canola adicionado de diferentes concentrações de TBHQ, acondicionado em frascos de PET armazenado por 6 meses.

A análise sensorial do óleo de canola apresentada na figura 20 confirma o que foi observado para a mesma análise no óleo de milho. A utilização de provadores não treinados demonstra que a maioria das pessoas não detecta leve odor de ranço em óleos vegetais ou, quando detectado, muitas vezes esses odores são desejáveis, pois se relacionam a alimentos da preferência como frituras.

Figura 20 - Média das notas dadas pelos provadores, em análise sensorial, durante o período de estocagem do óleo de canola.

5 CONCLUSÕES

O TBHQ demonstrou ter efeito protetor sobre o óleo de milho e de canola contra a oxidação tanto acelerada (termo e fotoxidação) como em temperatura ambiente.

O teste de estufa de Schaal, acompanhado da determinação de índice de peróxido, provou ser um procedimento adequado para a determinação de uma dose eficiente e econômica de antioxidante TBHQ.

Além disso, confirmou-se a hipótese da não necessidade de se utilizar a máxima dose estabelecida pela legislação para se alcançar o efeito desejado em condições ambientes, já que de acordo com os resultados obtidos, a dosagem de 115 mg/kg demonstrou ser eficiente para o óleo de milho. Para o óleo de canola, a dose de 108 mg/kg foi mais eficiente que a de 25 mg/kg de TBHQ e 200 mg/kg de TBHQ.

Não foi possível obter resultados conclusivos com a análise sensorial do modo como foi conduzida. Provadores não treinados não foram capazes de detectar diferenças sutis com relação ao odor dos óleos não aquecidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLINGER, N.L.; CAVA, M.P.; JONGH, D.C. et al. **Química orgânica**. Rio de Janeiro: Edgard Bluecher, 1978. 961p.
- ALBUQUERQUE, A.J.; ANJOS, C.A.R. PET: packaging for edible oils. In: INTERNATIONAL MEETING ON FATS & OILS TECHNOLOGY, Campinas, 1991. **Proceedings**. Campinas: Unicamp, 1991. p.138-139.
- 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. Piracicaba, 1999. 71p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices**. 4.ed. Champaign: AOCS, 1990. 2v.
- ATKINS, P.W. Atomic structure and atomic spectra. In: ATKINS, P.W. **Physical chemistry**. Oxford: Oxford University Press, 1991. cap.13. p.347-386.
- ASAP, T.; AUGUSTIN, M.A. Effect of TBHQ on quality characteristics of RBD Olein during frying. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.63, n.9, p.1169-1172, 1986.
- AWL, R.A.; FRANKEL, E.N.; WEISLEDER, D. Cyclic fatty esters: hydroperoxides from autoxidation of methyl 9-(6-propyl-3-cyclohexenyl)-(Z) 8-nonenoate. **Lipids**, v.22, n.10, p.721-730, 1987.

- AZEREDO, H.M.C. Maximização da estabilidade oxidativa de óleo de soja acondicionado em garrafas plásticas. Campinas, 2001. 131p. Dissertação (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- BACCAN, N.; ANDRADE, J.C.; GODINHO, O.E.S. et al. Práticas de laboratório. In: BACCAN, N.; ANDRADE, J.C.; GODINHO, O.E.S. et al. **Química analítica qualitativa elementar**. Campinas: Ed. Unicamp, 1985. cap.8, p.154-212.
- BEKBÖLET, M. Lights effects in food. **Journal of Food Protection**, v.53, n.5, p.430-440, 1990.
- 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. cap.7, p.192-204.
- BERSET, C.; CUVELIER, M. E. Méthodes d'évaluation du degré d'oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxydant. **Sciences des Aliments**, v.16, p.219-245, 1996.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 04/88. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da legislação de alimentos**. São Paulo: ABIA, 2001. v.1, p.3.26.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 482 – ANVS/MS de 23 de Setembro de 1999. Anexo 4. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da legislação de alimentos**. São Paulo: ABIA, 2001. v.1/A, p.7.8 (00).

- BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 482 – ANVS/MS de 23 de Setembro de 1999. Anexo 6. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da legislação de alimentos**. São Paulo: ABIA, 2001. v.1/A, p.7.9 (00).
- CARR, R.A. Rapeseed/Canola. In: WORLD CONFERENCE PROCEEDINGS EDIBLE FATS AND OILS PROCESSING: basic principles and modern practices. **Proceedings**. Champaign: AmericanOCS, 1990. p.289-298.
- CHAHINE, M.H.; MACNEILL, R.F. Effect of stabilization of crude whale oil with tertiary-butylhydroquinone and other antioxidants upon keeping quality of resultant deodorized oil: a feasibility study. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.51, n.3, p.37-41, 1974.
- DUTTON, H.J. Analysis of fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.55, p.806-808, 1978.
- ESPINOZA-ATENCIA, E.J.; FARIA, J.A.F. Fotoxidação de óleos comestíveis em embalagens plásticas transparentes. **Óleos e Grãos**, n.19, p.44-51. jul./ago. 1994.
- ESTERBAUER, H. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.57, n.5, p.S779-S786, 1993. Supplement.
- FARIA, J.A.F.; ESPINOZA-ATENCIA, E.J. Efeito da cor das garrafas de vinila (PVC) na fotoxidação de óleos de soja. **Óleos e Grãos**, n.11, p.40-44, mar./abr. 1993.
- FARIA, J.A.F. A função da embalagem na estabilidade de óleos vegetais. **Óleos e Grãos**, n.6, p.50-52, 1991.
- FARIA, J.A.F. Antioxidantes e estabilidade de óleos comestíveis. **Óleos e Grãos**, n.20, p.32-34, 1994.

- FERRARI, C.K.B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista da Nutrição**, v.11, n.1, p.3-14. 1998.
- GATCHER, R.; MULLER, H. **Plastics additives handbook**. Munich: Hanser Publishers, 1987. p. 97-192.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. São Paulo: Nobel, 1990, 468p.
- GRAY, J.I. Measurement of lipid oxidation: a review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.55, p.538-546, 1978.
- GUNSTONE, F.D. Chemical properties. In: GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L.; PADLEY, F.B. (Ed.). **The lipid handbook**. London: Chapman & Hall, 1994. cap.10, p.566-571.
- GUTIERREZ, E.M.R. Estabilidade oxidativa de óleo bruto da castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*). Piracicaba, 1995. 83p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- HAMAMA, A.A.; NAWAR, W.W. Thermal decomposition of some phenolic antioxidants. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.39, n.6, p.1063-1069, 1991.
- HILL, S.E. Comparisons: measuring oxidative stability. **Inform**, v.5, n.1, p.104-109, 1994.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 6.ed. Oxford: IUPAC, 1979. p.71.
- KANNER, J. Mechanism of nonenzymic lipid peroxidation in muscle foods. In: St. ANGELO, A.J. **Lipid oxidation in food**. Washington: American Chemical Society, 1992. cap.4, p.55-73.
- KANNER, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. **Meat Science**, v.36, n.1/2, p.169-189, 1994.

- KIRK, J.R. Biological availability of nutrients in processed foods. **Journal of Chemical Education**, v.61, n.4, p.364-367, 1984.
- KURECHI, T.; AIZAWA, M.; KUNUGI, A. Studies on the antioxidants XVIII: oxidation products of tertiary butyl hydroquinone (TBHQ) (I). **Journal American Oil Chemists' Society**, v.60, n.11, p.1878-1882, 1983.
- KURECHI, T.; KUNUGI, A. Studies on the antioxidants XIX: Photooxidation products of tertiary butyl hydroquinone (TBHQ) (II). **Journal American Oil Chemists' Society**, v.60, n.11, p.1882-1887, 1983.
- LEE, E.C.; MIN, D.B. Quenching mechanism of β -carotene on the chlorophyll sensitized photooxidation of soybean oil. **Journal of Food Science**, v.53, n.6, p.1894-1895, 1988.
- LEME, C.C.M. O uso da embalagem adequada aumenta as vendas de óleos comestíveis. **Óleos e Grãos**, n.20, p.22-29, 1994.
- LIN, S.S. Fats and oils oxidation. In: WAN, P.J. (Ed.). **Introduction to fats and oils technology**. Champaign: AOCS, 1991. cap.12, p.211-231.
- LIN, F.S.; WARNER, C.R.; FAZIO, T. Alteration of phenolic antioxidants in heated vegetable oil. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.58, n.7, p.789-792, 1981.
- LUCKADOO, B.M.; SHERWIN, E.R. Tertiary butylhydroquinone as antioxidant for sunflower seed oil. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.49, n.1, p.95-97, 1972.
- LUGASI, A.; HÓVARI, J.; DWORSCHÁK, E. et al. Effect of UV irradiation on lipid peroxidation in edible fats. **Acta Alimentaria**, v.24, n.3, p.269-276, Sep. 1995.
- LYON, D.H.; FRANCOMBE, M.A.; HASDELL, T.A. et al. (Ed.). **Guidelines for sensory analysis in food product development and quality control**. London: Chapman & Hall, 1992. 131p.
- MADHAVI, D.L.; SALUNKHE, D.K. Antioxidants. In: MAGA, J.; TU, A.T. (Ed.). **Food additive toxicology**. New York: Marcel Dekker, 1995. cap.3, p.89-178.

- MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Overall difference tests: does a sensory difference exist between samples. In: MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. Boca Raton: CRC Press, 1999. cap.6. p.59-98.
- NEY, K.H. Lebensmittelaromen aus den lebensmittelhauptbestandteilen. In: NEY, K.H. **Lebensmittel Aromen**. Hamburg: Behr's Verlag, 1987. cap.2, p.41-86.
- O ANTIOXIDANTE tenox TBHQ em comparação com o BHT em gorduras e óleos. **Food for Thought**, v.3, n 2, p 1-3, jul. 1995.
- OGRYZLO, E.A. Physical properties of singlet oxygen. In: GIESE, A.C. (Ed.). **Photophysiology**: current topics in photobiology and photochemistry. New York: Academic, 1970. cap.2, p.35-47.
- ÓLEOS e gorduras de várias procedências. **Aditivos e Ingredientes**, n.6, p.34-45, jan./fev. 2000.
- PAPAS, A.M. Determinants of antioxidant status in humans. **Lipids**, v.31, p.S77-S82, 1996. Supplement.
- PENUMETCHA, M.; KHAN, N. PARTHASARATHY, S. Dietary oxidized fatty acids: an atherogenic risk ? **Journal of Lipid Research**, v.41, p.1473-1480. 1983.
- PERJÉSI, P.; PINTÉR, Z; GYÖNGYI, et al. Effect of rancid corn oil on some onco/suppressor gene expressions in vivo. A short-term study. **Anticancer Research**, v.22, n.1A, p.225-230, 2002.
- REGITANO-d'ARCE, M.A.B.; VIEIRA, T.M.F.S. Storability of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) crude oil. In: WORLD CONFERENCE ON OILSEED AND EDIBLE OILS PROCESSING: EMERGING TECHNOLOGIES, CURRENT PRACTICES, QUALITY CONTROL, TECHNOLOGY TRANSFER AND

- ENVIRONMENTAL ISSUES, Istanbul, 1996. **Proceedings**. Champaign: AOCS, 1996. p.1174-176.
- RIAH, J.; MARZOUK, B. Effets de la lumière sur la qualité et la stabilité de quelques huiles végétales: Note préliminaire. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v.77, n.1, p.25-30, 2000.
- ROVELLINI, P.; CORTESI, N.; FEDELI, E. Ossidazione dei lipid. Nota 1. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v.74, n.5, p.181-189, 1997.
- SHAHIDI, F. Stability of fats and oils. In: LATIN AMERICAN CONGRESS AND EXHIBIT ON FATS AND OILS PROCESSINGS, 6., Campinas, 1995. **Proceedings**. Campinas: Sociedade Brasileira de Óleos e Gorduras, 1995. p.47-54.
- SHAHIDI, F. Natural antioxidants: an overview. In: SHAHIDI, F. (Ed.) **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications**. Champaign: AOAC, 1996. Cap.1, p.1-11.
- SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U.N. Measurement of lipid oxidation and evaluation of antioxidant activity. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Natural antioxidants: chemistry, health effects and applications**. Champaign: AOAC, 1996. cap.24, p.379-396.
- SHERWIN, E.R. Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.55, p.809-814, Nov. 1978.
- SHERWIN, E.R.; THOMPSON, J.W. Tertiary-butylhydroquinone: an antioxidant for fats and oils and fat-containing foods. **Food Technology**, v.21, p.912-916, June 1967.
- SIMIC, M.G.; JOVANOVIC, V.; NIKI, E. Mechanisms of lipid oxidative processes and their inhibition. In: ALLEN, J.A. **Lipid oxidation in food**. New York: American Chemical Society, 1992. cap.2, p.14-32.

- SIQUEIRA, F.M. Estabilidade oxidativa de óleos de soja, milho e canola. Piracicaba, 1998. 91p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- STAPRANS, I.; RAPP, J.H.; PAN, X.M. et al. Oxidized lipids in the diet are incorporated by the liver into very low density lipoprotein in rats. **Journal of Lipid Research**, v.37, p.420-430, 1996.
- STAZIONE SPERIMENTALE PER LE INDUSTRIE DEGLI OLI E DEI GRASSI. **Norme italiane per il controllo dei grassi e derivati**. 3.ed. Milano, 1976.
- STRECKER, L.R.; MAZA, A. WINNIE, G.F. Corn oil: composition, processing and utilization. In: ERICKSON, D.R. (Ed.). WORLD CONFERENCE PROCEEDING EDIBLE FATS AND OILS PROCESSING: BASIC PRINCIPLES AND MODERN PRACTICES. Champaign: AOAC, 1990. p.309-323.
- TOMM, G.A. A cultura de colza padrão canola no Brasil. **Óleos e grãos**, n.52, p.26-30, 2000.
- VIEIRA, T.M.F.S. Estabilidade oxidativa de óleos vegetais refinados: efeito do aquecimento por microondas. Piracicaba, 1998. 70p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luis de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- WARNER, C.R.; DANIELS, D.H.; LIN, F.S.D. et al. T. Fate of antioxidants and antioxidants-derived products in deep-fat frying and cookie baking. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.34, n.1, p.1-5, 1986.
- WANASUNDARA, U.N, SHAHIDI, F. Canola extract as an alternative natural antioxidant for canola oil. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.71, n.8, p.817-822, 1994.
- WARNER, K. Flavors and sensory evaluation. In: HUI, Y.H. (Ed.). **Bailey's Industrial oil & fat products**. New York: John Wiley & Sons, 1996. cap.5, p.105-144.

- WILSON, T.; HASTINGS, J.W. Chemical and biological aspects of singlet excited molecular oxygen. In: GIESE, A.C. (Ed.). **Photophysiology**: current topics in photobiology and photochemistry. New York: Academic, 1970. cap.3, p.49-95.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST 2**: sistema de análise estatística para computadores (software). Piracicaba: SEI, 1992.