**AÇÃO ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE
ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.) E ORÉGANO (*Origanum
vulgare* L.) EM ÓLEO DE SOJA SUBMETIDO À TERMOXIDAÇÃO
E FOTOXIDAÇÃO**

RENATA FRANCO DE ALMEIDA DORIA

Engenheiro de Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. **MARISA APARECIDA BISMARA REGITANO-d'ARCE**

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

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Outubro - 1999

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Almeida-Dória, Renata Franco de

Ação antioxidante de extratos etanólicos de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) em óleo de soja submetido à termoxidação e fotoxidação / Renata Franco de Almeida Dória. - - Piracicaba, 1999.

71 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1999.
Bibliografia.

1. Antioxidante natural 2. Especiaria 3. Fotoxidação 4. Óleo de soja 5. Oxidação
I. Título

CDD 664.369

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

Este trabalho é dedicado aos meus pais João e Nelly, que sempre me deram muito amor, carinho, força, estímulo e coragem em todas as minhas realizações.

Ofereço este trabalho ao meu marido Jorge, que perto ou longe sempre me apoiou e com seu entusiasmo me deu bastante força.

São pessoas muito especiais e essenciais na minha vida e que eu amo muito.

Obrigada por acreditarem em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de uma maneira ou de outra participaram ou contribuíram para a realização deste trabalho.

A prof. Dra. Marisa A. B. Regitano D'Arce, pelo apoio, dedicação, sabedoria e amizade.

Ao apoio, força e amizade de Maria Fernanda A. Prado.

As minhas amigas, Raquel B. Campregher, Roberta Basting e Fernanda, pela convivência, carinho e preocupação.

As colegas Fabiana M. Siqueira, Thaís M. S. Vieira, Roberta T. R. Benato, Juliana A. Galvão e Célia R. F. Faganello, pelo apoio.

Ao apoio e amizade de Claudio L. Aguiar e Antonio S. Baptista.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição.

A Cargill Agrícola S.A. e Braspet, pela doação dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

A Deus, que sempre ilumina, abençoa e é vida.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	viii
RESUMO	ix
SUMMARY	xi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Óleos vegetais e reações de oxidação	3
2.2 Controle da oxidação lipídica – Emprego de antioxidantes	6
2.2.1 Antioxidantes sintéticos	8
2.2.2 Ação antioxidante de extratos naturais de especiarias	9
2.3 Métodos para avaliação da atividade antioxidante	15
2.3.1 Fotoxidação	19
2.3.2 Microondas	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Material	27
3.2 Métodos	27
3.3 Ensaaios	28
3.3.1 Atividade antioxidante em sistema modelo β -caroteno e ácido linoléico	28
3.3.2 Oxidação acelerada em estufa	29
3.3.3 Armazenamento ambiente	29
3.3.4 Fotoxidação acelerada em câmara de luz	30
3.3.5 Oxidação acelerada por aquecimento em microondas	31
3.4 Determinações analíticas	31
3.4.1 Análises físicas	31
3.4.1.1 Absortividade em 232 nm e 270 nm	31
3.4.1.2 Espectro de absorvidade na faixa do ultravioleta – 220nm a 320 nm	32
3.4.2 Análises químicas	32
3.4.2.1 Índice de peróxido	32
3.4.2.2 Índice de acidez	32

3.4.2.3 Índice de iodo	33
3.4.3 Melhor dose e dose econômica	33
3.4.4 Análise estatística	34
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Atividade antioxidante em sistema modelo β -caroteno e ácido linoléico	35
4.2 Oxidação acelerada em estufa	36
4.3 Melhor dose e dose econômica	42
4.4 Armazenamento ambiente	44
4.5 Fotoxidação acelerada em câmara de luz	50
4.6 Oxidação acelerada por aquecimento em microondas	54
5 CONCLUSÕES	60
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Câmara de Fotoxidação conforme Siqueira (1998)	30
2. Absorbância em 470 nm do sistema modelo ácido linoléico e β -caroteno	36
3. Índice de peróxido de óleo de soja, adicionado de antioxidantes, mantido em estufa a 63°C por até 7 dias	38
4. Absortividade em 232 nm de óleo de soja, adicionado de antioxidantes, mantido em estufa a 63°C por até 7 dias	38
5. Índice de peróxido de óleo de soja, adicionado de antioxidantes, mantido em estufa a 63°C por 7 dias	39
6. Absortividade em 232 nm de óleo de soja, adicionado de antioxidantes, mantido em estufa a 63°C por 7 dias	40
7. Índice de peróxido de óleo de soja, adicionado de TBHQ, mantido em estufa a 63°C por 7 dias	41
8. Absortividade em 232 nm de óleo de soja, adicionado de TBHQ, mantido em estufa a 63°C por 7 dias	41
9. Espectros de absortividade na faixa do UV entre 220 e 320 nm do óleo de soja mantido em estufa a 63°C por 7 dias	44
10. Espectro de absortividade na faixa do UV entre 220 e 320 nm para o óleo de soja acondicionado em frascos PET e armazenados por 6 meses	49
11. Índice de peróxio do óleo de soja submetido à fotoxidação acelerada em câmara de luz	50
12. Espectro de absortividade na faixa do UV de 220 a 320 nm de óleo de soja submetido à fotoxidação acelerada em câmara de luz por 24 horas	52
13. Espectro de absortividade na faixa do UV de 220 a 320 nm de óleo de soja submetido à fotoxidação acelerada em câmara de luz por 72 horas	53
14. Espectro de absortividade na faixa do UV de 220 a 320 nm de óleo de soja submetido à fotoxidação acelerada em câmara de luz por 120 horas	53
15. Espectros de absortividade na faixa do UV de óleo de soja submetido ao aquecimento no microondas durante 60 minutos	57

16. Espectros de absorvidade na faixa do UV dos óleos de soja submetidos ao aquecimento no microondas por 60 minutos	59
--	----

LISTA DE TABELAS

	Página
1. Composição do óleo de soja em ácidos graxos (%)	3
2. Compostos da oxidação lipídica e suas respectivas faixas de absorção no UV.....	16
3. Caracterização inicial do óleo de soja refinado	35
4. Caracterização da embalagem PET	45
5. Temperatura e umidade relativa durante o armazenamento ambiente de óleo de soja acondicionado em embalagem PET.....	45
6. Índice de peróxido (meq/Kg) de óleo de soja, acondicionado em frascos PET e armazenados em condições ambientes	46
7. Absortividade em 232 nm de óleo de soja, acondicionado em frascos PET e armazenados em condições ambientes	47
8. Absortividade em 270 nm de óleo de soja, acondicionado em frascos PET e armazenados em condições ambientes	48
9. Absortividade em 232 nm de óleo de soja adicionado de antioxidantes e submetido à fotoxidação acelerada em câmara de luz	51
10. Absortividade em 270 nm de óleo de soja adicionado de antioxidantes e submetido à fotoxidação acelerada em câmara de luz	52
11. Temperatura do óleo de soja após cada tempo de aquecimento em microondas..	54
12. Absortividade em 232 nm de óleo de soja, submetido ao aquecimento por microondas.....	55
13. Absortividade em 270 nm de óleo de soja, submetido ao aquecimento por microondas	56
14. Absortividade em 232 e 270 nm do óleo de soja submetido ao aquecimento por microondas durante 60 minutos	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BHA = hidroxianisol butilado

BHT = hidroxitolueno butilado

C.V. = coeficiente de variação (%)

d.m.s. = diferença mínima significativa

PET = polietileno tereftalato

TBHQ = tércio-butilhidroquinona

UV = ultravioleta

W = watts

meq = miliequivalente grama

A = alecrim

O = orégano

AÇÃO ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE ALECRIM (*Rosmarinus officinalis* L.) E ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.) EM ÓLEO DE SOJA SUBMETIDO À TERMOXIDAÇÃO E FOTOXIDAÇÃO

Autora: RENATA FRANCO DE ALMEIDA DORIA

Orientadora: Profa. Dra. MARISA APARECIDA BISMARA REGITANO-d'ARCE

RESUMO

Foram realizados cinco ensaios para verificação da atividade antioxidante de extratos etanólicos de alecrim e orégano comparados com os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHA+BHT. Os resultados de atividade antioxidante em sistema modelo β -caroteno e ácido linoléico diferiram das respostas do teste acelerado em estufa. Nos ensaios em estufa os valores de peróxido e absortividade em 232 nm dos óleos de soja, adicionados de 25, 50, 75, 100 e 200 mg de TBHQ/Kg, foram menores do que os dos óleos adicionados dos extratos de orégano (O) (1000 mg/Kg), de alecrim (A) (500 mg/Kg) ou da mistura deles (500 mg A/Kg + 1000 mg O/Kg). Todos os tratamentos retardaram a oxidação do óleo, entretanto os extratos naturais não atingiram a eficiência do TBHQ, mas foram tão efetivos quanto a mistura BHA+BHT. A adição dos extratos naturais a doses reduzidas de TBHQ não melhorou sua eficiência em retardar a oxidação. Foi calculada a melhor dose e dose econômica de TBHQ através de regressão polinomial e equação quadrática do ensaio em estufa. No ensaio de armazenamento do óleo em frascos PET sob condições ambientes não foi observada diferença significativa entre os tratamentos nos valores de peróxido e absortividade em 232 e 270 nm; esses valores foram baixos no final do ensaio, mostrando que a oxidação ocorreu lentamente. O tempo de armazenamento foi curto para serem observadas diferenças entre os tratamentos, com isso este ensaio não foi comparável ao ensaio em estufa. Em teste acelerado de fotoxidação em câmara de luz, o antioxidante TBHQ foi eficiente em retardar a oxidação do óleo de soja. Os extratos

naturais não foram eficientes, mas não tiveram ação pró-oxidante. Os resultados da fotoxidação foram diferentes do ensaio em estufa. Com o aquecimento do óleo de soja em microondas, os valores de absortividade em 232 e 270 nm não diferiram entre os tratamentos, sendo que nem os extratos naturais, TBHQ e a mistura dos extratos naturais com TBHQ protegeram o óleo de soja da oxidação. Este ensaio também não pode ser comparado com os outros ensaios pois não houve diferença entre os tratamentos. Os extratos naturais tiveram algum efeito antioxidante, mas o TBHQ foi superior a eles na maioria dos ensaios, mesmo em concentrações menores.

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ROSEMARY (*Rosmarinus officinalis* L.) AND OREGANO (*Origanum vulgare* L.) ETHANOL EXTRACTS IN SOYBEAN OIL UNDER THERMAL AND LIGHT OXIDATION

Author: RENATA FRANCO DE ALMEIDA DORIA

Adviser: Profa. Dra. MARISA APARECIDA BISMARA REGITANO-d'ARCE

SUMMARY

Five experiments were conducted to measure the antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts compared with synthetic antioxidants such as TBHQ and BHA/BHT. The antioxidant activity was determined and results differed from those of the Oven test at 63°C. Peroxide values and absorptivities at 232 nm of soybean oil under Oven test were lower in treatments 25, 50, 75, 100 and 200 mg/Kg TBHQ than in treatments 1000 mg/Kg oregano extract (O), 500 mg/Kg rosemary extract (A) and their mixture (A+O). All the treatments were effective in controlling the thermal oxidation of oils; the natural extracts were as effective as BHA+BHT and less effective than TBHQ. The natural extracts were added to 25, 50, 75 and 100 mg/Kg TBHQ added to the oil, however no improvement in antioxidative properties was observed. Best and economical TBHQ concentration could be determined from a polynomial regression and the quadratic equation from the experimental data. Soybean oil stored in PET flasks under ambient conditions showed lower peroxide values and absorptivities at 232 and 270 nm, however there was no difference between the control and the treatments. The time allowed for oxidation under normal ambient conditions was too short, therefore this test was not comparable with any accelerated test. TBHQ was effective at controlling light-induced oxidation of oils. The natural extracts were not effective and had no pro-oxidant action. The results of light-induced test were different from those from Oven test. Oils were heated in microwave oven. Antioxidants presented no differences between treatments in absorbance at 232 and 270 nm. The

natural extracts, TBHQ and the mixture of the natural extracts with TBHQ were not effective in controlling oxidation under microwave heating. Microwave test could not to be compared with other accelerated tests because no differences were observed among treatments. In general, the antioxidant properties of the ethanolic natural extracts could be observed, however TBHQ was always the most efficient, even in lower concentrations.

1 INTRODUÇÃO

A oxidação de lipídeos têm efeitos prejudiciais na cor, sabor, odor, textura e no valor nutricional de alimentos, além da formação de compostos potencialmente tóxicos. O óleo de soja é o principal óleo comestível no Brasil e devido seu alto teor de ácidos graxos insaturados é bastante susceptível à oxidação. A qualidade dos óleos e gorduras em alimentos pode ser garantida pela utilização correta de embalagens, uso de atmosfera inerte, condições adequadas de armazenamento e pela adição de antioxidantes. Os antioxidantes além de retardarem a oxidação, protegem as vitaminas A e D e outros compostos insaturados. Os antioxidantes sintéticos de uso comercial como hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) e *t*-butilhidroquinona (TBHQ), são compostos fenólicos que ao reagirem com os radicais livres interrompem o mecanismo de oxidação. Entretanto, há suspeitas de que o uso desses compostos pode causar riscos à saúde, motivo de preocupação para os consumidores na utilização desses produtos. Consequentemente, os consumidores começaram a procurar por compostos naturais em alimentos. Esta tendência tem estimulado pesquisas extensivas na área de antioxidantes naturais como fonte alternativa.

Existem várias fontes de antioxidantes naturais, especiarias, ervas, chá, cacau, óleos, sementes, cereais, grãos, frutas, vegetais, enzimas, proteínas, etc. Os antioxidantes naturais são encontrados em um grande número de plantas e comumente incluem um anel aromático como parte da estrutura molecular e um ou mais grupos hidroxila, que poderão inibir a oxidação. Eles podem ser encontrados sob a forma de aminoácidos, ácido ascórbico, carotenóides, ácido cinâmico, flavonóides, melanoidinas, redutonas, peptídeos, fosfatídeos, polifenóis, taninos, tocoferóis e ácidos orgânicos em geral. Os antioxidantes naturais podem agir de várias maneiras retardando ou inibindo a oxidação de lipídeos. Eles podem funcionar como compostos

redutores, interruptores de radicais livres, inibidores ou captadores de oxigênio singlete e como inativadores de metais pró-oxidantes.

Os antioxidantes possuem capacidades diferentes de prevenir a oxidação em diferentes materiais lipídicos e sob diferentes condições de processamento e manuseio.

As especiarias são largamente utilizadas numa variedade de produtos alimentícios, é importante saber como elas mantêm a qualidade desses produtos. Algumas especiarias podem prevenir a deterioração causada por microrganismos e têm capacidade de retardar outros tipos de deterioração, incluindo a rancificação causada pela oxidação de gorduras. Vários compostos antioxidantes têm sido isolados de uma variedade de especiarias como, alecrim e orégano.

O uso dos antioxidantes naturais pode ser limitado pela falta de conhecimentos da composição molecular, de ingredientes ativos, da quantidade desses ingredientes a ser utilizada, da capacidade de transferir cor e “flavor” aos produtos no qual eles são usados, custo da extração desses antioxidantes e processamento de maneira adequada para o uso desejado (Dugan, 1980 e Six, 1994).

Neste trabalho, tanto alecrim como orégano foram estudados como fontes potenciais de antioxidantes naturais comparáveis aos sintéticos sob condições diferentes de oxidação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Óleos vegetais e reações de oxidação

Os óleos vegetais podem ser obtidos de diversas matérias-primas (milho, algodão, oliva, canola, soja, etc) e todos eles têm importante função nutricional servindo como fonte de energia calórica, fornecendo ácidos graxos essenciais (linoléico e linolênico) e vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K). além de contribuírem com o aumento da palatabilidade e saciedade (Nawar, 1985 e Padley et al., 1994). A cada ano a produção mundial de óleo vegetal vem aumentando, pois seu uso tem sido largamente ampliado tanto nas indústrias como nas residências. No Brasil dentre os óleos vegetais produzidos, o que mais se destaca em volume é o óleo de soja, cuja a produção prevista para 1998/1999 é de 4.085 mil toneladas métricas (FNP Consultoria e Comércio, 1999).

Os lipídeos majoritários em óleos vegetais são formados basicamente por uma molécula de glicerol esterificada a três moléculas de ácidos graxos, que podem ser saturados ou insaturados, sendo os últimos mais reativos devido às duplas ligações. O óleo de soja tem em sua composição 85% de ácidos graxos insaturados (Tabela 1), dentre eles o ácido linolênico, bastante suscetível à oxidação. A reatividade dos ácidos oléico (C18:1), linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3) é de 1:10:20, respectivamente (Nawar, 1985 e Padley et al., 1994).

Tabela 1. Composição do óleo de soja em ácidos graxos (%)

C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	C20:1	C22:0
7,0 -14,0	<0,5	1,4-5,5	19,0-30,0	44,0-62,0	4,0-11,0	<1,0	<1,0	<0,5

Fonte: FAO/OMS (1992)

A oxidação lipídica é uma das principais reações deteriorativas dos alimentos podendo resultar em perda de qualidade e tornando os produtos inaceitáveis para o

consumo. As reações oxidativas, além de afetarem as características organoléticas (cor, aroma, “flavor” e textura) e diminuir o valor nutricional devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, são também responsáveis pela formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos (Nawar, 1985 e Sherwin, 1978).

Os lipídeos podem ser oxidados por diferentes mecanismos. As reações hidrolíticas são catalisadas por enzimas (lipases e lipoxigenases) ou pela ação de calor e umidade, com formação de ácidos graxos livres. Entretanto, o principal mecanismo da perda de qualidade de óleos é devido à reação oxidativa que é catalisada pela luz, temperatura e íons metálicos, envolvendo algum tipo de radical livre e espécies de oxigênio, chamada autooxidação (Berger & Hamilton, 1995 e Sherwin, 1978). Farmer¹ et al. (1942) e outros autores, citado por Shahidi e Wanasundara (1996), propuseram uma sequência de reações inter-relacionadas para explicar o processo de autooxidação lipídica:

-Iniciação:

-Propagação:

-Término:

Onde : RH - Ácido graxo insaturado

 R• - Radical livre

 ROO• - Radical peróxido

¹ FARMER, E.H.; BLOOMFIELD, G.F.; SUNDARALINGAM, A.; SUTTON, D.A. The course and mechanism of autoxidation reactions in olefinic and polyolefinic substances, including rubber. **Trans. Faraday Soc.**, v.38, p.348-356, 1942.

ROOH – Hidroperóxido

A oxidação dos lipídeos está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados e ocorre em três etapas: iniciação, propagação e término. A etapa de iniciação começa com a perda de um átomo de hidrogênio no grupo metileno adjacente ao carbono da dupla ligação no ácido graxo (RH), formando radicais livres (R•) e esta reação é catalisada pela ação de espécies endógenas (H_2O_2 , ROOH) e radicais ($\bullet\text{O}_2$, $\text{ROO}\bullet$, $\bullet\text{OH}$) ou por espécies exógenas ($^1\text{O}_2$), radicais (NO_x , SO_3^-) e agentes (calor, radiação, etc). Na etapa de propagação, os radicais livres formados reagem com o oxigênio atmosférico (O_2) para formarem radicais peróxidos ($\text{ROO}\bullet$), que ao receberem um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo insaturado (RH) formam hidroperóxidos (ROOH) e radicais livres ($\text{ROO}\bullet$ e R•), que por sua vez, contribuem para reação em cadeia. Os hidroperóxidos formados são instáveis; podendo se decompor em compostos intermediários (peroxila, alcoxila e hidroxila) responsáveis pela formação de aldeídos, álcoois, cetonas e ácidos. No término, ocorre a formação de produtos não radicais estáveis, resultantes da combinação de duas moléculas de radicais livres (ROOR ou RR) (Simic, 1992; Patterson, 1989; Gray, 1978 e Shahidi & Wanasundara, 1996).

A presença de grupos metilenos ativados pela proximidade das insaturações aumenta a velocidade de decomposição dos hidroperóxidos, formando compostos voláteis responsáveis pelas alterações organolépticas (Rovellini et al., 1997).

A fotoxidação inicia-se pela exposição do alimento à luz na presença de certas moléculas de fotossensores (mioglobina, riboflavina, clorofila e outras), e na presença de oxigênio. O oxigênio singlete é formado a partir do oxigênio triplete por reações fotoquímicas catalisadas pelos fotossensores, ele reage diretamente com as ligações duplas por adição, formando os hidroperóxidos (Berger & Hamilton, 1995; Wilson & Hastings, 1970 e Ogryzlo, 1970).

onde: * = estado ativado

$^1\text{O}_2$ = oxigênio singleto

$^3\text{O}_2$ = oxigênio tripleto

A oxidação lipídica além de afetar a qualidade sensorial e nutricional de óleos, gorduras e seus produtos, pode trazer problemas para a saúde. No organismo humano a presença de espécies radicais pode desenvolver uma série de doenças e injúria nos tecidos (orgãos, pele, músculo, etc.) Muitos produtos secundários da oxidação são altamente reativos (malonaldeído e hidroxionenal), podendo interagir com componentes biológicos e alimentos, como proteínas, aminoácidos, aminas e DNA, implicando em possíveis perdas do valor nutricional nos alimentos e envelhecimento, mutação e câncer no organismo (Shahidi, 1996 e Namiki, 1990).

2.2 Controle da oxidação lipídica - Emprego de antioxidantes

A oxidação lipídica não pode ser inibida completamente, mas pode ser retardada. Existem várias maneiras de retardar a degradação oxidativa de óleos e gorduras em alimentos. A prevenção é o modo mais indicado no controle da oxidação. A utilização correta de embalagens, o uso de atmosfera inerte, condições adequadas de armazenamento e a adição de antioxidantes podem retardar a oxidação em alimentos. Os antioxidantes além de retardarem a oxidação, protegem os carotenóides, as vitaminas A e D e outros compostos insaturados (Araújo, 1995).

Os antioxidantes são em sua maioria compostos aromáticos que contêm pelo menos uma hidroxila (Six, 1994). Eles interferem na autooxidação por interagirem com radicais livres. O radical resultante da ação do antioxidante não inicia ou propaga a oxidação, a estrutura pode ser estabilizada pela ressonância dos híbridos

(Sherwin, 1978). Ingold² (1968) citado por Hudson (1990) classifica todos os antioxidantes em dois grupos, os primários e os secundários.

Os antioxidantes primários podem reagir com os radicais dos lipídeos para convertê-los em produtos mais estáveis, eles interferem na autooxidação lipídica pela rápida doação de átomos de hidrogênio para os radicais lipídicos de acordo com as reações (Madhavi & Salunke, 1995):

onde: AH = antioxidante

A• = radical estável devido à ressonância da molécula

Os antioxidantes de ação primária reagem com os radicais livres transformando-se em compostos estáveis devido à presença de um grupo fenólico na sua estrutura que entra em ressonância (Faria, 1994).

As substâncias fenólicas funcionam como aceptores de radicais livres, podendo sustar a fase de iniciação da oxidação em óleos e gorduras.

² INGOLD, K. U., Inhibition of autoxidation. *Adv. Chem. Ser.*, v. 75, p. 269-305, 1968.

Se esses antioxidantes forem adicionados durante o processamento ou no óleo já processado, a formação de radicais livres será interrompida, evitando a oxidação (Sherwin, 1978).

Os antioxidantes secundários ou preventivos reduzem a autooxidação por uma variedade de mecanismos. Eles podem atuar sequestrando os íons metálicos, capturando oxigênio, decompondo hidroperóxidos em espécies mais estáveis, absorvendo radiação ultravioleta ou inativando o oxigênio singlete (Dorko, 1994 e Hudson, 1990).

Os antioxidantes podem ser naturais ou sintéticos.

2.2.1 Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos de uso mais comuns são BHT (hidroxitolueno butilado), BHA (hidroxianisol butilado), TBHQ (tércio-butilhidroquinona) e PG (galato de propila) (Dorko, 1994 e Faria, 1994). O BHT é um antioxidante monofenólico e tem estabilidade térmica razoável. O BHA é uma mistura de isômeros (2-BHA e 3-BHA) na proporção 9:1 e tem boa estabilidade térmica. Ambos os antioxidantes tem boa solubilidade em gordura animal e óleos vegetais, e apesar de a literatura atribuir-lhes mais eficiência em gordura animal sempre foram utilizados em óleos vegetais. O TBHQ é um antioxidante difenólico, que tem boa estabilidade térmica e é eficiente em óleos vegetais. O PG é um antioxidante trifenólico, que tem baixa estabilidade térmica e é eficiente em gordura animal e óleos vegetais. Os antioxidantes sintéticos reagem com os radicais livres formando radicais fenoxil e outros produtos (Hudson, 1990; Buck, 1997).

Por causarem riscos à saúde, sua utilização é restrita em vários países. Vários estudos (Sherwin, 1990 e Madhavi & Salunkhe, 1995) indicam problemas em animais de laboratório. O BHA pode causar indução da atividade hepática, aumento do fígado, redução de crescimento e formação de carcinomas. O BHT produziu efeitos tóxicos no fígado, rim e pulmão, redução de ganho de peso, entre outros efeitos observados em animais. A redução do nível de hemoglobina, hiperplasia de células basais foi atribuída

ao uso de TBHQ. Aumento da atividade hepática e no tamanho do fígado, foi observado por Ikeda et al. (1986) em cães que ingeriram BHA em níveis de 1 a 1,3%. Em macacos, doses de 0,125 ou 500 mg/Kg (pelo peso) foram administradas por 84 dias e induziram mudanças histológicas no estômago e esôfago (Inverson et al., 1986). Ratos alimentados com 0,75% de BHT durante 6 meses apresentaram um aumento na incidência de tumores no pulmão e cistos hepáticos (Clapp et al., 1974). O TBHQ produziu pequeno aumento de proliferação de células em ratos alimentados com doses de 0,5% (TBHQ) durante 20 semanas (Ito et al., 1986).

No Brasil o uso de antioxidantes é regulamentado pelo Ministério da Saúde, resolução número 22/77 do decreto de lei número 986, que permite a utilização dos antioxidantes na proporção máxima de 0,02 g/100 g de óleo para o BHA e TBHQ e de 0,01 g/100 g de óleo para o BHT (Brasil, 1991).

2.2.2 Ação antioxidante de extratos naturais de especiarias

Os antioxidantes naturais podem ser tocoferóis, carotenóides, polifenóis, alguns ácidos orgânicos (ácido cítrico), fosfolipídeos, melanoidinas, etc. Eles podem ser encontrados e isolados de uma variedade de plantas. Os antioxidantes fenólicos são ácidos fenólicos incluindo ácidos clorogênico, isoclorogênico, p-cumárico, caféico, ferrúlico, vanílico, siríngico e p-hidroxibenzóico, presentes em soja, algodão e amendoim. Há outros tipos de ácidos fenólicos presentes em outros tipos de plantas. Os flavonóides e seus precursores estão presentes especialmente em folhas e frutas como glicosídeos e agliconas. Os tocoferóis e tocotrienóis estão presentes em cereais, sementes oleaginosas, nozes e vegetais como ervilhas, feijão e cenoura. Os carotenóides, como o β -caroteno são associados à coloração vermelha e amarela em vários óleos, principalmente o dendê. As especiarias e ervas são importantes fontes de antioxidantes naturais como ácido rosmarínico, curcuminóides, carnosol, ácido carnósico e uma variedade de outros compostos (Dugan, 1980; Cuppet et al., 1996 e Six, 1994).

Os antioxidantes naturais podem agir como compostos redutores, interruptores de radicais livres, inibidores ou supressores de oxigênio singlete e como inativadores de metais pró-oxidantes (Dugan, 1980).

Os compostos fenólicos, dentre eles os tocoferóis, agem como doadores de elétrons e funcionam como interruptores de radicais livres.

Os agentes sequestrantes como ácido cítrico, derivados do ácido fosfórico e outros, funcionam como sequestradores de íons metálicos.

O ácido ascórbico, ascorbil palmitato, ácido isoascórbico são usados como supressores de oxigênio e como agentes redutores.

O β -caroteno funciona como um desativador de oxigênio singlete (Cuppet et al., 1996 e Dugan, 1980):

Há um crescente aumento nas pesquisas para o desenvolvimento e utilização de antioxidantes obtidos de fontes naturais. Desde a era pré-histórica, especiarias e ervas tem sido utilizadas não só para dar sabor aos alimentos mas também pelas propriedades medicinais e anti-sépticas. Os efeitos preservativos sugeriram a presença de constituintes antimicrobianos e antioxidantes (Nakatani, 1996; Six, 1994 e Dugan, 1980).

Muitas especiarias tem sido estudadas e das várias pesquisas realizadas foi observado que o alecrim, o orégano e a sálvia, da família Labiatae, possuíam forte atividade antioxidante (Bracco et al., 1981, Chang et al., 1977, Chipault et al., 1952; Chipault et al., 1955; Chipault et al., 1956 e Economou et al., 1991). Vários compostos fenólicos antioxidantes foram isolados do alecrim (carnosol, rosmanol, rosmaridifenol e rosmariquinona) (Houlihan et al., 1984; Inatani et al., 1982; Inatani et al., 1983; Nakatani & Inatani, 1981; Richheimer, 1998; Wu et al., 1982) e do orégano (glucosídeos, ácidos fenólicos e terpenos derivados) (Vekiarí et al., 1993; Nakatani &

Kikuzaki, 1987 e Kikuzaki & Nakatani, 1989). Os antioxidantes fenólicos ao doarem hidrogênio para os radicais livres formam radicais estáveis de baixa energia. A estrutura fenólica desses antioxidantes torna-os estáveis através da ressonância (Cuppet et al., 1996 e Evans, 1996).

Chipault et al. (1951) estudaram o efeito antioxidante de 32 especiarias. Foram adicionadas em banha, em concentrações de 0,2%, as especiarias moídas e seus extratos em éter de petróleo e álcool etílico. De todas as especiarias, alecrim e sálvia foram particularmente potentes tanto sob a forma de extratos em éter de petróleo quanto de extratos em álcool etílico. Outras especiarias, dentre elas o orégano, também apresentaram atividade antioxidante nesses dois extratos. Foi também estudado o efeito sinérgico de extratos etanólicos das especiarias combinados com ácido cítrico em banha, em concentrações de 0,2% e 0,1%, respectivamente. Não houve efeito sinérgico com o extrato de orégano, mas algum efeito foi obtido com alecrim.

Em continuidade com seus estudos, os autores verificaram o efeito das especiarias em emulsão óleo em água e observaram que o cravo teve a melhor atividade antioxidante. O alecrim, orégano e outras especiarias protegeram mais a emulsão que a sálvia. A estabilidade oxidativa da emulsão foi medida pelo método de absorção de oxigênio (Chipault et al., 1955).

Baseados em seus estudos anteriores, Chipault et al. (1956) selecionaram 17 especiarias para serem testadas em carne de porco e em dois tipos de maionese e molho Francês. As amostras de carne de porco foram estocadas em duas temperaturas de congelamento. A eficiência das especiarias foi relativamente a mesma nas duas temperaturas, com exceção do orégano que foi mais efetivo a - 5°C e a mistura sálvia, pimenta preta e vermelha, mais efetiva a -15°C. As amostras contendo pimenta da Jamaica, cravo, alecrim e sálvia foram as mais efetivas na proteção contra oxidação. Nas amostras de maionese, o orégano apresentou maior atividade antioxidante, mas outras especiarias também foram efetivas como alecrim, sálvia, cravo, pimenta da Jamaica e tomilho. No molho Francês, o orégano foi novamente o que teve maior atividade antioxidante, o cravo e a sálvia foram também efetivos.

Chipault et al. (1956) concluíram de todos os testes realizados que, das especiarias testadas nos vários substratos, somente seis delas apresentaram propriedades antioxidantes: pimenta da Jamaica, cravo, orégano, sálvia, alecrim e tomilho.

Foram extraídos antioxidantes naturais de alecrim e sálvia utilizando-se os solventes orgânicos, hexano, benzeno, éter etílico, clorofórmio, dicloroetileno, dioxano e metanol. Os antioxidantes foram adicionados a banha numa concentração de 0,02% e as amostras foram estocadas a 60°C no escuro durante alguns dias. A redução da formação de peróxido foi usada como medida da atividade antioxidante dos extratos. Para o alecrim, os antioxidantes extraídos com dicloroetileno, éter etílico e metanol apresentaram os mais baixos valores de peróxido. No caso da sálvia, os extratos que melhor protegeram a banha da oxidação foram clorofórmio, metanol e éter etílico. Os antioxidantes do alecrim também foram adicionados em gordura de galinha, óleo de girassol e óleo de milho e foram comparados com o antioxidante sintético Tenox VI (BHA/BHT/galato de propila e ácido cítrico). O extrato de alecrim foi comparável com o Tenox VI em gordura animal e foi superior nos óleos vegetais. A atividade antioxidante do alecrim, livre de odor, preparado por destilação a vácuo ou molecular, também foi testada em banha a 60°C por 12 e 13 dias. Foram testadas concentrações de 0,02% do antioxidante alecrim e 0,02% e 0,05% de alecrim e ácido ascórbico, respectivamente, o qual melhorou a atividade antioxidante do extrato de alecrim. O antioxidante alecrim também foi eficiente em retardar a reversão de "flavor" em óleo de soja. O extrato de alecrim teve melhor estabilidade que BHA e BHT em altas temperaturas de fritura. O valor de peróxido do óleo extraído de batatas "chips" fritas em óleo de girassol e estocadas a 60°C por alguns dias mostrou que o extrato de alecrim é claramente mais efetivo que o Tenox VI. O antioxidante de alecrim foi fracionado por cromatografia líquida pelos eluentes: I -hexano, II- hexano/éter (95%/95%), III-hexano/éter (90%/10%) e IV-hexano/éter (80%/20%), V-etil éter e VI-metanol. Essas frações foram testadas em banha a 60°C por vários dias. A fração IV foi a que apresentou a mais alta atividade antioxidante (Chang et al., 1977).

Inatani et al. (1983) mediram a atividade antioxidante de extratos de alecrim usando diferentes solventes. A atividade antioxidante de cada fração dos extratos de

n-hexano, diclorometano e etanol foi medida pelo método do oxigênio ativo (AOM), quando adicionados em banha a uma concentração de 0,01%. A fração fracamente ácida do extrato de n-hexano apresentou forte atividade antioxidante. Essa fração foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel com benzeno/acetona como eluentes e obtiveram 12 frações. A atividade antioxidante dessas frações foram medidas pelo método do tiocianato férrico, método do ácido tiobarbitúrico e oxigênio ativo (AOM). Das frações, o carnosol e rosmanol apresentaram boa atividade antioxidante, sendo este último quatro vezes mais ativo do que o BHA e BHT.

Wu et al. (1982) prepararam um extrato metanólico de alecrim que quando adicionado a uma concentração de 0,02% em banha estocada a 60°C no escuro por 6, 14, 21, 28 e 36 dias, diminuíram a formação de peróxidos e foi comparável ao BHT e superior ao BHA nas mesmas concentrações. Esse extrato foi fracionado em coluna com sílica gel e vários solventes foram utilizados: 5, 10, 25, 50 e 75% de éter em hexano, éter puro e metanol puro. Cada fração obtida foi novamente fracionada do mesmo modo, totalizando 16 frações. A atividade antioxidante dessas frações foram comparáveis a BHA e BHT em banha (estocada a 60°C durante semanas) nas mesmas concentrações. Algumas frações obtidas foram mais ativas que as outras. As frações obtidas com o solvente metanol foram ativas mas não foram as melhores.

A partir de extrato metanólico de alecrim fracionado em coluna de sílica gel com vários eluentes obtiveram 15 frações. Um novo composto foi isolado e identificado como rosmaridifenol e testado em banha estocada a 60°C no escuro por 4 semanas. A atividade antioxidante foi testada através da capacidade de prevenir a formação de peróxidos na banha. O rosmaridifenol teve atividade antioxidante superior ao BHA nas mesmas concentrações (Houlihan et al., 1984).

Chen et al. (1992) extraíram compostos antioxidantes do alecrim, utilizando os solventes hexano, acetona e metanol e obtiveram o extrato purificado pelo método de Wu et al. (1982). Foram testados 0,02 % dos extratos e dos componentes purificados (carnosol, ácido carnósico e ácido ursólico) em banha pelo método do Rancimat. Tanto os extratos de alecrim quanto os componentes purificados aumentaram o período de indução da oxidação da banha adicionada desses antioxidantes. O período

de indução para o extrato de metanol foi maior do que o do BHA mas foi um pouco menor que o do BHT, sendo que os outros extratos e componentes purificados tiveram maior atividade antioxidante. Os extratos de hexano e de acetona possuíram maior teor de carnosol e ácido carnósico, que são os componentes principais responsáveis pela atividade antioxidante.

Richheimer et al. (1998) mediram a atividade antioxidante do ácido carnósico purificado do extrato de alecrim e compararam com BHA, BHT e TBHQ, em óleo de soja, usando o método do Rancimat. O ácido carnósico foi na maioria dos tempos mais potente que BHT e BHA em estabilizar o óleo de soja, mas foi menos potente que o TBHQ.

Basaga et al. (1997) prepararam o extrato de alecrim de acordo com Wu et al. (1982). O extrato foi testado em óleo de milho e soja, utilizando-se do sistema fenazina-metasulfato-NADH para a geração de radicais superóxido ($O_2^{\bullet -}$). Os valores de peróxido para o óleo de soja adicionado de 0,1 g de extrato de alecrim/Kg e 0,1 g de BHT/Kg foram 10,0 e 6,6 meq/kg, respectivamente, após um período de 4 dias, enquanto para o controle foi de 18,2 meq/Kg. Observaram também que a mistura do extrato de alecrim com BHT nas proporções 75:25, 50:50 e 25:75, apresentaram efeito sinérgico na prevenção da oxidação do óleo de soja. O efeito antioxidante do extrato de alecrim se deve em parte pela capacidade de sequestrar o radical ($O_2^{\bullet -}$).

Foram preparados extratos de folhas de orégano em diclorometano e metanol. O extrato de metanol foi fracionado e a parte solúvel em acetato de etila apresentou forte capacidade antioxidante sobre o ácido linoléico, quando medida pelo método do tiocianato férrico. Dessa fração foram isolados três compostos e um deles, o fenil glucosídeo, apresentou atividade antioxidante comparável com BHA em ácido linoléico; o mesmo foi observado com o composto que foi purificado a partir da fração metanol em 0,5% de ácido fórmico, o qual foi determinado como ácido fenil propiônico 2 cafeoiloxi-3-(2(4-hidroxibenzil) 4,5 dihidroxi). Todos os antioxidantes fenólicos isolados apresentaram capacidade antioxidante, sendo que o fenil glicosídeo e o ácido fenil propiônico 2 cafeoiloxi-3-(2(4-hidroxibenzil) 4,5 dihidroxi) apresentaram melhor capacidade (Kikuzaki et al., 1989).

Vekiari et al. (1993b) fracionaram o extrato etanólico de orégano com vários solventes (éter de petróleo, éter etílico, acetato etílico e butanol). A fração solúvel em éter etílico foi a mais efetiva em proteger a banha (no escuro a 65°C) contra a oxidação e com atividade semelhante à do BHT. O mesmo ocorreu com óleos vegetais refinados, sob condições diferentes de estocagem (escuro a 35°C e 65°C) e fritura.

Vekiari et al. (1993a) testaram a atividade antioxidante de extratos de orégano obtidos com vários solventes (hexano, éter etílico, acetato etílico e etanol) na concentração de 0,02% em banha, mantida no escuro a 65°C. O índice de peróxido foi utilizado para avaliar a oxidação da banha. Todos os extratos foram tão efetivos quanto o BHT e superior ao BHA em proteger a banha da oxidação.

Cahyana et al. (1992) isolaram compostos antioxidantes de alga marinha. Pirofeofitina a (H1), um composto relacionado com clorofila a, foi um composto identificado em *Eisinia bicyclis* e teve atividade antioxidante maior do que a do α -tocoferol. A clorofila a e a feofitina agem como fotosensores em luz, mas como antioxidantes no escuro pelo mesmo mecanismo que os antioxidantes fenólicos. A feofitina e o H1 extraído tem atividade antioxidante comparáveis.

2.3 Métodos para avaliação da atividade antioxidante

Inúmeras técnicas têm sido desenvolvidas para a avaliação de antioxidantes. A determinação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras adicionados de antioxidantes, é utilizada para avaliar a capacidade dos antioxidantes em retardarem a oxidação. A estabilidade dos óleos adicionados de antioxidantes pode ser determinada pela estocagem desses produtos em condições normais de armazenamento, mas geralmente são utilizadas condições aceleradas e análises são realizadas periodicamente para verificação das alterações químicas, físicas e organoléticas. Os métodos de Oxigênio Ativo (AOM) e teste em estufa ("Schaal Oven Test") são dois métodos acelerados bastante utilizados. Outros métodos requerem uma instrumentação complexa (Oxidograph, Rancimat e OSI (Oil Stability Instrument)) (Faria, 1994 e Hill, 1994).

Na oxidação lipídica ocorrem alterações primárias que podem ser medidas por perda de ácidos graxos insaturados, oxigênio incorporado (ganho de peso) e pela quantidade de hidroperóxidos e dienos conjugados formados. As alterações secundárias são monitoradas pela quantidade de compostos carbonila, malonaldeído e outros aldeídos, hidrocarbonetos e produtos fluorescentes formados (Gray, 1978 e Shahidi, 1996).

A oxidação de ácidos graxos polinsaturados pode ser acompanhada pelo aumento da absorbância no ultravioleta. A formação de dienos e trienos conjugados é proporcional ao ganho de oxigênio e formação de peróxidos durante os estágios iniciais de oxidação. Os dienos e trienos conjugados formados exibem intensa absorção em 234 nm e 268 nm, respectivamente (Shahidi & Wanasundara, 1996).

A tabela a seguir apresenta alguns compostos da oxidação lipídica e suas respectivas faixas de absorção na faixa do ultravioleta.

Tabela 2. Compostos da oxidação lipídica e suas respectivas faixas de absorção no UV

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
α -dicetona	280
α -cetoaldeído	282
β -dicetona	274
ácido α -cetônico	210

Fonte: Rovellini et al. (1997)

Marco (1968) desenvolveu um método rápido para medir a atividade antioxidante. O método foi baseado na capacidade do antioxidante minimizar a perda de cor (oxidação) do β -caroteno na emulsão ácido linoléico - β caroteno. Este método

foi simplificado por Miller (1971), sendo de procedimento simples, com resultados rápidos e requerendo pequenas quantidades de reagentes.

Araújo e Pratt (1985) isolaram de um extrato com metanol e água (50:50) de sementes de alfafa desengordurada um composto denominado quercitina. Utilizando o teste de Miller (1971), verificaram que a quercitina retardou a oxidação do β -caroteno no sistema modelo ácido linoléico - β caroteno.

A atividade antioxidante de extratos de camarão obtidos com diferentes solventes foi avaliada pelo método de Miller (1971) e comparada com o método de oxigênio incorporado (ganho de peso). O extrato etanólico de camarão foi o mais efetivo em retardar a oxidação do β -caroteno (perda de cor) comparado aos extratos obtidos com outros solventes, mas teve menor eficiência que o antioxidante sintético Tenox IV. Pelo método de ganho de peso, o extrato etanólico de camarão atribuiu um período de indução ao óleo de salmão (em estufa a 60°C), mais longo do que o antioxidante sintético BHT.

Melo (1989) determinou a atividade antioxidante de extratos metanólicos de castanha de caju, castanha do Brasil e dendê pelo sistema modelo ácido linoléico e β -caroteno (método de Marco e Miller) e pelo teste acelerado em estufa, acompanhado pelo índice de peróxido e malonaldeído. Todas as amostras apresentaram atividade antioxidante no sistema modelo, no entanto duas frações obtidas do extrato metanólico de castanha de caju não apresentaram atividade no teste acelerado em estufa.

A efetividade dos antioxidantes palmitato de ascorbila (PA), hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), tércio-butilhidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG), foram avaliadas em óleos de soja pelo método acelerado em estufa (Oven test method) a $60 \pm 0,5$ °C. A eficiência dos antioxidantes foi comparada através do índice de peróxido após dez dias de incubação. A qualidade oxidativa inicial do óleo influenciou de forma apreciável a atuação dos antioxidantes. O TBHQ foi o mais eficaz entre eles. A ordem crescente do efeito protetor foi BHA, PG, PA, BHT e TBHQ para o óleo de soja com maior índice de peróxido inicial. Quando o óleo não é devidamente protegido durante o processamento, a potência de antioxidantes como BHA, BHT, PG e PA e também de misturas comerciais de antioxidantes, não é suficiente para justificar o seu uso (Toledo et al., 1985).

Em teste acelerado de estufa (62,8°C/120hs), a combinação dos antioxidantes BHA e BHT em óleo bruto de castanha não apresentou nenhum efeito (Vieira & Regitano-d'Arce, 1997). Para o mesmo teste em estufa com os antioxidantes BHA, BHT e TBHQ, observou-se que o TBHQ foi o que melhor conservou a qualidade do óleo de castanha, com menores valores de índice de peróxido (Regitano-d'Arce & Vieira, 1996).

Amostras de molho Francês adicionadas de várias especiarias foram acondicionadas a 63 °C por oito dias, sendo avaliadas pelo desenvolvimento de peróxidos. Das especiarias testadas o orégano foi o que apresentou melhor capacidade antioxidante (Chipault et al., 1956).

O antioxidante rosmaridifenol obtido do alecrim foi testado em banha, mantida a 60°C no escuro por 28 dias. A atividade antioxidante do composto testado foi baseada na sua capacidade de inibir a formação de peróxidos. Os valores de peróxido foram 4,09; 17,01 e 3,37 meq/Kg para o rosmaridifenol, BHA, e BHT, respectivamente, adicionados à banha nas mesmas concentrações (0,02%) e mantidos sob as mesmas condições. A atividade antioxidante do rosmaridifenol superou a do BHA e foi próxima à do BHT (WU et al., 1982).

Pizzocaró et al. (1992) estudaram a estabilidade oxidativa de óleo de soja adicionados de diferentes antioxidantes de plantas, mantidos em estufa a 50°C. Utilizou como método analítico a avaliação espectrofotométrica na faixa do UV em 232 nm, para a determinação dos dienos conjugados.

Wanasundara e Shahidi (1994) avaliaram a atividade antioxidante de extrato etanólico de canola em óleo de canola submetido ao teste acelerado em estufa a 65°C por 17 dias. A oxidação do óleo foi avaliada por vários métodos, entre eles o índice de peróxido e determinação de dienos conjugados por absorbância em 234 nm. O extrato natural foi mais efetivo que o BHA e BHT e menos efetivo que o TBHQ.

O método do Rancimat foi utilizado por Chen et al. (1992) e Richheimer et al. (1998) na avaliação da atividade antioxidante de extratos de alecrim.

Basaga et al. (1997) utilizaram o sistema fenazina-metassulfato-NADH na avaliação da atividade antioxidante de extratos de alecrim.

Outros testes acelerados podem ser utilizados na avaliação de antioxidantes adicionados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. Várias pesquisas têm sido

desenvolvidas utilizando-se de testes acelerados em câmara de luz e em forno microondas. Os testes acelerados tornam-se cada vez mais procurados pela rápida obtenção dos resultados.

2.3.1 Fotoxidação

A energia radiante, seja ultravioleta (UV) ou visível, de fontes naturais (solar) e artificiais (fluorescente e incandescente), pode afetar a estabilidade de óleos, gorduras e alimentos gordurosos, através de reações fotoquímicas. A luz pode induzir essas reações de forma direta (reação fotoinduzida) ou indireta (reação fotosensitizada), sendo a primeira de menor importância pois necessita de maior energia de ativação para ocorrer (Bekbölet, 1990 e Espinoza & Faria, 1994).

A reação fotosensitizada inicia-se pela exposição do alimento à luz na presença de certas moléculas de fotossensores (feofitina, clorofila, etc.) e na presença de oxigênio. Os fotossensores ao absorverem energia luminosa, catalisam reações fotoquímicas, transformando o oxigênio tripleto em singleto, que irão reagir diretamente com as ligações duplas por adição, formando hidroperóxidos (Wilson & Hastings, 1970; Ogryzlo, 1970 e Berger & Hamilton, 1995). A presença de fotossensores nos óleos têm acelerado a oxidação principalmente na presença de luz. A quantidade de hidroperóxidos formados durante a fotoxidação é diretamente proporcional à quantidade de luz absorvida pelos óleos (Lundberg, 1962). A energia da fonte luminosa está diretamente relacionada com sua frequência. A radiação ultravioleta induz maior oxidação pois possui maior frequência. Por outro lado, pigmentos no óleo favorecem a absorção de radiações no espectro visível (Faria, 1991).

Óleos de milho, coco, canola e soja foram expostos à luz fluorescente em condições variáveis de tempo e temperatura. A oxidação dos óleos foi monitorada pelo índice de peróxido. Em temperaturas de 15°C e 30°C, os valores de peróxido para o óleo de soja foi menor que para os óleos de canola e milho durante 96 horas de exposição à luz. O mesmo ocorreu para 25°C com um tempo de exposição de 160 horas. Tanto o grau de insaturação do óleo quanto a presença de antioxidantes naturais e fotossensores podem influenciar na deterioração de óleos pela luz. Não foi

observado aumento na oxidação quando a luz foi desligada: a estabilidade dos óleos não apresentou correlação com o grau de insaturação; o aumento da temperatura teve efeito mínimo na oxidação dos óleos (Sattar et al., 1976a).

Foi encontrada uma forte correlação entre o resultado da análise sensorial e o índice de peróxido na avaliação da estabilidade de óleos e gorduras submetidos à fotoxidação. O índice de peróxido é um excelente critério na determinação do grau de oxidação dos óleos. Apesar da avaliação sensorial ser um método mais sensível, falta-lhe precisão e reprodutibilidade (Sattar et al., 1976b).

A oleoresina de alecrim foi testada em óleo de soja com teores normais e baixos de β -caroteno, clorofila e tocoferol. As amostras foram submetidas à ação da luz. Concentrações de 0,02% e 0,05% de oleoresina de alecrim tiveram atividade antioxidante, mas o antioxidante sintético TBHQ teve melhor efeito no controle da fotoxidação (Ill & Cuppett, 1993).

Em outra pesquisa, o efeito antioxidante da oleoresina de alecrim foi comparada com o antioxidante comercial rosmariquinona e com o TBHQ em óleo de soja com teores normais e reduzidos de β -caroteno, clorofila e tocoferol, em teste acelerado de fotoxidação. A rosmariquinona teve maior atividade antioxidante em óleo com teores normais β -caroteno, clorofila e tocoferol, mas o TBHQ foi superior em óleo de soja com baixos reduzidos de β -caroteno, clorofila e tocoferol (Ill et al., 1994).

Em teste acelerado de fotoxidação com óleo de soja refinado por um período de 120 hs, dos vários tratamentos com BHT, BHA, TBHQ, ácido cítrico, α -tocoferol e β -caroteno, o TBHQ (200ppm) foi o mais eficiente em produzir valores de peróxido, absorbância específica em 232 e 270 nm mais baixos do que os outros tratamentos (Siqueira & Regitano d'Arce, 1997).

Siqueira et al. (1997) realizaram um teste de fotoxidação em câmara de luz durante 48 horas e um ensaio ambiente utilizando-se de embalagem PET por 6 meses. A fotoxidação do óleo de milho adicionado de BHA+BHT (200ppm), BHA+BHT (200ppm) + ácido cítrico (100ppm) e ácido cítrico (100ppm) foi avaliada pelo índice de peróxido, acidez, dienos e trienos conjugados (232 e 270 nm). Verificou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos, nos dois ensaios. Ao final de 6

meses de armazenamento no ambiente, o óleo apresentou índice de peróxido de 3 meq/Kg, valor atingido após 8 horas de fotoxidação em câmara de luz.

Siqueira (1998) comparou o teste de armazenamento ambiente com o teste de fotoxidação acelerado em câmara de luz, utilizando-se de óleos vegetais adicionados de diferentes antioxidantes. Para o acompanhamento da estabilidade dos óleos realizou análises de índice de peróxido, absortividade em 232 nm e 270 nm entre outras e observou ótima correlação entre o teste acelerado e o ambiente.

Moser et al. (1965) analisaram óleo de algodão, soja e outros em frascos transparentes tampados, colocados em câmara de luz composta por 6 lâmpadas fluorescentes de 14 W. Foram observadas alterações do valor de peróxido e do "flavor", com a exposição dos óleos à luz por 30 minutos a 1 hora. O teste em câmara de luz por 1 hora equivaleu ao teste em estufa a 60°C durante 4 dias. Foi verificado também o efeito de diversas embalagens na fotoxidação dos óleos. Embalagens de vidro transparente e plástico translúcido foram as que permitiram maior formação de peróxido comparadas com vidro âmbar.

O efeito da fonte de luz na fotoxidação do ácido linoléico foi medido com o reator cromatográfico à gás. A oxidação aumentou com a fonte luminosa na seguinte sequência: escuro, fluorescente, incandescente e UV (luz negra) e na proporção de 1:2:3:6, respectivamente. A luz negra promoveu maior oxidação. A lâmpada fluorescente e incandescente emitem alguma luz UV, mas a maior parte é na região do visível e UV (com comprimentos de onda menores que 760 nm). A lâmpada fluorescente tem 0,5 % de radiação próxima do UV. As embalagens podem ser uma barreira para a passagem de luz e foram também testadas pelo reator cromatográfico à gás. A sequência das melhores embalagens foram em ordem decrescente: poliéster metalizado, papel cera, polietileno de baixa densidade e nylon (Faria & Mukai, 1983).

Kiritsakis & Dugan (1984) acondicionaram óleo de oliva em embalagem de vidro e polietileno, cobertas com filme de alumínio ou não e expostas à luz solar e luz artificial. Verificaram que as amostras colocadas em embalagem de vidro desenvolveram menor quantidade de peróxido do que aquelas colocadas em embalagem de polietileno. O óleo colocado em embalagens cobertas com filme de alumínio também apresentaram valores menores de peróxido do que aqueles em embalagens descobertas.

A taxa de fotoxidação depende das características de transmissão, absorção e reflectância da embalagem e do alimento (Faria & Espinoza-Atencia, 1993).

A transmissão da luz UV é bastante intensa nos filmes de polietileno (PE), polipropileno (PP) e cloreto de polivinila (PVC), na ordem de 80%, mas os filmes de polietileno tereftalato (PET) absorvem os raios UV abaixo de 300 nm. A luz incidente na superfície da embalagem é em parte refletida, em parte, transmitida e em parte absorvida. A capacidade de transmissão serve como base para avaliar a proteção do material (Espinoza-Atencia & Faria, 1994).

Embalagens que transmitem comprimentos de onda entre 490 e 589,5 nm podem prevenir o desenvolvimento do ranço (Bekbölet, 1990).

2.3.2 Microondas

Microondas são definidas como ondas eletromagnéticas na frequência de 300 MHz a 300 GHz. As microondas se propagam da mesma maneira que as ondas de luz, elas são refletidas por objetos metálicos, absorvidas por alguns materiais dielétricos e transmitidas sem absorção significativa por outros materiais dielétricos (Decareau & Peterson, 1986).

Geralmente a frequência de aquecimento por microondas empregada é de 915 e 2450 MHz e resulta da interação dos constituintes químicos dos alimentos com um campo eletromagnético, a interação dos materiais dielétricos com as microondas através da agitação das moléculas nesse campo irá gerar calor (Decareau, 1985 e Decareau & Peterson, 1986).

No forno de microondas um tubo eletrônico de vácuo, chamado magnetron, produz campos elétricos alternados oscilando em alta frequência, denominado campo elétrico das microondas que muda de direção milhares de vezes por segundo (Buffler, 1993).

A conversão da energia das microondas em calor pode ser explicada basicamente por dois mecanismos: polarização iônica e rotação dipolo. Esses mecanismos são predominantemente associados com os constituintes aquosos iônicos dos alimentos e com seus constituintes sólidos associados (Decareau, 1985; Decareau & Peterson, 1986 e Buffler, 1993).

A polarização iônica ocorre quando íons em solução movem-se em resposta a um campo elétrico e colidem com outros íons convertendo energia cinética em calor. A maioria dos produtos alimentícios contém água em quantidades variadas e sais dissolvidos, as soluções de maior densidade ou mais concentradas geram muito calor através das numerosas colisões entre os íons que transferem energia para os átomos e moléculas vizinhas produzindo um aumento de temperatura do material dielétrico (Decareau & Peterson, 1986 e Buffler, 1993).

O mecanismo de aquecimento através da rotação dipolo depende da existência de moléculas polares e a água é o material polar mais comum nos alimentos. As moléculas de água em presença de um campo elétrico vão ter uma força de rotação que irão orientá-las na direção do campo. Quando o campo elétrico alternado é aplicado pela mudança de polaridade, as moléculas tendem a acompanhar essa mudança e ao se alinharem ao campo irão provocar colisões. Calor é gerado como resultado da rotação das moléculas ocorrendo um aumento de temperatura do material (Decareau & Peterson, 1986 e Buffler, 1993).

As propriedades dielétricas dos alimentos na frequência das microondas são determinadas pela composição química, modificadas pela estrutura física e são principalmente influenciadas pela quantidade de água livre e teor de sais dos produtos. Essas propriedades variam com a frequência e a temperatura. A atividade dielétrica relativa da água livre e dos sais dissociados é alta. No caso de alimentos sólidos desidratados, óleos e gorduras as propriedades dielétricas são muito baixas e relativamente independem da frequência e da temperatura (Mudgett, 1982). Para os óleos e gorduras o aquecimento por microondas não é esperado devido as propriedades dielétricas serem baixas, mas ocorre visto que eles possuem alta resistência elétrica (Decareau, 1985).

Mai et al (1980) aqueceram óleo de amendoim (100g) a 675 Wats por 5, 7, 10 e 15 minutos no microondas. Nenhuma alteração foi observada nos ácidos graxos após 15 min de aquecimento e não foi detectado nenhum ácido graxo trans.

Yoshida & Kajimoto (1986) extraíram lipídeos de grãos de soja (24,8 g) que haviam sido submetidos ao aquecimento por microondas (500 Wats, 2450MHz e potência alta) durante 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 minutos. Com 8 min de aquecimento foram observadas mudanças significativas nas espécies moleculares que continham mais de

4 duplas ligações, houve decréscimo de 17% dos dienos (ácido linoléico) e 30% dos trienos (ácido linolênico) além das outras espécies moleculares que foram quantificadas por cromatografia de camada delgada. Visto que o mesmo não ocorreu para Mai et al, então o tempo de aquecimento no microondas pode variar com o peso das amostras e a potência do forno de microondas.

Mais recentemente o microondas tem sido usado nas sínteses orgânicas para reduzir consideravelmente o tempo de reação em experiências orgânicas clássicas. O uso do microondas como fonte de energia permitiu a transformação de ácidos graxos em poucos minutos. Além de diminuir o tempo de reação, diminuiu também o uso de solventes e reagentes quando comparado com metodologias convencionais. Reagentes, substratos e solventes foram aquecidos em forno de microondas (650 W, 2450 MHz e potência baixa) por 1 a 10 minutos. Ocorreu epoxidação de ésteres de ácidos graxos insaturados, formação de esteres furanóides C18, hidrólise de triglicerídeos, esterificação de ácidos graxos livres e uma variedade de reações envolvendo derivados de éster de ácidos graxos (Jie & Yan-Kit, 1988).

Yoshida & Kajimoto (1989) estudaram o efeito do aquecimento por microondas nos tocoferóis de 3 cultivares de grãos de soja em relação à degradação oxidativa. Os grãos foram aquecidos no microondas (0,5kW, 2.450 MHz e potência alta) por 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 10 e 12 min. Ocorreu decréscimo gradual das concentrações dos tocoferóis e 40% deles foram perdidos após 12 min de aquecimento. Com o aumento do tempo de aquecimento houve progressiva oxidação dos lipídeos que pode ser verificada pelo aumento dos valores de carbonila, p-anisidina e absorbância em 420 nm e esses valores se correlacionaram. Além disso houve decréscimo de dienos (ácido linoléico) e trienos (ácido linolênico) já constatado por Yoshida e Kajimoto (1986). A cor dos lipídeos mudou de amarelo para marrom, em parte, devido à oxidação dos ácidos graxos insaturados.

As propriedades químicas de óleos vegetais (linhaça, soja, milho, oliva e palma) em relação ao conteúdo de tocoferóis foram investigadas após aquecimento por microondas. Os óleos (10g) foram aquecidos em vidro âmbar (25 ml) selados com filme de polietileno por 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 20 min. Os óleos desenvolveram "off flavor" após 20 min de aquecimento, exceto o óleo de linhaça que o desenvolveu após 12 min além de adquirir cor amarelada. Pelo aumento dos valores de peróxido, carbonila, p-

anisidina, TBA e dienos e trienos conjugados (leitura em 232 e 268 nm) verificou-se um aumento da oxidação com o aumento do tempo de aquecimento. Esses valores foram maiores para os óleos com maiores quantidades de ácido linolênico (Yoshida et al., 1990).

Amostras de ésteres etílicos de ácidos graxos e de óleos vegetais isentos de tocoferóis foram adicionadas de diferentes concentrações de α , β , γ e δ tocoferol em vidro âmbar selado com filme de polietileno e aquecido em microondas por 4, 8, 12 e 20 minutos. Da mesma forma que Yoshida e Kajimoto (1989) e Yoshida et al. (1990) observou-se também aumento da oxidação com o aumento do tempo de aquecimento. As mudanças químicas variaram mais lentamente para o laureato de etila (permanecendo suas propriedades quase constantes) do que para o oleato e linoleato de etila, durante o aquecimento. O mesmo foi observado para o estearato de etila. As reações hidrolíticas em óleo de milho e soja foram controladas por compostos epóxidos produzidos durante a oxidação térmica. Toda mudança química no óleo aumentou lentamente nos 4 primeiros minutos de aquecimento. Após 20 minutos de aquecimento os valores de TBA e carbonila foram muito baixos. Os tocoferóis em óleo insaturado foram mais estáveis que em óleos saturados com o aquecimento de microondas (Yoshida et al., 1991).

Da mesma maneira que o estudo anterior, Yoshida et al. (1993) investigaram o efeito dos diferentes tocoferóis em várias concentrações na estabilidade oxidativa de linoleato de etila e óleos de soja, colza e palma isentos de tocoferóis aquecidos no microondas por 4, 8, 12, 16 e 20 minutos. Todos os tocoferóis tiveram algum efeito em estabilizar o linoleato de etila e os óleos vegetais. A formação de peróxidos foi menor com o aumento das concentrações dos tocoferóis. A efetividade dos tocoferóis como antioxidantes tem sido atribuída principalmente à habilidade de interferir na reação em cadeia através da ligação com radicais livres peroxila.

Yoshida & Kajimoto (1994) verificaram que o óleo extraído de sementes de gergelim que foram aquecidas por microondas (2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 25 e 30 minutos) não teve diferenças aparentes na maioria das propriedades bem como índice de peróxido, valor carbonila e anisidina, até 8 minutos de aquecimento. Após este tempo, o valor de peróxido aumentou gradualmente. Os produtos indicadores de oxidação secundária foram muito baixos durante o aquecimento por microondas. O índice de

acidez já era alto no óleo antes do aquecimento, esse valor não teve diferença significativa até 20 minutos de aquecimento.

Vieira (1998) observou que o aquecimento por microondas induziu a oxidação do óleo de soja, milho e canola adicionados de antioxidantes. Após 8 minutos de aquecimento houve aumento significativo dos valores de absortividade em 232 nm, sendo que para valores de absortividade em 270 nm as alterações ocorreram significativamente a partir de 4 minutos de aquecimento. A autora verificou que não houve diferença significativa entre os antioxidantes BHA+BHT, ácido cítrico e a mistura BHA+BHT+ácido cítrico, em nenhum dos tempos de aquecimento em microondas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

Para a realização deste estudo, utilizou-se óleo de soja refinado, isento de antioxidantes e de ácido cítrico, acondicionados em lata e cedidos por indústria brasileira de óleos. Inicialmente foram realizadas as análises físico-químicas de caracterização do óleo, o qual em seguida foi acondicionado em frascos PET (polietileno tereftalato) e congelados até o início dos ensaios.

Os extratos etanólicos de alecrim e orégano foram preparados a partir de especiarias desidratadas obtidas no mercado em embalagens de 6 e 10g respectivamente (marcas Linguanotto e Kitano) e álcool etílico 95% da marca Simco. Os antioxidantes sintéticos utilizados foram o TBHQ (marca Eastman) e uma mistura (1:1) de BHA e BHT (marca Sigma).

A embalagem de PET utilizada no estudo foi obtida da indústria produtora de embalagem para óleos vegetais e foi submetida a várias avaliações.

3.2 MÉTODOS

Para o preparo dos extratos etanólicos naturais foram pesados 5 g das folhas desidratadas de alecrim e orégano e trituradas com 350 ml de álcool etílico em homogeneizador (multi processador Arno) na potência 2 durante 2 minutos. Em seguida, a mistura foi filtrada em papel de filtro e evaporada em evaporador rotativo sob vácuo, à temperatura de 50 °C até um volume máximo de 20 ml. As concentrações de trabalho 500 mg/Kg de extrato de alecrim e 1000 mg/Kg de extrato de orégano foram baseadas nesta diluição, peso de folha seca por ml de etanol, equivalendo a 61 mg/Kg e 67 mg/Kg do extrato etanólico seco de alecrim e orégano, respectivamente. Os valores de 500 mg/Kg e 1000 mg/Kg foram definidos através de testes preliminares.

A atividade antioxidante dos extratos naturais de alecrim e orégano em comparação com os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHA+BHT foram avaliadas pelo método espectrofotométrico desenvolvido por Marco (1968) e modificado por Miller (1971) e Araújo (1995), pelos testes de oxidação acelerada em estufa e câmara de luz, armazenamento ao ambiente e sob condições de aquecimento por microondas.

Os extratos de alecrim e orégano e os antioxidantes TBHQ e a mistura BHA+BHT foram adicionados diretamente ao óleo de soja e homogeneizados manualmente durante 5 minutos. Amostras de óleo sem adição de antioxidantes foram mantidas como controle.

A partir de ensaios preliminares alguns tratamentos foram escolhidos para o estudo. Para comparar a atividade antioxidante dos extratos naturais com os sintéticos foram realizados cinco ensaios.

3.3 ENSAIOS

3.3.1 Atividade antioxidante em sistema modelo β -caroteno e ácido linoléico

Foi utilizado o método de Marco (1968), modificado por Miller (1971) e simplificado por Araújo (1995), baseado na capacidade de diferentes antioxidantes reduzirem a oxidação (perda de cor) do β -caroteno na emulsão β -caroteno-ácido linoléico, medidas pelo decréscimo na absorbância em 470 nm durante 1 a 2 horas de reação.

Neste método foram testadas soluções etanólicas de 100 e 200 mg de TBHQ/Kg, 200 mg de BHA+BHT/Kg, 500 e 1000 mg de extratos etanólicos de alecrim e orégano/Kg. Adicionou-se 0,1 ml das soluções etanólicas dos antioxidantes naturais e sintéticos em tubos de espectrofotômetro, juntamente com o sistema modelo (ácido linoléico, Tween 40 e β -caroteno) e um tubo controle sem adição de antioxidantes. Após leitura inicial de absorbância em 470 nm (espectrofotômetro Femto 432C), os tubos foram colocados em banho-maria a 50 °C por um período de 60 minutos e retirados a cada 5 minutos para a realização das leituras de absorbância (470 nm). O ensaio foi realizado em duplicata com duas repetições.

3.3.2 Oxidação acelerada em estufa

Para o teste de oxidação acelerada em estufa, foram escolhidos os melhores tratamentos do ensaio 1. Foram realizados três testes em estufa, todos eles com amostras de 20 g de óleo de soja acondicionadas em “beakers” de 50 ml abertos, colocadas em estufa a 63°C (± 1) por períodos variados.

No teste 1, os tratamentos: adição de 200 mg de TBHQ/Kg, 200 mg de BHA+BHT/Kg, 500 mg do extrato de alecrim (A)/Kg, 1000 mg do extrato de orégano (O)/Kg de óleo de soja e um controle sem adição de antioxidantes, foram colocados em estufa por 1,5; 3; 5 e 7 dias.

Em seguida (teste2) foram testadas as misturas: 500 mg do extrato de alecrim/Kg com 1000 mg do extrato de orégano/Kg (A+O); 25, 50, 75 e 100 mg de TBHQ/Kg com a mistura A+O anterior e um controle (isento de antioxidantes) em óleo de soja e colocados em estufa por 7 dias.

Para confirmar o teste anterior conduziu-se o terceiro teste, em que 25, 50, 75 e 100 mg de TBHQ/Kg de óleo de soja foram mantidos em estufa por 7 dias. Todos os tratamentos foram conduzidos em triplicata.

As amostras de óleo de todos os testes e o óleo no tempo inicial foram submetidas às seguintes análises: absorbância específica em 232 e 270 nm, espectro na faixa do ultravioleta de 220 a 320 nm e índice de peróxido.

3.3.3 Armazenamento ambiente

As amostras de óleo de soja foram acondicionadas em embalagens PET (500 ml) e armazenadas em condições ambiente no Laboratório de Óleos e Gorduras do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (ESALQ/USP), por um período de seis meses (fevereiro a julho de 1999). Os seguintes tratamentos foram avaliados em triplicata: 500 mg do extrato de alecrim/Kg, 1000 mg do extrato de orégano/Kg, 100 e 200 mg de TBHQ/Kg e um controle (sem antioxidante), as análises de absorbância específica em 232 e 270 nm, espectro na faixa do ultravioleta de 220 a 320 nm e índice de peróxido foram realizadas mensalmente.

A embalagem PET utilizada neste ensaio foi caracterizada pelas dimensões, peso, capacidade volumétrica, transparência e relação superfície-volume.

A intensidade luminosa no ambiente de armazenamento foi determinada com luxímetro da marca ELLE. Foram também anotadas as temperaturas médias e umidade relativa durante todo o período de armazenamento.

3.3.4 Fotoxidação acelerada em câmara de luz

Este ensaio foi realizado para verificar uma correlação com o ensaio de armazenamento ambiente, podendo então substituí-lo. Neste ensaio foram avaliados quatro tratamentos: 500 mg do extrato de alecrim/Kg, 1000 mg do extrato de orégano/Kg, 100 e 200 mg de TBHQ/Kg e um controle (isento de antioxidantes). Amostras de 20 g de óleo em “beakers” de 50 ml abertos foram colocadas em triplicata em uma caixa retangular de dimensões 80 x 35 x 60 cm, de alvenaria, com 6 lâmpadas fluorescentes de 20W, 3 lâmpadas na parte superior e as outras 3 na parte inferior da caixa (Figura 1), de forma que a luz atingisse com a máxima intensidade possível todas as amostras. A intensidade luminosa da câmara foi de 8.370 lux.

O ensaio de fotoxidação acelerada foi conduzido conforme Siqueira (1998) por um período de 120 horas e a cada 24 horas amostras foram submetidas às análises de absorbância específica em 232 e 270 nm, espectro na faixa do ultravioleta de 220 a 320 nm e índice de peróxido.

Figura 1. Câmara de Fotoxidação conforme Siqueira (1998)

3.3.5 Oxidação acelerada por aquecimento em microondas

Foi utilizado forno de microondas (marca Sanyo, modelo EM-804 TGR, potência efetiva de 800 W, frequência de 2.450 MHz) para o aquecimento das 15 amostras (3 repetições) de óleo (20 g cada) acondicionado em “beaker” com capacidade de 50 ml selados com filme de polietileno. As amostras foram dispostas equidistantemente ao longo de uma circunferência de 25 cm de diâmetro sobre o prato giratório. No ensaio 5.1 os seguintes tratamentos foram testados: 500 mg do extrato de alecrim/Kg, 1000 mg do extrato de orégano/Kg, 200 mg de BHA+BHT/Kg e 200 mg de TBHQ/Kg e um controle (isento de antioxidantes), as amostras foram aquecidas por 15, 35, 40, 60, 120 e 180 minutos. No ensaio 5.2 foram avaliadas as misturas: 500 mg do extrato de alecrim/Kg com 1000 mg do extrato de orégano/Kg (A+O), 25, 50, 75, 100, 200 mg/Kg com a mistura (A+O), 200 mg de BHA+BHT/Kg com a mistura (A+O) e um controle, sendo aquecidas por 60 minutos. Após cada período de aquecimento dos ensaios, foi determinada a temperatura das amostras com um termopar (K – termocouple Hanna Instruments, modelo HI93530). Após o resfriamento das amostras em temperatura ambiente (23 ± 1 °C) realizaram-se as análises de absorbância específica em 232 e 270 nm e espectro na faixa do ultravioleta de 220 a 320 nm.

3.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

3.4.1 Análises Físicas

3.4.1.1 Absortividade em 232 e 270 nm

Foi determinada espectrofotometricamente conforme a NDG C-40 (SSOG, 1976). O óleo foi diluído em isoctano, de forma que a leitura de absorbância estivesse entre 0,2 e 0,8. Foram utilizados, portanto, balões de 25 ou 50 ml de capacidade, dependendo do estado oxidativo do óleo. Foi utilizado o espectrofotômetro Shimadzu, modelo UV 1203. Os resultados nos comprimentos de onda expressos em absortividade foram dados pela fórmula:

$$\text{Absortividade} = A / (c.e)$$

Sendo: A= absorvância registrada no comprimento de onda utilizado

c= concentração (g 100 mL⁻¹) da solução amostrada

e= largura da cubeta utilizada (cm)

3.4.1.2 Espectro de absorvidade na faixa do espectro ultravioleta – 220 a 320 nm

Realizado segundo a IUPAC (1979), método II.D.23, com as mesmas diluições em isoctano e o mesmo espectrofotômetro mencionado no item anterior. A varredura foi realizada através do programa “Personal Spectroscopy” versão 1.1. Cada valor de absorvância foi convertido em absorvidade através do fator de concentração

3.4.2 Análises Químicas

3.4.2.1 Índice de Peróxido

Verificado segundo as normas da AOCS-Cd 8-53 (1983), através da dissolução de amostras de 5 g de óleo em solução ácido acético (3:2) e adição de solução iodeto de potássio saturada, seguida de titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,01 N. O volume gasto, após adição de goma de amido, indicou a concentração de peróxidos em meq/Kg, através da fórmula:

$$IP = [N \times (ml \text{ de tiosulfato amostra} - ml \text{ de tiosulfato branco}) \times 1000] / p$$

Sendo: N = normalidade da solução de tiosulfato de sódio

p = peso da amostra (g)

3.4.2.2 Índice de Acidez

Realizado segundo as normas da AOCS – Ca 5 a-40 (1983), com a dissolução de amostras de 5 g de óleo em álcool etílico a quente (60-65 °C) e titulação com solução de hidróxido de sódio 0,1 N. O volume gasto indicou a porcentagem de ácidos graxos livres (em ácido oléico) através da fórmula:

$$\% \text{ AGL} = (ml \text{ de hidróxido de sódio} \times 28,2 \times N) / p$$

Sendo: N= normalidade da solução hidróxido de sódio

p= peso da amostra (g)

3.4.2.3 Índice de Iodo

Realizado segundo Wijs (AOCS – Cd 1-25, 1983), através da dissolução de amostras de 0,2 – 0,22 g de óleo em tetracloreto de carbono e em solução de Wijs, permanência por 30 minutos no escuro e titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,1 N após a adição de KI 15% e água destilada. A viragem foi verificada adicionando-se goma de amido. A insaturação é conhecida pela quantidade de iodo, em mg, absorvidos por 100 mg de amostra, conforme a fórmula:

$$II = [(B - A) \times 12,69 \times N] / p$$

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 (g)

3.4.3 Melhor dose e dose econômica

A partir de valores de peróxido obtidos do ensaio em estufa a 63°C por 7 dias para o óleo de soja adicionado de concentrações variadas de TBHQ (25, 50, 75, 100 e 200 mg/Kg), foram determinadas a melhor dose e a dose econômica. Foi utilizado o programa estatístico Sanest (Sistema de análise estatística) para obtenção da curva de regressão polinomial do antioxidante TBHQ.

Para a obtenção da curva de regressão polinomial dos dados de índice de peróxido e concentração de TBHQ, a equação quadrática foi obtida:

$$y = ax^2 + bx + c$$

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

x = dose de antioxidante (mg/Kg)

Através da derivada da equação para obter-se o máximo de qualidade do óleo, isto é $dy/dx=0$, calculou-se a melhor dose de TBHQ.

A dose econômica (D.E.) foi obtida utilizando-se da equação descrita por Gomes (1990):

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

onde: a e b são os valores da equação quadrática

3.4.4 Análise Estatística

Os ensaios 2, 3, 4 e 5 foram conduzidos em triplicata no esquema fatorial modelo inteiramente casualizado, considerando os fatores antioxidante e período de amostragem. Foi aplicado o teste de Tukey para médias do fator antioxidante, médias do fator período de amostragem e para médias da interação entre antioxidante e período de amostragem, considerando o nível de significância de 5%. Utilizou-se o programa de análise estatística Sanest.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização inicial do óleo de soja está apresentada na Tabela 3, alguma diferença foi encontrada nos óleos de soja utilizados nos ensaios, mas observou-se que o índice de iodo está dentro do valor característico (120 a 143 mg I/100 mg) para óleo de soja. Com relação às características de qualidade, apresentaram valores baixos de índice do acidez, peróxido e absortividade em 232 e 270 nm. Apesar das diferenças entre os óleos, eles apresentaram valores de peróxido e acidez bem abaixo do limite permitido pela legislação (10meq/Kg peróxido e 0,6 mg de KOH/g acidez), indicando boa qualidade inicial (FAO/OMS, 1992).

Tabela 3. Caracterização inicial do óleo de soja refinado

Características	óleo do ensaio 2 e 5	óleo do ensaio 3 e 4
Absortividade em 232 nm	4,912	4,672
Absortividade em 270 nm	2,122	3,287
Índice de acidez (mg KOH/g)	0,098	0,087
Índice de iodo (mg I/100 mg)	131,322	139,50
Índice de peróxido (meq O ₂ /Kg)	0,400	0,100

4.1 Atividade antioxidante em sistema modelo β -caroteno e ácido linoléico

Os valores de absorbância em 470 nm diminuíram com o tempo para todos os tratamentos, com exceção da mistura BHA+BHT. Os tratamentos que retardaram a oxidação (perda de cor da emulsão) foram em ordem decrescente, 200 mg de BHA+BHT/Kg seguido por 200 mg e 100 mg de TBHQ/Kg, 1000 mg do extrato de alecrim/Kg que se sobrepôs, teve a mesma eficiência que 500 mg do mesmo extrato/Kg e 1000 mg e 500 mg do extrato de orégano/Kg. Dessa primeira determinação

escolheram-se os melhores tratamentos para uma segunda determinação cujos resultados podem ser vistos na Figura 2. Os extratos naturais foram eficientes em retardar a oxidação, mas os antioxidantes sintéticos foram melhores. Melo (1989), utilizando também o método de Marco (1968), verificou que a atividade antioxidante do BHT era maior do que a do extrato metanólico de castanha de caju; que a dos extratos metanólicos de dendê e castanha do Brasil foram superiores ao BHT em retardar a oxidação da emulsão. Pasquel & Babbitt (1991) verificaram, pelo mesmo método, que o antioxidante sintético Tenox IV foi mais eficiente que os extratos de camarão em diversos solventes. Os extratos de camarão tiveram atividade antioxidante e, dentre eles, o extrato etanólico foi o melhor.

Figura 2. Absorbância em 470 nm do sistema modelo ácido linoléico-β-caroteno a 65°C.

4.2 Oxidação acelerada em estufa

Nos três testes observou-se aumento dos índices de peróxido e de absorvidade em 232 e 270 nm com o tempo de estocagem na estufa, indicando a

formação de compostos primários e secundários da oxidação lipídica, mais acentuada no controle do que nos tratamentos.

As Figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8 apresentam a variação do índice de peróxido (Figuras 3, 5 e 7) e da absortividade em 232 nm (Figuras 4, 6 e 8) entre médias de tratamento para cada tempo, para os testes 1, 2 e 3, respectivamente. As letras minúsculas no topo das colunas indicam a semelhança ou não entre os tratamentos no tempo.

Não se observou diferença significativa entre os resultados de peróxido ou absortividade em 232nm (Figuras 3 e 4), em nível de 5%, nos tempos 1,5 e 3 dias. A diferença entre os tratamentos começou a ser percebida estatisticamente após 5 e 7 dias, sendo que o tratamento que mais protegeu o óleo da oxidação foi 200 mg de TBHQ/Kg. 500 mg do extrato de alecrim/Kg teve ação protetora comparável a 200 mg de BHA+BHT/Kg e a 1000 mg do extrato de orégano/Kg em cinco dias. Vieira (1998) também observou diferença significativa de óleos vegetais adicionados de antioxidantes a partir de 4 dias em estufa a 63 °C tanto nos valores de peróxido como de absortividade em 232 nm, acréscimos significativos nesses valores foram observados entre 5 e 6 dias de estufa. Chang et al. (1977), ao compararem extrato de alecrim com a mistura BHA, BHT, galato de propila e ácido cítrico, verificaram que o extrato natural foi tão eficiente em retardar a oxidação quanto a mistura dos antioxidantes sintéticos em gordura animal e foi superior em óleo vegetal. Wu et al. (1982) também observaram que a adição de 0,02% de extrato de alecrim em banha estocada no escuro a 60°C por vários dias foi comparável ao BHT e superior ao BHA nas mesmas concentrações. Os valores de absortividade em 270 nm não apresentaram diferença significativa em nível de 5% entre os tratamentos em nenhum tempo. Os espectros de absortividade (varredura) entre 220 e 320 nm também indicaram diferença entre os tratamentos após 7 dias de estufa (Figura 9).

Figura 3 - Índice de peróxido de óleo de soja, adicionado de antioxidantes, mantido em estufa a 63°C por até 7 dias. (C.V. = 21,060%; d.m.s. 5% = 9,419)

Figura 4 - Absortividade em 232 nm de óleo de soja, adicionado de antioxidantes, mantido em estufa a 63°C por até 7 dias. (C.V. = 9,679%; d.m.s. 5% = 1,522)

Os resultados de índice de peróxido e absortividade em 232 nm apresentaram o mesmo comportamento, indicando boa correlação entre esses dois valores. Gutierrez (1995) ao comparar os dados de índice de peróxido com os de absortividade em 232 nm de óleo de castanha do Pará submetido ao teste de estufa, também observou comportamento semelhante. Siqueira (1998) encontrou correlação de 0,937 entre o índice de peróxido e absortividade em 232 nm de óleos de canola, milho e soja submetidos à fotoxidação.

A partir desses resultados decidiu-se testar misturas dos extratos naturais com concentrações menores do antioxidante sintético TBHQ, o mais eficiente no ensaio anterior e com isso verificar a possibilidade de se recomendar uma menor dose de TBHQ juntamente com os extratos naturais. No teste 2, as amostras foram mantidas em estufa por 7 dias, pois foi nesse tempo que se percebeu boa diferença entre os tratamentos no teste 1. Após 7 dias, todos os tratamentos protegeram o óleo da oxidação quando comparados com o controle.

Figura 5 - Índice de peróxido do óleo de soja, adicionado de antioxidantes, mantido em estufa a 63°C por 7 dias. (C.V. = 28,037%; d.m.s. 5% = 16,960)

Os valores de peróxido e absortividade em 232 nm das misturas 25, 50, 75 e 100 mg de TBHQ/Kg com a mistura de alecrim e orégano (A+O) (Figuras 5 e 6) não se

diferenciaram estatisticamente em nível de 5%. A presença do TBHQ foi determinante para o melhor desempenho, como pode ser depreendido pelo resultado da adição apenas dos extratos naturais.

Figura 6 - Absortividade em 232 nm de óleo de soja, adicionado de antioxidantes, mantido em estufa a 63°C por 7 dias. (C.V. = 10,668%; d.m.s. 5% = 2,132)

No teste 2 não houve diferença significativa em nível de 5% entre nenhum dos tratamentos para os valores de absortividade em 270 nm. Observou-se novamente a boa correlação entre os valores de peróxido e absortividade em 232 nm.

Para verificar se a adição dos extratos de alecrim e orégano aumentou a eficiência do TBHQ, conduziu-se o teste 3, em que o óleo de soja foi adicionado das mesmas concentrações de TBHQ (25, 50, 75 e 100 mg/Kg) e foi mantido na estufa por 7 dias, desta vez sem os extratos naturais. Os valores de peróxido e absortividade em 232 nm do óleo com diferentes concentrações de TBHQ não foram diferentes em nível de significância de 5% (Figura 7). Ao comparar a Figura 5 com a Figura 7 ficou claro que a adição da mistura (A+O) com as diferentes concentrações de TBHQ não promoveu melhoria no poder antioxidante do TBHQ. Verificou-se que os valores de peróxido e absortividade em 232 nm dos óleos adicionados de TBHQ e da mistura (A+O) foram semelhantes aos valores dos óleos com apenas TBHQ.

Figura 7 - Índice de peróxido de óleo de soja, adicionado de TBHQ, mantido em estufa 63°C por 7 dias. (C.V. = 25,645%; d.m.s. 5% = 13,311)

Figura 8 - Absortividade em 232 nm de óleo de soja, adicionado de TBHQ, mantido em estufa a 63°C por 7 dias. (C.V. = 9,187%; d.m.s. 5% = 1,713)

4.3 Melhor dose e dose econômica

Dentre os tratamentos com antioxidantes sintéticos foi possível determinar tanto a melhor dose como a dose econômica de TBHQ recomendada para adição em óleo de soja.

Para determinar a melhor dose do antioxidante TBHQ recomendada utilizou-se a análise de regressão polinomial dos valores de peróxido dos óleos de soja para a obtenção da equação quadrática dos óleos de soja adicionados das diferentes doses de TBHQ (0, 25, 50, 75, 100 e 200 mg/Kg) após 7 dias de estufa a 63° C. A equação obtida foi:

$$y = 0,00466201 x^2 + 1,2014066 x + 61,227352 \quad (\text{eq. 1})$$

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

x = dose de antioxidante (mg/Kg)

Através da derivada da equação para obter-se o máximo de qualidade do óleo, isto é, dy/dx=0, calculou-se a melhor dose de TBHQ, 128,85 mg/Kg.

Para calcular a dose econômica, considerou-se o preço do óleo de soja refinado, US\$ 736,9/t e o preço do TBHQ US\$ 28,66/Kg. A partir dos valores de a e b da equação quadrática tem-se equação de dose econômica (D.E.):

$$D. E. = [(\text{preço do óleo/preço TBHQ}) - 1,2014066] / 0,00932402 \quad (\text{eq. 2})$$

Assim sendo, o valor para a dose econômica de TBHQ foi de 126,09 mg/Kg.

Vieira & Regitano-d'Arce (in press) verificaram que a melhor dose de TBHQ para óleo de castanha do Pará foi de 84,95 mg de TBHQ/Kg ao testar doses de 0 a 100 mg do antioxidante/Kg de óleo mantido em estufa por 120 horas. Regitano-d'Arce (1998) analisando os dados de fotoxidação de Almeida-Doria et al. (1998) com o mesmo procedimento matemático chegou a valor de melhor dose de TBHQ de 162,12 para o óleo de castanha do Pará. Os valores recomendados variam com a qualidade inicial do óleo, tipo de embalagem, forma de conservação e condições de armazenamento (Regitano-d'Arce et al., 1999).

Comparando-se os resultados do ensaio 1 com os resultados do teste 1 (estufa), verifica-se que a seqüência dos melhores tratamentos não foi a mesma. Enquanto que, em sistema modelo ácido linoléico e β -caroteno a 50°C, o melhor tratamento foi 200 mg de BHA+BHT/Kg, no teste de estufa com o óleo de soja, 200 mg de TBHQ/Kg foi o mais eficiente. Para os extratos naturais, a ordem crescente de eficiência nos dois ensaios foi a mesma: 1000 mg do extrato de orégano/Kg e 500 mg do extrato de alecrim/Kg. Melo (1989) observou que extratos metanólicos de castanha de caju, castanha do Brasil e fruto do dendezeiro apresentaram atividade antioxidante tanto no sistema modelo de ácido linoléico e β -caroteno, como no teste em estufa com óleos vegetais, acompanhado pelo índice de peróxido e de malonaldeído. No entanto, a adição de frações dos extratos ao óleo de soja em estufa, também não demonstrou a mesma atividade encontrada no sistema modelo ácido linoléico e β -caroteno. Enquanto no sistema modelo a temperatura de aquecimento da emulsão ácido linoléico e β -caroteno foi de 50°C, no teste em estufa a temperatura de aquecimento foi um pouco maior (63°C). O material lipídico utilizado nos dois ensaios foi diferente, enquanto que no teste em estufa o óleo de soja contém uma variedade de ácidos graxos insaturados (oléico, linoléico e linolênico), o sistema modelo contém somente o ácido linoléico. Essas diferenças entre os testes podem ter influenciado nos resultados, tornando-os contraditórios.

Pelos resultados obtidos nos testes 1, 2 e 3 em estufa no tempo de 7 dias, temos a seqüência em ordem crescente de índice de peróxido: 200 mg de TBHQ/Kg, 100, 75, 50 e 25 mg de TBHQ/Kg não foram diferentes de 25, 50, 75 e 100 mg de TBHQ/Kg adicionados da mistura A+O. A mistura A+O e 500 mg do extrato de alecrim/Kg apresentaram eficiência comparável à de 200 mg de BHA+BHT/Kg e 1000 mg do extrato de orégano/Kg não diferiram da amostra controle.

Os espectros de absortividade entre 220 e 320 nm das amostras dos três testes em estufa durante 7 dias são apresentados na Figura 9, sendo que a seqüência dos tratamentos coincide com a dos valores de peróxido apresentada anteriormente.

Figura 9 - Espectros de absorvância na faixa do UV entre 220 e 320 nm do óleo de soja mantido em estufa a 63°C por 7 dias.

Foi realizado um ensaio de armazenamento ambiente, buscando elucidar as contradições dos ensaios anteriores e para se conhecer o verdadeiro comportamento dos antioxidantes em condições de comercialização.

4.4 Armazenamento ambiente

Este ensaio foi realizado para a obtenção de resultados que se aproximassem mais das condições reais e compará-los com os resultados obtidos anteriormente pelos ensaios acelerados.

A intensidade luminosa no ambiente de armazenamento foi de 210 lux, como a encontrada nos pontos de venda de óleos vegetais.

Tabela 4. Caracterização da embalagem PET

Características	Medidas
Formato	cilíndrico
Dimensões	18 cm x 6 cm (altura x diâmetro)
Capacidade volumétrica	500 ml
Peso	28,8 g
Espessura da parede	0,26 mm
Relação superfície/volume	0,66

As embalagens utilizadas neste ensaio mantiveram a mesma relação superfície/volume das embalagens comerciais. Siqueira (1998) verificou que a embalagem PET impede a passagem de luz em comprimentos de onda inferiores a 300 nm e possuem a máxima transmitância da luz em comprimentos de onda de 400 a 700 nm. A embalagem de polietileno tereftalato pode proteger o óleo contra a oxidação pois possui transmitância dentro da faixa indicada por Bekbölet (1990) entre 490 e 589,5 nm.

Tabela 5. Temperatura e umidade relativa durante o armazenamento ambiente de óleo de soja acondicionado em embalagem PET.

Período de armazenamento	Temperatura média (°C)	Umidade Relativa média %
Janeiro	28,6	66,8
Fevereiro	27,2	63,5
Março	27,7	67,8
Abril	26,3	58,9
Maio	23,5	54,1
Junho	21,5	60,8
Julho	22,1	59,0

Observou-se um pequeno aumento nos valores de peróxido durante o armazenamento, indicando que a oxidação do óleo ocorreu lentamente, com valores iniciais de 0,10 para 2,42 meq/Kg para o controle após 6 meses. Pequenas diferenças

foram observadas entre os tratamentos em cada mês de armazenamento. Os valores estão apresentados na Tabela 6.

A maior diferença entre os tratamentos foi observada no primeiro mês de armazenamento; nos meses seguintes não houve diferença significativa em nível de 5%, entre os tratamentos.

A sequência dos melhores tratamentos com relação aos menores valores de peróxido ao longo dos 6 meses de armazenamento foi : 200 seguido de 100 mg de TBHQ/Kg, controle e 500 mg do extrato de alecrim não diferiram significativamente em nível de 5% e 1000 mg do extrato de orégano/Kg. Verificou-se que somente o TBHQ apresentou alguma atividade antioxidante nos três primeiros meses de ensaio.

Tabela 6. Índice de peróxido (meq/Kg) de óleo de soja, acondicionado em frascos PET e armazenados em condições ambientes.

Tratamentos	Tempo (meses)						
	0	1	2	3	4	5	6
Controle	0,10 ^A	1,55 ^C	2,00 ^A	1,93 ^B	2,33 ^A	2,59 ^A	2,42 ^A
500 mg/Kg alecrim	0,10 ^A	1,74 ^B	1,96 ^A	2,00 ^{AB}	2,16 ^B	2,29 ^B	2,42 ^A
1000 mg/Kg orégano	0,10 ^A	2,36 ^A	2,03 ^A	2,00 ^{AB}	2,19 ^B	2,23 ^B	2,54 ^A
100 mg/Kg TBHQ	0,10 ^A	1,39 ^D	2,00 ^A	2,00 ^{AB}	2,00 ^C	2,22 ^B	2,40 ^A
200 mg/Kg TBHQ	0,10 ^A	0,88 ^E	1,70 ^B	2,10 ^A	2,28 ^{AB}	2,19 ^B	2,46 ^A

C.V.= 3,033 %

d.m.s. 5%= 0,145

Os valores constituem médias de três repetições, as médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si em nível de 5 % de significância, pelo teste de Tukey.

Siqueira (1998), ao avaliar antioxidantes sintéticos em óleo de soja armazenados por 180 dias ao ambiente, nas mesmas condições deste ensaio, observou que os valores de peróxido aumentaram muito pouco durante o armazenamento e também não chegaram a valores acima do permitido pela legislação brasileira (10 meq/Kg). Os valores foram de 2,28 a 4,29 meq/Kg para o controle nos tempos inicial e final de armazenamento. Verificou também que não houve diferença significativa entre os tratamentos nos valores de absortividade em 232 e 270 nm. Gutierrez (1995), ao armazenar óleo de castanha-do-Pará adicionado de antioxidantes,

em vidro âmbar por 6 meses, observou diferença entre dois tratamentos nos valores de peróxido, a partir de 112 dias de armazenamento.

Nos quatro primeiros meses de armazenamento houve pequeno aumento nos valores de absorvidade em 232 nm, sendo que nos meses seguintes esses valores sofreram uma pequena redução, mas de modo geral não apresentou diferença significativa. Gutierrez (1995) e Siqueira (1998) também observaram que não houve aumento significativo dos valores de absorvidade em 232 nm em ensaios de armazenamento de óleos de castanha-do-Pará, soja, milho e canola, em condições ambiente durante 180 dias. A Tabela 7 apresenta os valores de absorvidade em 232 nm. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ao longo dos 6 meses de armazenamento. O mesmo ocorreu para os valores de absorvidade em 270 nm, que estão apresentados na Tabela 8. Verificou-se que tanto os antioxidantes naturais quanto o sintético, não ofereceram proteção extra ao óleo. Vieira (1998) verificou que não houve diferença significativa entre as amostras de óleo de soja adicionadas de antioxidantes e armazenadas em condições ambiente por 180 dias, tanto para valores de peróxido, quanto para valores de absorvidade em 232 e 270 nm. O armazenamento das amostras por 90 dias levou a valores de peróxido encontrados a 63° após 2 dias, sem contudo observar-se diferença entre os tratamentos.

Tabela 7. Absorvidade em 232 nm de óleo de soja, acondicionado em frascos PET e armazenados em condições ambientes.

Tratamentos	Tempo (meses)						
	0	1	2	3	4	5	6
Controle	4,61 ^A	4,69 ^B	4,73 ^A	4,88 ^B	5,01 ^A	4,65 ^A	4,67 ^A
500 mg/Kg alecrim	4,61 ^A	4,68 ^B	4,67 ^A	4,89 ^{AB}	4,91 ^A	4,60 ^A	4,65 ^A
1000 mg/Kg orégano	4,67 ^A	4,82 ^A	4,68 ^A	4,93 ^{AB}	4,89 ^A	4,62 ^A	4,63 ^A
100 mg/Kg TBHQ	4,67 ^A	4,75 ^{AB}	4,70 ^A	4,87 ^B	4,89 ^A	4,70 ^A	4,71 ^A
200 mg/Kg TBHQ	4,67 ^A	4,77 ^{AB}	4,73 ^A	5,00 ^A	4,97 ^A	4,66 ^A	4,70 ^A

C.V.= 1.105 %

d.m.s. 5%= 0,121

Os valores constituem médias de três repetições, as médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si em nível de 5 % de significância, pelo teste de Tukey.

Os valores de absorvidade em 270 nm, não aumentaram com o tempo, possivelmente devido à volatilização dos compostos formados da quebra dos hidroperóxidos. Outros estudos Gutierrez (1995), Siqueira (1998) e Vieira (1998) observaram o mesmo comportamento em ensaio ambiente por 180 dias.

Tabela 8. Absorvidade em 270 nm de óleo de soja, acondicionado em frascos PET e armazenados em condições ambientes.

Tratamentos	Tempo (meses)						
	0	1	2	3	4	5	6
Controle	3,24 ^A	3,27 ^A	3,28 ^A	3,34 ^B	3,36 ^A	3,22 ^A	3,25 ^A
500 mg/Kg alecrim	3,24 ^A	3,27 ^A	3,22 ^A	3,34 ^B	3,35 ^A	3,21 ^A	3,23 ^A
1000 mg/Kg orégano	3,29 ^A	3,32 ^A	3,23 ^A	3,38 ^{AB}	3,34 ^A	3,21 ^A	3,20 ^A
100 mg/Kg TBHQ	3,29 ^A	3,32 ^A	3,26 ^A	3,33 ^B	3,35 ^A	3,24 ^A	3,21 ^A
200 mg/Kg TBHQ	3,29 ^A	3,30 ^A	3,28 ^A	3,42 ^A	3,39 ^A	3,22 ^A	3,24 ^A

C.V.= 0,888 %

d.m.s. 5%= 0,067

Os valores constituem médias de três repetições, as médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si em nível de 5 % de significância, pelo teste de Tukey.

O espectro de absorvidade na faixa de 220 a 320 nm, apresentado na Figura 10, mostra que realmente não houve diferença entre os tratamentos ao final de 6 meses de armazenamento e não houve variação significativa do óleo no tempo inicial.

Figura 10. Espectro de absorvidade na faixa do UV entre 220 e 320 nm para o óleo de soja acondicionado em frascos PET armazenados por 6 meses.

Neste ensaio não foi avaliado o tratamento 200 mg de BHA+BHT/Kg, como foi feito no ensaio em estufa, pois já havia sido verificado por Siqueira (1998), que esse tratamento em óleo de soja armazenado ao ambiente nas mesmas condições deste ensaio, não teve efeito antioxidante e também não foi diferente dos outros tratamentos para todos os valores obtidos nas análises realizadas.

Ao tentar se obter uma correlação deste ensaio com os do teste 1 (estufa), percebe-se que somente com um maior tempo de armazenamento, seria possível a comparação visto que os valores obtidos durante 6 meses de armazenamento em condições ambiente, se aproximam dos obtidos em estufa nos tempos 1,5 e 3 dias. Nesses tempos também não houve diferença significativa entre os tratamentos. A comparação deste ensaio com o ensaio 1 (método espectrofotométrico) também não pode ser feita, visto que não houve diferença entre os tratamentos durante os 6 meses de armazenamento.

4.5 Fotoxidação acelerada em câmara de luz

O tempo de armazenamento ambiente não foi suficiente para que o óleo se deteriorasse significativamente, sendo necessário um maior tempo de armazenamento. Este ensaio acelerado em câmara de luz foi realizado para que num menor período de tempo fosse possível verificar a ação da luz na estabilidade oxidativa do óleo adicionado de antioxidantes.

Houve aumento dos valores de peróxido, absorvibilidade em 232 e 270 nm com o tempo de exposição à luz, indicando seu efeito oxidativo na formação de compostos primários e secundários.

Pelos valores de peróxido observou-se que houve diferença significativa entre os tratamentos em todos os tempos de exposição à luz. A Figura 11 ilustra a diferença entre os tratamentos em cada tempo. Os melhores tratamentos foram 200 e 100 mg de TBHQ/Kg. Os extratos naturais não tiveram efeito antioxidante.

Siqueira (1998) também observou que o antioxidante TBHQ foi o mais eficiente em manter os valores de peróxido e absorvibilidade em 232 e 270 nm do óleo de soja baixos comparados com os óleos adicionados de BHA, BHT, ácido cítrico, α -tocoferol e β -caroteno em teste de fotoxidação acelerada durante 120 horas em câmara de luz.

Figura 11. Índice de peróxido do óleo de soja submetido à fotoxidação acelerada em câmara de luz. (C.V. = 23,102; d.m.s. 5% = 1,560)

Através da absorvidade em 232 nm, pode ser observado que 1000 mg do extrato de orégano/Kg apresentou certo efeito antioxidante a partir de 72 horas de exposição à luz que o diferenciou estatisticamente do controle e do alecrim. Contudo este pequeno efeito antioxidante não se fez notar no índice de peróxido.

Tabela 9. Absorvidade em 232 nm de óleo de soja adicionado de antioxidantes e submetido à fotoxidação acelerada em câmara de luz.

Tratamentos	Tempo (horas)					
	0	24	48	72	96	120
Controle	4,61 ^A	5,15 ^A	6,08 ^A	6,99 ^A	7,81 ^A	8,74 ^A
500 mg/Kg alecrim	4,61 ^A	5,14 ^{AB}	5,89 ^A	6,79 ^B	7,67 ^A	8,70 ^A
1000 mg/Kg orégano	4,67 ^A	5,23 ^A	5,97 ^A	6,55 ^C	7,41 ^B	8,32 ^B
100 mg/Kg TBHQ	4,61 ^A	4,95 ^{BC}	5,35 ^B	5,54 ^D	5,84 ^C	6,11 ^C
200 mg/Kg TBHQ	4,61 ^A	4,94 ^C	5,18 ^B	5,53 ^D	5,68 ^C	5,85 ^D

C.V.= 1,308 %

d.m.s. 5%= 0,190

Os valores constituem médias de três repetições, as médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si em nível de 5 % de significância, pelo teste de Tukey.

A oleoresina de alecrim (0,02 e 0,05%) apresentou atividade antioxidante em teste de fotoxidação acelerada, mas o antioxidante TBHQ foi mais capaz de retardar a ação da luz (Ill & Cuppett, 1993).

A rosmariquinona sintética, um antioxidante natural presente no alecrim, apresentou maior atividade antioxidante em comparação com a oleoresina de alecrim e o TBHQ em óleo de soja, mas foi menos eficiente que o TBHQ em óleo de soja com teores reduzidos de clorofila, β -caroteno e tocoferol, em teste de fotoxidação acelerada (Ill et al., 1994).

O espectro de absorvidade na faixa de 220 a 320 nm, para os tempos 24, 72 e 120 horas de exposição à luz, está apresentado nas Figuras 12, 13 e 14. Estas figuras demonstram o desenvolvimento da oxidação com o tempo. Verifica-se que houve um aumento de absorvidade na faixa de 220 até 255, sendo que em 232 nm é bem visível a diferença entre os tratamentos, indicando a formação de dienos conjugados em quantidades reduzidas nos tratamentos com TBHQ. Pela Tabela 10 e através das

Figuras 12, 13 e 14, pode ser observado que não houve aumento da absorvidade em 270 nm e não houve diferença entre os tratamentos em nível de 5 % de significância.

Tabela 10. Absorvidade em 270 nm de óleo de soja adicionado de antioxidantes e submetido à fotoxidação acelerada em câmara de luz.

Tratamentos	Tempo (horas)					
	0	24	48	72	96	120
Controle	3,29 ^A	3,22 ^A	3,17 ^B	3,16 ^A	3,07 ^A	3,06 ^A
500 mg/Kg alecrim	3,29 ^A	3,24 ^A	3,15 ^B	3,09 ^A	3,09 ^A	3,09 ^A
1000 mg/Kg orégano	3,29 ^A	3,25 ^A	3,31 ^A	3,14 ^A	3,10 ^A	3,07 ^A
100 mg/Kg TBHQ	3,29 ^A	3,21 ^A	3,23 ^{AB}	3,13 ^A	3,09 ^A	3,04 ^A
200 mg/Kg TBHQ	3,29 ^A	3,23 ^A	3,18 ^B	3,16 ^A	3,12 ^A	3,06 ^A

C.V.= 1,335 %

d.m.s. 5%= 0,097

Os valores constituem médias de três repetições, as médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si em nível de 5 % de significância, pelo teste de Tukey.

Figura 12. Espectro de absorvidade na faixa do UV de 220 a 320 nm de óleo de soja submetido à fotoxidação acelerada em câmara de luz por 24 horas.

Figura 13. Espectro de absorvidade na faixa do UV de 220 a 320 nm de óleo de soja submetido à fotoxidação acelerada em câmara de luz por 72 horas.

Figura 14. Espectro de absorvidade na faixa do UV de 220 a 320 nm de óleo de soja submetido à fotoxidação acelerada em câmara de luz por 120 horas.

4.6 Oxidação acelerada por aquecimento em microondas

O ensaio de oxidação do óleo de soja em forno de microondas foi realizado esperando valores de absortividade em 232 nm equivalentes aos da oxidação em estufa nos tempos 5 e 7 dias do teste 1, e com isso poder estabelecer uma comparação do comportamento dos antioxidantes em estudo neste trabalho.

Foram anotadas as temperaturas das amostras a cada tempo de aquecimento.

Tabela 11. Temperatura do óleo de soja após cada tempo de aquecimento em microondas.

Tempo (minutos)	15	35	40	60	120	180
Temperatura (°C)	205	230	233	247	235	235

Segundo Vieira (1998), a absortividade em 232 nm se mostrou um bom índice para o acompanhamento do efeito do aquecimento por microondas sobre a estabilidade oxidativa de óleos. Devido à instabilidade dos peróxidos às altas temperaturas, estes não se correlacionaram com a absortividade em 232 nm, após aquecimento do óleo de soja em tempos superiores a 6 minutos. Albi et al. (1997) e Yoshida et al. (1990) verificaram que o aumento do tempo de aquecimento de óleos vegetais no microondas resultaram em aumento nos valores de peróxido, ao contrário de Vieira (1998), que observou redução dos valores de peróxido a partir de 6 minutos de aquecimento de óleos vegetais no microondas. Isto é explicado pelas condições experimentais, tanto do forno como quantidade de óleo aquecida.

A análise de dienos conjugados é um método mais rápido de determinação do que o índice de peróxido; além de ser muito mais simples. não depende de reações químicas ou do desenvolvimento de cor e requer amostras pequenas (Shahidi & Wanasundara, 1996).

Pelas razões expostas anteriormente neste ensaio foram realizadas somente as análises de absortividade no UV.

Os óleos de soja aquecidos em forno de microondas apresentaram aumento dos valores de absortividade em 232 nm com o aumento do tempo. Para a amostra controle, os valores de absortividade em 232 nm foram 4,89, 6,96 e 15,08 para os

tempos 0, 15 e 180 minutos de aquecimento, respectivamente, indicando a formação de dienos conjugados. As médias dos valores de absorvidade em 232 nm dos tratamentos em cada tempo de aquecimento estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Absorvidade em 232 nm de óleo de soja, submetido ao aquecimento por microondas.

Tratamentos	Tempo (minutos)						
	0	15	35	40	60	120	180
Controle	4,89 ^A	6,96 ^{AB}	8,19 ^A	8,83 ^A	10,24 ^A	11,22 ^B	15,08 ^A
500 mg/Kg alecrim	4,89 ^A	6,66 ^{AB}	8,18 ^A	8,61 ^A	9,32 ^B	10,99 ^B	14,86 ^{AB}
1000 mg/Kg orégano	4,89 ^A	6,53 ^B	7,85 ^A	8,52 ^A	9,31 ^B	12,14 ^A	14,72 ^{AB}
200 mg/Kg BHA+BHT	4,89 ^A	6,85 ^{AB}	8,37 ^A	8,69 ^A	10,44 ^A	11,60 ^{AB}	14,65 ^{AB}
200 mg/Kg TBHQ	4,89 ^A	7,23 ^A	8,23 ^A	8,52 ^A	9,39 ^B	10,99 ^B	14,42 ^B

C.V. = 2,687 %

d.m.s. 5% = 0,612

Os valores constituem médias de três repetições, as médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si em nível de 5 % de significância, pelo teste de Tukey.

Não houve diferença significativa em nível de 5% entre os tratamentos na maioria dos tempos. Com 60 minutos de aquecimento, os melhores tratamentos foram 200 mg de TBHQ/Kg, 500 mg do extrato de alecrim/Kg e 1000 mg/Kg do extrato de orégano. O tratamento 200 mg de BHA+BHT/Kg não teve efeito antioxidante e não foi diferente estatisticamente do controle. O aquecimento por 60 minutos foi o que melhor demonstrou diferença entre os tratamentos e equivaleu ao ensaio em estufa por 5 dias, tempo em que também foi observada diferença entre os tratamentos. Os valores de absorvidade dos melhores tratamentos nesse tempo foram 9,39; 9,32 e 9,32 para 200 mg de TBHQ/Kg, 500 mg do extrato de alecrim/Kg e 1000 mg do extrato de orégano/Kg respectivamente, sendo que para 200 mg de BHA+BHT/Kg e controle os valores foram 10,44 e 10,24, respectivamente. Nos outros tempos essa diferença não pode ser tão bem observada.

Yoshida et al. (1990) observaram aumento da oxidação com o aumento do tempo de aquecimento por microondas. Verificou que os óleos desenvolveram “off flavor” depois de 20 minutos de aquecimento, e que quanto maior a quantidade de ácido linolênico no óleo, maiores foram os valores de peróxido, dienos e trienos conjugados, carbonila, p-anisidina e TBA. Da mesma forma que Yoshida e Kajimoto

(1989) e Yoshida et al. (1990) observaram também aumento da oxidação com o aumento do tempo de aquecimento.

O tempo de 60 minutos de aquecimento no microondas equivaleu a 5 dias de estufa, sendo os valores de absorvidade do óleo de soja isento de antioxidantes (amostra controle) de 10,23 e 9,97 para 60 minutos de microondas e 5 dias de estufa, respectivamente. Para 180 minutos de microondas e 7 dias de estufa os seus valores de absorvidade em 232 nm foram 15,08 e 15,71, respectivamente. Os melhores tratamentos do ensaio em estufa (5 dias) foram também os melhores para o ensaio no microondas (60 minutos), com exceção do tratamento 200 mg de BHA+BHT/Kg que não teve atividade antioxidante sob microondas. Vieira (1998) também verificou que 200mg de BHA+BHT/Kg teve efeito antioxidante em teste de estufa, mas não foi efetivo sob aquecimento no forno de microondas.

Os valores de absorvidade em 270 nm aumentaram até os 35 minutos de aquecimento. Não houve diferença significativa entre os tratamentos ao longo do tempo de aquecimento (Tabela 13). Vieira (1998) também observou aumento dos valores de absorvidade com o aumento do tempo de aquecimento de óleos vegetais até 36 minutos. Os valores de absorvidade em 270 nm tiveram uma pequena redução após os 35 minutos de aquecimento, sendo que em 120 minutos ocorreu pequena elevação dos valores que se reduziu no tempo seguinte. Essas variações de maneira geral não foram significantes.

Tabela 13. Absorvidade em 270 nm de óleo de soja, submetido ao aquecimento por microondas.

Tratamentos	Tempo (minutos)						
	0	15	35	40	60	120	180
Controle	2,12 ^A	2,77 ^A	2,99 ^{AB}	2,83 ^A	2,64 ^A	2,91 ^{AB}	2,58 ^A
500 mg/Kg alecrim	2,12 ^A	2,67 ^A	2,90 ^{AB}	2,78 ^A	2,60 ^A	2,73 ^B	2,48 ^A
1000 mg/Kg orégano	2,12 ^A	2,64 ^A	2,79 ^B	2,68 ^A	2,59 ^A	2,97 ^A	2,49 ^A
200 mg/Kg BHA+BHT	2,12 ^A	2,70 ^A	3,08 ^A	2,82 ^A	2,58 ^A	2,90 ^{AB}	2,52 ^A
200 mg/Kg TBHQ	2,12 ^A	2,76 ^A	2,95 ^{AB}	2,75 ^A	2,73 ^A	2,74 ^B	2,50 ^A

C.V. = 3,344 %

d.m.s. 5% = 0,210

Os valores constituem médias de três repetições, as médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si em nível de 5 % de significância, pelo teste de Tukey.

Pela Figura 15 pode ser observado que não houve realmente diferença entre os tratamentos.

Figura 15. Espectros de absorvância na faixa do UV de óleo de soja submetido ao aquecimento no microondas durante 60 minutos.

O teste 2 foi realizado para testar a atividade antioxidante da mistura TBHQ com os extratos de alecrim e orégano, como foi feito no teste 2 em estufa. Foi escolhido o tempo de aquecimento de 60 minutos, tempo equivalente a 5 dias de estufa. Não houve diferença significativa entre os tratamentos do óleo de soja aquecido por 60 minutos no microondas para valores de absorvância em 232 e 270 nm (Tabela 14).

Tabela 14. Absortividade em 232 e 270 nm do óleo de soja submetido ao aquecimento por microondas durante 60 minutos.

Tratamentos	Absortividade	
	232 nm [*]	270 nm ^{**}
Controle	9,96 ^A	2,85 ^A
500 mg/Kg alecrim (A)	9,32 ^A	2,61 ^A
1000 mg/Kg orégano (O)	9,31 ^A	2,77 ^A
200 mg/Kg BHA+BHT	10,11 ^A	2,63 ^A
200 mg/Kg BHA+BHT + AO	9,11 ^A	2,74 ^A
200 mg/Kg TBHQ	9,07 ^A	2,69 ^A
25 mg/Kg TBHQ + AO	9,34 ^A	2,62 ^A
50 mg/Kg TBHQ + AO	9,44 ^A	2,67 ^A
75 mg/Kg TBHQ + AO	9,54 ^A	2,66 ^A
100 mg/Kg TBHQ + AO	9,06 ^A	2,79 ^A
200 mg/Kg TBHQ + AO	9,57 ^A	2,85 ^A
AO	9,26 ^A	2,77 ^A

^{*}C.V.= 4,113 % ^{*}d.m.s. 5%= 0,210

^{**}C.V.= 0,296 % ^{**}d.m.s. 5%= 0,355

Os valores constituem médias de três repetições, as médias seguidas por letras distintas, na coluna, diferem entre si em nível de 5 % de significância, pelo teste de Tukey.

Comparando-se este ensaio com o ensaio em estufa verifica-se que os extratos de alecrim e a mistura alecrim e orégano tiveram atividade antioxidante, foram comparáveis ao BHA+BHT e foram menos efetivos que o TBHQ em teste de estufa, sendo que no teste com microondas não houve diferença entre os tratamentos e nenhum deles apresentou efeito antioxidante.

Vieira (1998) avaliou antioxidantes adicionados vários os óleos vegetais em teste em estufa a 63°C (por 6 dias) e pelo aquecimento no microondas (por 36 minutos). Os antioxidantes que se mostraram efetivos na estufa, não tiveram efeito no microondas.

A Figura 16 apresenta os espectros de absortividade de todos os óleos aquecidos no forno de microondas por 60 minutos.

Figura 16. Espectros de absorvidade na faixa do UV dos óleos de soja submetidos ao aquecimento no microondas por 60 minutos

Percebe-se, facilmente, que ocorre intensa oxidação e os antioxidantes oferecem pouca proteção ao óleo de soja aquecido por uma hora em forno de microondas 800 W e 2450 MHz.

5 CONCLUSÕES

Os resultados da atividade antioxidante no sistema modelo (ácido linoléico e β -caroteno) não corresponderam aos do teste em estufa. A partir dos resultados dos ensaios em estufa, verificou-se que o melhor tratamento para a conservação do óleo foi 200 mg de TBHQ/Kg, e que não é necessária a adição desta quantidade para garantir a qualidade dos óleos. Neste estudo a melhor dose obtida de TBHQ foi 128,85 mg/Kg e a dose econômica foi de 126,09 mg de TBHQ/Kg. Os extratos etanólicos de orégano (1000 mg/Kg), de alecrim (500 mg/Kg) e a mistura deles (A+O) podem ser utilizados como antioxidantes naturais, e apresentaram a mesma eficiência em retardar a oxidação dos óleos que a mistura dos antioxidantes BHA+BHT, podendo substituí-los. No entanto os extratos naturais tiveram menor efeito antioxidante do que o antioxidante sintético TBHQ. A adição dos extratos naturais de alecrim e orégano ao TBHQ, em misturas, não é recomendada, visto que não melhorou sua capacidade antioxidante. O ensaio de armazenamento em condições ambiente foi muito curto para que fosse observada diferença entre os tratamentos e também por isso não foi comparável aos outros ensaios, somente com um maior tempo de armazenamento com valores mais altos de peróxido, se observasse o efeito dos antioxidantes. No ensaio de microondas também não houve diferença entre os tratamentos, verificando-se que tanto os extratos naturais quanto o TBHQ não tiveram ação antioxidante. Os extratos de alecrim e orégano não servem como antioxidantes na proteção do óleo de soja contra a ação da luz. Os extratos etanólicos de alecrim e orégano podem ser indicados como antioxidantes alternativos na conservação de óleos levando-se em consideração sua ação antioxidante e as condições de oxidação que será submetido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, R. F.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B.; VIEIRA, T. M. F. S.; SIQUEIRA, F. M. Estabilidade oxidativa de óleo bruto de castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*) submetido à fotoxidação. (Compact disc) In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 16., Rio de Janeiro, 1998. **Anais**. Rio de Janeiro: SBCTA, 1998.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official and tentative methods**. 3° ed. Champaign, AOCS, 1983.
- ARAÚJO, J.M.A. **Química de Alimentos**: teoria e prática. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa/Impr. Univ., 1995. Cap. 2, p. 65 -85.
- ARAÚJO, J.M.A.; PRATT, D.E. Quercetin from alfafa seeds as a lipid antioxidant. **Ciência Tecnologia Alimentos**, v. 5, n. 1, p. 22-30, 1985.
- BASAGA, H.; TEKKAYA, C.; ACIKEL, F. Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary-extract. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 30, n.1, p. 105-108, 1997.
- 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. **Develoments in oils and fats**. London: Chapman & Hall, 1995 cap. 7, p.192-204.

- BRACCO, V.; LÖLIGER, J.; VIRET, J.L. Production and use of natural antioxidants. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 58, n. 6, p. 686-690, 1981.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 22/77 do decreto lei nº 986 de 21 de abril de 1969. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO. **Compêndio da Legislação de Alimentos**. São Paulo: ABIA, 1991. v. 1A
- BUCK, D. F. Antioxidants. In: SMITH, J. **Food additive user's handbook** London: Chapman & Hall, 1997, cap. 1, p. 1-42.
- BUFFLER, C. R. Microwave cooking and processing: engineering fundamentals for the food scientist. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993. cap.1, p. 1-13; cap. 6, p. 69-83.
- CAHYANA, A.H.; SHUTO, Y.; KINOSHITA, Y. Pyropheophytin as antioxidative substance from the marine alga, Arame (*Eisenia bicyclis*). **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 56, n. 10, p. 1533-1535, 1992.
- CHANG, S.S.; OSTRIC-MATIJESEVIC, B.; HSIEH, O.A.L.; HUANG, C. Natural antioxidants from rosemary and sage. **Journal Food Science**, v. 42, n. 4, p. 1102-1106, 1977.
- CHEN, Q.; SHI, H.; HO, C. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 69, n. 10, p. 999-1002, 1992.
- CHIPAULT, J.R.; MIZUNO, G.R.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, v. 17, p. 47-55, 1952.
- CHIPAULT, J.R.; MIZUNO, G.R.; LUNDBERG, W.O. Antioxidant properties of spices in oil-in-water emulsions. **Food Research**, v. 20, p. 443-448, 1955.
- CHIPAULT, J.R.; MIZUNO, G.R.; LUNDBERG, W.O. The antioxidant properties of spices in food. **Food Technology**, v. 10, p. 209-211, 1956.

- CLAPP, N. K.; TYNDALL, R. L.; CUMMING, R. B.; OTTEN, J. A. Effects of butylated hydroxytoluene alone or with diethyl nitrosamine in mice. **Food Chemistry Toxicology**, v. 12, p.367-371, 1974.
- CUPPETT, S.; SCNEPF, M.; HALL III, C. Natural antioxidants – Are they a reality? In: SHAHIDI, F. (Ed) **Natural antioxidants – Chemistry, health effects and applications**. Champaign: AOCS Press, 1996. cap. 2, p. 13-24.
- DECAREAU, R. V. (Ed) **Microwave in the food processing industry**. Florida: Academic Press, 1985. 234p.
- DECAREAU, R. V.; PETERSON, R. A. Microwave processing and engineering. England: Ellis Horwood , 1986. 224p.
- DORKO, C. Antioxidants used in foods. **Food Technology**., v. 48, n.4, p. 33, April, 1994.
- DUGAN, L.R. Natural Antioxidants. In: SIMIC, M.G.; KAREL, M. (Ed.) **Autoxidation in food and biological systems**. New York: Plenum Press. 1980. p. 261-281.
- ECONOMOU, K. D., OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. Antioxidant activity of some plant extracts of the family *Labiatae*. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 68, n. 2, p. 109-113, 1991.
- ESPINOZA-ATENCIA, E. J.; FARIA, J. A.F. Fotoxidação de óleos comestíveis em embalagens plásticas transparentes. **Óleos e Grãos**, n.19, p.44-51, 1994.
- EVANS, R. J. Optimizing lipid stability with natural inhibitors. In: SHAHIDI, F. (Ed) **Natural antioxidants – Chemistry, health effects and applications**. Champaign: AOCS Press, 1996. Chap. 13, p. 225-244.
- 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.

- FARIA, J. A. F.; ESPINOZA-ATENCIA, E.J. Efeito da cor das garrafas de policloreto de vinila (PVC) na fotoxidação de óleos de soja. **Óleos e Grãos**, n. 11, p. 40-44, 1993.
- FARIA, J. A. F.; MUKAI, M. K. Use of a gas chromatographic reactor to study lipid photooxidation. **Journal American Oil Chemists' Society**, V. 60, n. 1, p. 77-81, 1983.
- FNP Consultoria e Comércio. **Agrianual 99**: Anuário da Agricultura Brasileira. São Paulo, 1999. p. 448 – 483: soja.
- GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**. São Paulo: Nobel, 1990. 468p.
- GRAY, J. I. Measurement of lipid oxidation: A review. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 55, p.539-546, 1978.
- GUTIERREZ, E. M. R. Estabilidade oxidativa do óleo bruto da castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*). Piracicaba, 1995. 83 p. Dissertação (mestrado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- HILL, S. E. Comparisons: measuring oxidative stability. **Inform**, v. 5, n. 1, p. 104-109, 1994.
- HOULIHAN, C.M.; HO, C.; CHANG, S.S. Elucidation of the chemical structure of a novel antioxidant, rosmaridiphenol, isolated from rosemary. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 6, p. 1036-1039, 1984.
- HUDSON, B.J.F. **Food Antioxidants**. New York: Elsevier Science Publishers, 1990. 317p.
- III, H. C.; CUPPETT, S. The effects of bleached and unbleached rosemary oleoresins on light-sensitized oxidation of soybean oil. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.70, n.5, p.477-482, May. 1993.

- III, H. C.; CUPPETT, S.; WHEELER, D.; FU, X. Effects of bleached and unbleached rosemary oleoresin and rosmariquinone on light-sensitized oxidation of soybean oil. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 7, n. 5, p. 533-535, May. 1994.
- IKEDA, G. J.; STEWART, J. E.; SAPIENZA, P. P.; PEGGIN, J. O.; MICHEL, T. C.; OLIVITO, V.; ALAM, H. Z., O'DONNELL, M.W.JR. Effect of subchronic dietary administration of butylated hydroxyanisole on canine stomach and hepatic tissue. **Food Chemistry Toxicology**, v. 42, p. 1201-1221, 1986.
- INATANI, R.; NAKATANI, N.; FUWA, H. Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 521-528, 1983.
- INATANI, R.; NAKATANI, N.; FUWA, H.; SETO, H. Structure of a new antioxidative phenolic diterpene isolated from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Agricultural Biological Chemistry**, v. 46, n. 6, p. 1661-1666, 1982.
- INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 6 ed. Oxford: IUPAC, 1979. p. 71.
- ITO, N.; HIROSE, M.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H.; SHIRAI, T.; TATEMATSU, M. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. **Food Chemistry Toxicology**, v.24, p. 1071-1082, 1986.
- IVERSON, F.; TRUELOVE, J.; NERA, E.; CLAYSON, D. B.; WONG, J. A 12 week study of butylated hydroxyanisole in the cynomolgus monkey. **Food Chemistry Toxicology**, v. 24, p. 1197-1200, 1986.
- JIE, M. S. F. K.; YAN-KIT, C. The use of a microwave oven in the chemical transformation of long chain fatty acid esters. **Lipids**, v. 23, n.4, p. 367-369, 1988.
- KIKUGAWA, K.; KUNUGI, A.; KURECHI, T. Chemistry and implications of degradation of phenolic antioxidants. In: HUDSON, B.J.F. (Ed.) **Food Antioxidants**. New York: Elsevier Science Publishers, 1990. cap.3, p.65-98.

- KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Origanum vulgare* L.). **Agricultural Biological Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 519-524, 1989.
- KIRITSAKIS, A. K.; DUGAN, L. R. Effect of selected storage conditions and packaging materials on olive oil quality. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 61, n.12, p. 1868-1870, 1984.
- LUNDBERG, W. O. In: SCHULTZ, H. W.; DAY, E. D.; SINNHUBER, R. O. **Symposium on foods: lipids and their oxidation**. Westport: AVI, 1962. p.31-50
- 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.
- MAI, J.; TSAI, C. H.; ARMBRUSTER, G.; CHU, P.; KINSELLA, J. E. Effects of microwave cooking on food fatty acids: no evidence of chemical alteration or isomerization. **Journal of Food Science**, v.45, p. 1753-1755, 1980.
- MARCO, G.I. A rapid method for evaluation of antioxidant. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 45, p. 594, 1968.
- MELO, M.S.O.N. Antioxidantes naturais da castanha do Brasil (*Bertholetia excelsa*, H.B.R.), da castanha do caju (*Anacardium occidentale*, L.) e do fruto do dendezeiro (*Eladis guineensis*, J.A.C.Q). São Paulo, 1989. 85p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- MILLER, H.E. A simplified method for evaluation of antioxidants. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 48, p.91, 1970.
- MOSER, H. A. ; EVANS, C. D.; COWAN, J. C.; KWOLEK, W. F. A light test to measure stability of edible oils. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 42, n. 1, p. 30-33, 1965.
- MUDGETT, R. E. Electrical properties of foods in microwave processing. **Food Technology**, v.36, n.2, p. 109-115, 1982.

- NAKATANI, N. Antioxidants from spices and herbs. In: SHAHIDI, F. (Ed) **Natural antioxidants – Chemistry, health effects and applications**. Champaign: AOCS, 1996. cap. 4, p. 65-75.
- NAKATANI, N.; INATANI, R. Structure of rosmanol, a new antioxidant from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Agricultural Biological Chemistry**, v. 45, n. 10, p. 2385-2386, 1981.
- NAKATANI, N.; KIKUZAKI, H. A new antioxidative glucoside isolated from oregano (*Origanum vulgare* L.). **Agricultural Biological Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2727-2732, 1987.
- NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Food Science and Nutrition**, v. 29, n.4, p. 273-300, 1990.
- NAWAR, W. W. Lipids. In FENNEMA, O. R. **Food chemistry**. 2 ed. New York: Marcel Dekker, 1985. p. 139-244.
- OGRYZLO, E. A. Physical properties of singlet oxygen. In: GIESE, A. C. (Ed.) **Photophysiology: current topics in photobiology and photochemistry**. New York: Academic Press, 1970. cap.2, p.35-46.
- PADLEY, F. B.; GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L. Occurrence and characteristics of oils and fats. In: GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; PADLEY, F. B. (Ed) **The lipid handbook**. London: Chapman & Hall, 1994. Cap. 3. p. 47-223.
- PASQUEL, L.J.R.; BABBITT, J.K. Isolation and partial characterization of natural antioxidant from shrimp (*Pandalus jordani*). **Journal Food Science**, v. 56, n. 1, p. 143-145, 1991.
- PATTERSON, H.B.W. **Handling and storage of oilseeds, oils, fats and meal**. New York: Elsevier Science Publishers, 1989. 394 p.
- PIZZOCARO, F.; GASPAROLI, A.; FEDELI, E.; AMBROGI, A. Studio dell'attività antiossidante del tessuto di ortaggi freschi. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v. 56, p. 555-561, 1992.

PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS sobre normas alimentarias. **Codex Alimentarius: texto abreviado**. Roma, 1992. p. 11.4 –11.5

REGITANO-d'ARCE, M. A. B.; VIEIRA, T. M. F. S.; SIQUEIRA, F. M.; ALMEIDA-DORIA, R. F. Vegetable oil stability analytical approach. In: CONGRESS AND EXHIBITION ON FATS AND OILS, 8., Santiago, 1999. **Resumo**. Washington: AOCS, 1999.

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**, 1996. p.174-176.

RICHHEIMER, S. L.; BERNART, M. W.; KENT, M. C.; BAILEY, D. T. Antioxidant activity of rosemary diterpenes. In: MEETING OF THE EUROPEAN SECTION OF AOCS, 2., Cagliari, 1998. Cagliari: AOCS, 1998.

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.

SATTAR A.; DEMAN, J.M.; ALEXANDER, J.C. Light-induced oxidation of edible oils and fats. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v.9, n.3, p.149-152, 1976.

SATTAR, A.; DEMAN, J.M.; ALEXANDER, J.C. Stability of edible oils and fats to fluorescent light irradiation. **Journal American Oil Chemists' Society**, v.53, p.473-477. July. 1976.

SHAHIDI, F. Natural antioxidants: an overview. In: SHAHIDI, F. (Ed) **Natural antioxidants – Chemistry, health effects and applications**. Champaign: AOCS, 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: AOCS, 1996. cap. 24, p. 379-395.

SHERWIN, E. R. Antioxidants. In: BRANEN, A. L.; DAVIDSON, M. P.; SALMINEN, S. (Ed) **Food Additives**. New York: Marcel Dekker, 1990. cap. 5, p. 139-194.

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

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

SIQUEIRA, F. M. Estabilidade oxidativa dos óleos de soja, milho e canola. Piracicaba, 1998. 91p. Dissertação (mestrado) Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.

SIQUEIRA, F.M.; REGITANO-d'ARCE, M.A.B. Efeito de diferentes antioxidantes na fotoxidação do óleo de soja refinado. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS-PROGRESSO E AÇÃO PARA O ANO 2000. 2., Campinas, 1997. **Resumos**. Campinas: UNICAMP, 1997. p.46.

SIQUEIRA, F.M.; REGITANO-d'ARCE, M.A.B.; VIEIRA, T.M.F.S. Ensaio de fotoxidação de óleo de milho refinado. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS-PROGRESSO E AÇÃO PARA O ANO 2000. 2., Campinas, 1997. **Resumos**. Campinas: UNICAMP, 1997. p.46.

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

STAZIONE SPERIMENTALE PER LE INDUSTRIE DEGLI OLI E DEI GRASSI. **Norme italiane per il controllo dei grassi e derivati**, 3.ed., Milano, 1976.

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

VEKIARI, S. A.; OREOPOULOU, V.; TZIA, C.; THOMOPOULOS, C. D. Oregano flavonoids as lipid antioxidants. **Journal American Oil Chemists Society**, v. 70, n. 6, p. 483-487, 1993b.

- VEKIARI, S. A.; TZIA, C.; OREOPOULO, V.; THOMOPOULOS, C. D. Isolation of natural antioxidants from oregano. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v. 70, n. 1, p.25-28, 1993a.
- 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 "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo.
- VIEIRA, T. M. F. S.; REGITANO-d'ARCE, M. A. B. Estabilidade oxidativa de óleo bruto de castanha do Pará (*Bertholletia excelsa*) aquecido por microondas. (Compact disc) In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 16., Rio de Janeiro, 1998. **Anais**. Rio de Janeiro: SBCTA, 1998.
- VIEIRA, T. M. S. ; REGITANO-d'ARCE, M. A. B. Antioxidant concentration effect on Brazil nut oil stability. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición** (in press).
- VIEIRA, T.M.F.S.; REGITANO-d'ARCE, M.A.B. Storage of Brazil nut (*Bertholletia excelsa*) crude oil: a study of antioxidants concentration. In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS-PROGRESSO E AÇÃO PARA O ANO 2000. 2., Campinas, 1997. **Resumos**. Campinas: UNICAMP, 1997. p.69.
- WANASUNDARA, V.N.; SHAHIDI, F. Canola extract as alternative natural antioxidant for canola oil. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 71, n. 8, p. 817-822, 1994.
- 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.50-91.
- WU, J. W.; LEE, M-N.; HO, C-T.; CHANG, S. S. Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 59, n. 8, p. 339-345, 1982.
- YOSHIDA, H.; HIROOKA, N.; KAJIMOTO, G. Microwave energy effects on quality of seed oils. **Journal of Food Science**, v. 55, n. 5, p.1412-1416, 1990.

- YOSHIDA, H.; HIROOKA, N.; KAJIMOTO, G. Microwave heating effects on relative stabilities of tocopherols in oils. **Journal of Food Science**, v. 56, n.4, p. 1042-1046, 1991.
- YOSHIDA, H.; KAJIMOTO, G. Effects of microwave energy on the tocopherols of soybean seeds. **Journal of Food Science**, v. 54, n.6, p. 1596-1600, 1989.
- YOSHIDA, H.; KAJIMOTO, G. Effects of microwave heating on the molecular species of soybean triacylglycerols. **Journal of Food Science**, v. 51, n. 6, p. 1476-1478 ;1490, 1986.
- YOSHIDA, H.; KAJIMOTO, G. Microwave heating affects composition and oxidative stability of sesame (*Sesamum indicum*) oil. **Journal of Food Science**, v. 59, n. 3, p. 613-616; 625, 1994.
- YOSHIDA, H.; KAJIMOTO, G.; EMURA, S. Antioxidant effects of d-tocopherols at different concentrations in oils during microwave heating. **Journal American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 10, p.989-995, 1993.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. **SANEST 2: Sistema de Análise Estatística para Computadores**. Piracicaba: SEI, 1992 (softer).