

VALÉRIA CRISTINA RAMALHO

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DE α -TOCOFEROL E EXTRATO DE ALECRIM
EM ÓLEO DE SOJA SUBMETIDO À TERMOXIDAÇÃO**

VALÉRIA CRISTINA RAMALHO

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DE α -TOCOFEROL E EXTRATO DE ALECRIM
EM ÓLEO DE SOJA SUBMETIDO À TERMOXIDAÇÃO**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Neuza Jorge

São José do Rio Preto
2005

Ramalho, Valéria Cristina.

Ação antioxidante de alfa-tocoferol e extrato de alecrim em óleo de soja submetido à termoxidação / Valéria Cristina Ramalho – São José do Rio Preto : [s.n.], 2005

154 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Neuza Jorge

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista.

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Óleos e gorduras. 2. Óleos vegetais. 3. Antioxidantes. 4. Tocoferol. 5. Extrato de alecrim. I. Jorge, Neuza. II. Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 664.34

VALÉRIA CRISTINA RAMALHO

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DE α -TOCOFEROL E EXTRATO DE ALECRIM
EM ÓLEO DE SOJA SUBMETIDO À TERMOXIDAÇÃO**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Prof^a. Dr^a. Neuza Jorge
Presidente e Orientadora

Prof. Dr. Odair Zenebon
2^o Examinador

Prof^a. Dr^a. Mieko Kimura
3^o Examinador

São José do Rio Preto, 09 de Setembro de 2005.

À memória do meu irmão Nei,
pela intensidade de sua presença em minhas realizações,
ainda que distante...

dedico....

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida feliz;

À minha orientadora, Prof^ª· Dr^ª· Neuza Jorge, pela dedicação, confiança, amizade e, sobretudo, pelo apoio técnico durante toda a elaboração deste trabalho;

Ao Prof. Dr. David Ariovaldo Banzatto, pela presteza na revisão das análises estatísticas e valiosas sugestões;

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos, com quem convivi durante o mestrado, pela constante demonstração de amizade;

Ao pessoal da biblioteca, pelo auxílio e atenção demonstrados;

À Prof^ª· Dr^ª· Miekko Kimura, pelo incentivo inicial tão importante naquele momento;

À Marta Gomes da Silva, pelo apoio na realização das análises dos teores de tocoferóis;

Às empresas Cargill Agrícola S. A. e Danisco S/A, pela doação das amostras e fornecimento de informações necessárias para a realização deste trabalho;

Ao Evandro, meu querido, pela presença ativa com muito amor, incentivo, atenção e carinho e pela compreensão nos meus longos períodos de ausência;

À minha irmã Vera, pela infinita cumplicidade e apoio incondicional;

Ao meu irmão Vagner, pelo apoio à minha formação profissional;

Ao meu pai Benedito (*in memoriam*), de quem me orgulho muito, pelo exemplo de vida que deixou, e a minha mãe Aparecida, que sempre me deu muito amor, carinho, estímulo e dedicação e, especialmente, por estar ao meu lado em todos os momentos;

À toda minha família, por acreditar em mim sempre, e;

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos avaliar, em condições de termoxidação, o comportamento e a atividade antioxidante do α -tocoferol naturalmente presente em óleo de soja e adicionado em óleo de soja purificado, o comportamento e a atividade antioxidante do extrato de alecrim adicionado em óleo de soja com seus tocoferóis originais e purificado e, ainda, verificar a influência do alecrim na resistência do α -tocoferol natural ou adicionado em óleo de soja. Para isso foram realizados três ensaios. No primeiro deles, o óleo purificado com alumina foi acrescido de várias concentrações de α -tocoferol ou de extrato de alecrim e, por meio de uma determinação preliminar da atividade antioxidante, as concentrações de 600 mg/kg para o α -tocoferol e de 1.000 mg/kg para o extrato de alecrim foram selecionadas a fim de serem submetidas aos ensaios posteriores. Nos segundo e terceiro ensaios, o óleo purificado adicionado das concentrações selecionadas dos antioxidantes citados ou da mistura dos mesmos e o óleo natural adicionado da concentração selecionada de extrato de alecrim foram aquecidos à temperatura de 180°C por 10 horas. Os resultados obtidos das determinações analíticas foram submetidos às análises de variância, em esquema fatorial, no delineamento inteiramente casualizado, de modo a determinar a influência dos fatores antioxidantes e tempos de aquecimento sobre as alterações nos óleos. Pelos resultados obtidos, tanto o α -tocoferol quanto o extrato de alecrim demonstraram ter efeito

protetor sobre o óleo de soja contra a oxidação propiciada pela alta temperatura, mas, em todas as determinações analíticas, a ação do α -tocoferol foi superior à do extrato de alecrim. A mistura dos dois antioxidantes, adicionada em óleo de soja purificado, promoveu um efeito protetor superior ao obtido pela aplicação de cada um deles de forma individual. Em óleo natural, o extrato de alecrim também se mostrou eficiente em retardar a oxidação. Observou-se também que, durante o aquecimento, tanto o α -tocoferol natural quanto o adicionado mostraram-se mais estáveis na presença do extrato de alecrim.

ABSTRACT

The aims of this work were to evaluate, in thermoxidation conditions, the behavior and antioxidant activity of α -tocopherol naturally present in soybean oil and the one added in purified soybean oil, the behavior and antioxidant activity of rosemary extract added in soybean oil with its original and purified tocopherols and, also, to verify rosemary influence on the resistance of natural α -tocopherol or the one added in soybean oil. In order to do that, three experiments were carried out. In the first one, a number of α -tocopherol or rosemary extract concentrations were added to the oil purified with alumina and, through a preliminary determination of the antioxidant activity, the concentrations of 600 mg/kg for α -tocopherol and 1.000 mg/kg for rosemary extract were selected in order to be submitted to the further experiments. In the second and third experiments, the purified oil added with the selected concentrations of the cited antioxidants or the mixture of them and the natural oil added with the selected concentration of rosemary extract were heated until the temperature of 180°C during ten hours. The results obtained from the analytical determinations were submitted to variance analysis, in a factorial scheme, employing the completely randomized statistical design, in order to determine the influence of antioxidant factors and periods of heating in relation to the oil alterations. From the obtained results, both α -tocopherol and rosemary extract demonstrated having a protecting effect on soybean oil against the oxidation originated by high temperature, but,

in all analytical determinations, α -tocopherol action was superior in relation to the one from rosemary extract. The mixture of the two antioxidants, added in purified soybean oil, promoted a higher protecting effect comparing to the one obtained by the application of each one separately. In natural soybean oil, rosemary extract also came to be efficient in delaying oxidation. It was also observed that, during the heating, both natural α -tocopherol and the one added were more stable in the presence of rosemary extract.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura dos triacilgliceróis	25
Figura 2 – Esquema geral do mecanismo da oxidação lipídica	37
Figura 3 – Mecanismo de ação para os antioxidantes primários	41
Figura 4 – Grupo fenólico do antioxidante em ressonância	44
Figura 5 – Vitamina E: α , β , γ e δ -tocotrienol e tocoferol.....	47
Figura 6 – Mecanismo de ação para os tocoferóis	48
Figura 7 – Estrutura dos principais compostos do extrato de alearim..	59
Figura 8 – Mecanismo de ação do ácido ascórbico e do tocoferol	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição em ácidos graxos do óleo de soja.....	28
Tabela 2 – Principais compostos originados durante o processo de fritura	33
Tabela 3 – Concentrações de antioxidantes adicionadas ao óleo purificado	73
Tabela 4 – Esquema da análise de variância para a estabilidade oxidativa do Ensaio I	85
Tabela 5 – Esquema da análise de variância para a estabilidade oxidativa, compostos polares totais, índice de peróxidos e dienos conjugados do Ensaio II	85
Tabela 6 – Esquema da análise de variância para a estabilidade oxidativa, compostos polares totais e dienos conjugados do Ensaio III	86
Tabela 7 – Esquema da análise de variância para o α -tocoferol	86
Tabela 8 – Características iniciais do óleo de soja refinado	87
Tabela 9 – Caracterização do óleo de soja antes e após purificação com alumina	89
Tabela 10 – Estabilidade oxidativa (horas) do óleo de soja purificado adicionado de diferentes concentrações de extrato de alecrim	92

Tabela 11 – Estabilidade oxidativa (horas) do óleo de soja purificado adicionado de diferentes concentrações de α -tocoferol	93
Tabela 12 – Fator de estabilização para os antioxidantes testados em óleo de soja purificado	95
Tabela 13 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados da estabilidade oxidativa (horas)	98
Tabela 14 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados de compostos polares totais (%)	102
Tabela 15 – Fator de Proteção (FP) dos antioxidantes testados em óleo de soja purificado com base na formação de compostos polares	105
Tabela 16 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados do índice de peróxidos (meq/kg)	107
Tabela 17 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados de dienos conjugados (%)	111

Tabela 18 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados da estabilidade oxidativa (horas)	114
Tabela 19 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados de compostos polares totais (%)	117
Tabela 20 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados de dienos conjugados (%)	120
Tabela 21 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados de teores de α -tocoferol (mg/kg)	122
Tabela 22 – Teor de α -tocoferol residual (%) do óleo de soja purificado e natural adicionado de antioxidantes	125
Tabela 23 – Resultados médios do teor de tocoferol em mg/kg e em percentual de retenção (%) do óleo de soja natural adicionado ou não de alearim	129

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	21
3 REVISÃO DE LITERATURA	22
3.1 Óleos e gorduras	22
3.1.1 Óleos vegetais – produção e dados estatísticos	23
3.1.2 Óleo de soja	24
3.1.3 Composição química	25
3.1.3.1 Ácidos graxos	25
3.1.3.2 Compostos minoritários	28
3.2 Fritura	29
3.2.1 O Processo de fritura	30
3.2.1.1 A fritura por imersão	31
3.2.1.2 Principais alterações em óleos de fritura	32
3.3 Termoxidação	38
3.4 Controle da oxidação lipídica – antioxidantes	39
3.4.1 Mecanismo de ação	40
3.4.2 Tipos de antioxidantes	42
3.5 Tocoferóis	46
3.5.1 A atividade vitamínica e antioxidante do tocoferol	47
3.5.2 Estabilidade em alta temperatura	53

3.6 Alecrim	57
3.6.1 Composição química.....	58
3.6.2 Ação antioxidante	62
3.6.3 Estabilidade em alta temperatura	66
3.7 Sinergismo entre antioxidantes naturais	67
4 MATERIAL E MÉTODOS	70
4.1 Material	70
4.1.1 Óleo	70
4.1.2 Antioxidantes	70
4.1.3 Reagentes e soluções	71
4.1.4 Adsorventes	71
4.1.5 Equipamentos	71
4.2 Procedimento experimental	72
4.2.1 Ensaio	72
4.2.2 Purificação do óleo com alumina	74
4.2.3 Adição de extrato de alecrim e α -tocoferol	75
4.2.4 Termoxidação	76
4.3 Métodos	77
4.3.1 Estabilidade oxidativa	78
4.3.2 Compostos polares totais	78
4.3.3 Índice de peróxidos	80
4.3.4 Dienos conjugados	81
4.3.5 Tocoferóis	82

4.4 Delineamento experimental	83
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
5.1 Caracterização inicial	87
5.2 Efeitos da purificação com alumina	89
5.3 Ensaio I – Determinação preliminar da atividade antioxidante	91
5.4 Ensaio II – Termoxidação do óleo purificado	96
5.4.1 Estabilidade oxidativa	97
5.4.2 Compostos polares totais	100
5.4.3 Índice de peróxidos	105
5.4.4 Dienos conjugados	110
5.5 Ensaio III – Termoxidação do óleo natural	113
5.5.1 Estabilidade oxidativa	114
5.5.2 Compostos polares totais	116
5.5.3 Dienos conjugados	119
5.6 Tocoferóis – retenção em condições de termoxidação	121
6 CONCLUSÕES	132
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	134
ANEXOS	153

1 INTRODUÇÃO

Óleos e gorduras são matérias-primas com larga faixa de aplicação, estando entre os principais componentes dos alimentos. São compostos que têm grande importância para a dieta humana, pois constituem a maior fonte de energia calórica para o organismo, além de apresentarem alguns elementos que desempenham funções importantes, como, por exemplo, as vitaminas lipossolúveis e os ácidos graxos essenciais. Atuam também como meio de transferência de calor em frituras e são responsáveis pela palatabilidade, sabor, cor e textura característicos dos alimentos submetidos a processo de cozimento como fritura e forneamento (SOUZA, 2001).

No Brasil, o óleo de soja responde por cerca de 95% do consumo de óleos vegetais, sendo utilizado nas cozinhas preferencialmente como base de frituras (MAGNONI, 2001).

Óleos e gorduras normalmente são acrescidos de antioxidantes para retardar as alterações indesejáveis durante o processo de fritura. Essas substâncias protegem o óleo da oxidação durante o tempo em que ele é submetido a altas temperaturas e eventualmente prolongam a vida de prateleira dos alimentos fritos (JASWIR; CHE-MAN; KITTS, 2000).

Os antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais. Há indícios de que os antioxidantes sintéticos de uso comercial como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ)

podem causar riscos à saúde. Essa preocupação, aliada à preferência do consumidor por produtos naturais, tem estimulado a busca por antioxidantes naturais como fonte alternativa.

Dentre os antioxidantes naturais de maior importância estão os tocoferóis e os extratos de especiarias.

Os tocoferóis estão presentes de forma natural na maioria dos óleos vegetais, em alguns tipos de pescado e atualmente são fabricados por síntese. Existem quatro tipos: α , β , γ , e δ tocoferol, sendo o α -tocoferol o mais abundante nos alimentos e o de maior atividade biológica como vitamina E (KAMAL-ELDIN; APPELQVIST, 1996), o que justifica a importância de sua presença na dieta.

Dentre as especiarias, o alecrim é uma das que apresenta maior poder antioxidante. Os compostos responsáveis por essa atividade são diterpenos fenólicos como ácido carnósico, carnosol, rosmanol, epirosmanol e isorosmanol.

A atividade antioxidante dos tocoferóis e dos diterpenos fenólicos deve-se principalmente a sua capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos, inibindo a oxidação. Dessa forma, os antioxidantes são lentamente consumidos e o período de indução do óleo corresponde ao tempo no qual o antioxidante foi completamente consumido (DZIEDZIC; ROBINSON; HUDSON, 1986). A presença de outros antioxidantes pode reduzir a perda de tocoferol.

A estabilidade dos tocoferóis a 180°C é relativamente boa em função do tipo de gordura, sendo maior em gorduras com maior índice de

iodo (YOSHIDA; TATSUMI; KAJIMOTO, 1991). Entretanto, as informações sobre a efetividade do extrato de alearim para retardar a deterioração do óleo durante a fritura são limitadas (CHE-MAN; JASWIR, 2000).

Tendo em vista o alto consumo de óleo de soja no Brasil, utilizado principalmente no preparo de alimentos em alta temperatura, o interesse em reduzir a perda nutricional com relação ao conteúdo de vitamina E e a tendência pelo uso de antioxidantes naturais, faz-se necessário um estudo do potencial antioxidante do α -tocoferol e do extrato de alearim e a influência do extrato de alearim na perda de α -tocoferol quando adicionados em óleo de soja submetido à termoxidação.

2 OBJETIVOS

Avaliar, em condições de termoxidação:

- o comportamento e a atividade antioxidante do α -tocoferol naturalmente presente em óleo de soja e adicionado em óleo de soja purificado;
- o comportamento e a atividade antioxidante do extrato de alecrim adicionado em óleo de soja natural e purificado;
- a influência do alecrim na resistência do α -tocoferol original ou adicionado em óleo de soja.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Óleos e gorduras

Os óleos e as gorduras constituem uma das três maiores classes dos constituintes dos alimentos, ao lado das proteínas e dos carboidratos (LAWSON, 1995). São substâncias que se caracterizam pela baixa solubilidade em água e alta solubilidade em solventes orgânicos (BELITZ; GROSCH, 1985).

O que diferencia um óleo de uma gordura é o estado físico à temperatura ambiente (20°C); os óleos apresentam-se na forma líquida e as gorduras na forma sólida nessa temperatura (MORETTO; FETT, 1998).

Óleos e gorduras têm importante função nutricional, pois constituem a principal fonte energética do organismo; aportam elementos indispensáveis como vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), ácidos graxos essenciais (linoléico e linolênico), esteróis precursores de hormônios, etc., necessários para o correto funcionamento do organismo e, ainda, são responsáveis pela palatabilidade e aroma dos alimentos (BELITZ; GROSCH, 1996).

Desempenham também importantes funções na fisiologia humana, dentre as quais destacam-se: (i) participação na constituição das membranas celulares e organelas subcelulares e na constituição de diversos tecidos, principalmente adiposo e nervoso; (ii) atuação como isolante térmico, promovendo a proteção dos órgãos e da pele e (iii) são

precursores na síntese de compostos como hormônios e lipoproteínas (TURATTI, 2002).

3.1.1 Óleos vegetais – produção e dados estatísticos

Os óleos e gorduras podem ser classificados, de acordo com sua origem, em animais e vegetais. Os óleos vegetais representam o grupo de maior volume e diversidade, podendo ser obtidos de várias matérias-primas, tais como: palma, algodão, milho, canola, soja, girassol, etc. (ORTHOEFER, 1996).

Há alguns anos, a demanda mundial de óleos vegetais está em constante progressão. Isso ocorre devido ao aumento da população mundial e do consumo *per capita* e também devido à redução do consumo mundial de gorduras de origem animal.

Em 10 anos, a produção mundial de óleos e gorduras vegetais aumentou mais de 50%. Em 2003, atingiu 105,51 milhões de toneladas, sendo que o óleo de soja representou 29,4% desse mercado (FAO, 2005).

O Brasil é o sexto produtor de óleos e gorduras vegetais, ficando atrás da Malásia, China, Indonésia, Estados Unidos e Índia. A produção brasileira de óleos vegetais em 2003 foi 5,54 milhões de toneladas, tendo destaque em volume o óleo de soja, que correspondeu a 90% do total (FAO, 2005).

Estima-se que nos próximos 25 anos ocorra um aumento de, aproximadamente, 60% da produção mundial de óleos vegetais, e o Brasil

é um candidato natural para abastecer essa demanda futura, seja para o óleo de soja, palma e/ou outros óleos vegetais (QUIJANO, 1999).

3.1.2 Óleo de soja

A soja (*Glycine max*) é um dos mais antigos produtos agrícolas que o homem conhece e começou a ser cultivada pelos chineses há cerca de cinco mil anos. Há três mil anos, a soja espalhou-se pela Ásia e, no início do século XX, passou a ser cultivada comercialmente nos Estados Unidos.

No Brasil, a soja chegou com os primeiros imigrantes japoneses em 1908, mas foi introduzida oficialmente no Rio Grande do Sul em 1914, embora a sua expansão no Brasil tenha acontecido somente nos anos 70 devido ao interesse crescente da indústria de óleo e à demanda do mercado internacional.

Os maiores produtores de soja na atualidade são: Estados Unidos (66%), Brasil (27%), Argentina (18%), China (9%) e Índia (4%) (FAO, 2005).

O óleo de soja é o principal óleo comestível consumido no Brasil, com um consumo de 2,96 milhões de toneladas em 2003/2004 (ABIOVE, 2005).

3.1.3 Composição química

Os óleos e gorduras são compostos formados principalmente por triacilgliceróis (98 a 99%), cuja estrutura pode ser vista na Figura 1. Os triacilgliceróis são formados pela esterificação completa do glicerol com três moléculas de ácidos graxos, que podem ser saturados ou insaturados, sendo estes mais reativos devido às duplas ligações.

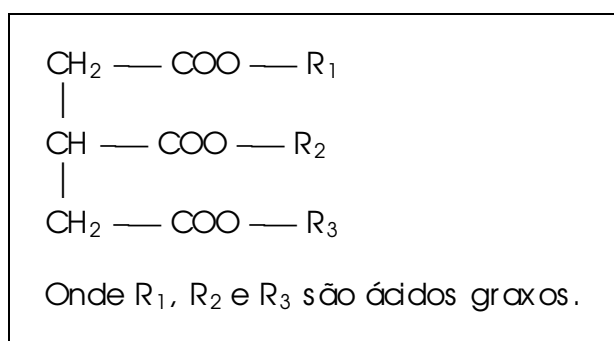


Figura 1 – Estrutura dos triacilgliceróis.

As demais substâncias presentes em óleos e gorduras, as quais representam 1 a 2%, são traços de mono e diacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios, cerídeos, constituintes insaponificáveis, dorofila e os produtos de alteração (FERRARI, 2001; MAHAN; ARLIM, 1995).

3.1.3.1 Ácidos graxos

Os ácidos graxos são formados por cadeias retas de carbono e hidrogênio com um grupo carboxila em um extremo e um grupo metil no

outro. Geralmente, apresentam um número par de carbonos, que varia de 4 a 26 átomos (SHILS et al., 2002).

Segundo Lawson (1995), os ácidos graxos podem ser classificados:

- pelo grau de saturação – dividem-se em saturados e insaturados (monoinsaturados e poliinsaturados);
- pelo comprimento da cadeia – podem ser de cadeia curta (4 a 6 carbonos), cadeia média (8 a 12 carbonos), cadeia longa (14 a 18 carbonos) e cadeia muito longa (20 ou mais carbonos).

Os ácidos graxos que ocorrem com maior frequência na natureza são conhecidos pelos seus nomes comuns, como nos casos dos ácidos butírico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico e esteárico, entre os saturados; oléico, linoléico, linolênico e erúcido, que pertencem ao grupo dos ácidos graxos insaturados (ZILLER, 1994). São representados, de modo geral, pelo número de átomos de carbono da molécula, seguido pelo número de duplas ligações da cadeia carbônica, estando entre parênteses a posição das duplas ligações, contando a partir do grupo carboxila. Outra forma de representar de modo resumido os ácidos graxos, em estudos bioquímicos e de nutrição, é citar a posição da primeira dupla ligação, contando a partir do grupo CH_3 terminal da molécula e assumindo que as demais duplas ligações estão em padrão metileno-interrompido e na conformação *cis*. Dessa forma, os ácidos graxos insaturados podem ser divididos em três famílias: n-9 ou ω -9 (oléico – 18:1, eicosatrienóico – 20:3, erúcido – 22:1, nervônico – 24:1), n-6 ou ω -6 (linoléico – 18:2,

gama-linolênico – 18:3, homo-gama-linolênico – 20:3, araquidônico – 20:4) e n-3 ou ω -3 (alfa-linolênico – 18:3, eicosapentaenóico – 20:5, docosahexaenóico – 22:6) (GUNSTONE, 1996).

Alguns ácidos graxos classificam-se como essenciais, pois não podem ser produzidos pelo homem em seu organismo por meio próprio do metabolismo. Por serem indispensáveis devido a sua importância para realização de algumas funções vitais do organismo, eles devem ser ingeridos por meio dos alimentos (FAO/OMS, 1997; TURATTI, 2000).

Os ácidos graxos essenciais para o ser humano são os ácidos linoléico (C18:2, ω -6) e o α -linolênico (C18:3, ω -3), em que a primeira dupla ligação está situada a seis e a três carbonos, respectivamente, do grupo metil inicial. Esses dois ácidos graxos são compostos que dão origem a outros ácidos graxos biologicamente ativos, como ácido araquidônico, ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) (FERRER, 2000).

O óleo de soja tem, em sua composição, cerca de 85% de ácidos graxos insaturados (Tabela 1); dentre os quais estão os essenciais linoléico e linolênico.

A reatividade dos ácidos oléico (C18:1), linoléico (C18:2) e linolênico (C18:3) é de 1:10:20, respectivamente (PADLEY; GUNSTONE; HARWOOD, 1994). Apesar de os óleos vegetais que possuem grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados estarem mais sujeitos à oxidação do que os óleos que possuem maior quantidade de ácidos graxos saturados (LOLOS; OREOPOULOU; TZIA, 1999), muitos dos restaurantes

de *fast food* estão evitando o uso de gorduras de origem animal ou óleos vegetais que contenham em sua composição uma maior porcentagem de ácidos graxos saturados. Isso se deve ao risco potencial à saúde, uma vez que os ácidos graxos saturados favorecem o aumento dos níveis de colesterol sanguíneo, sendo este um dos fatores de risco para doenças coronarianas (PAUL; MITTAL, 1997).

Tabela 1 – Composição em ácidos graxos do óleo de soja.

Composição em ácidos graxos	%
Ácido láurico, C12:0	0 – 0,1
Ácido mirístico, C14:0	< 0,5
Ácido palmítico, C16:0	7,0 – 12,0
Ácido palmitoléico, C16:1	< 0,5
Ácido esteárico, C18:0	2,0 – 5,5
Ácido oléico, C18:1	20,0 – 50,0
Ácido linoléico, C18:2	35,0 – 60,5
Ácido linolênico, C18:3	2,0 – 13,0
Ácido araquídico, C20:0	< 1,0
Ácido behênico, C22:0	< 0,5

Fonte: SIPOS; SZUHAJ, 1996.

3.1.3.2 Compostos minoritários

Dentre os compostos minoritários do óleo de soja, estão os tocoferóis; substâncias que despertam grande interesse devido a seu caráter vitamínico e a sua atividade antioxidante. De acordo com Rupérez et al. (2001), os óleos vegetais possuem quantidades diferentes de

vitamina E e os teores de tocoferóis de cada óleo também são muito desiguais. A concentração de tocoferóis no óleo comercial depende das condições de processamento para converter o óleo bruto em óleo refinado; o óleo de soja bruto contém de 1.300 a 1.600 mg/kg, enquanto no óleo desodorizado as concentrações variam de 600 a 1.000 mg/kg (STEEL, 2002).

Também é possível uma decomposição dos tocoferóis durante a estocagem; o efeito adicional da luz possui maior influência, com grande diminuição do conteúdo, quando comparado ao efeito do oxigênio (CERT; MOREDA; PÉREZ-CAMINO, 2000).

Apesar do nível significativo de antioxidantes naturais, o conteúdo de ácido linolênico (2,0 a 13,0%) do óleo de soja causa instabilidade, tornando-o bastante suscetível à oxidação (SONNTAG, 1979).

3.2 Fritura

A fritura é um dos métodos de cozimento mais antigos. Já no Velho Testamento, datado de aproximadamente 600 AC, há citações que poderiam se referir à fritura. Autores romanos também descrevem a fritura de ovos no primeiro século DC (MORTON, 1998).

Atualmente, a maior parte dos óleos e gorduras comestíveis é consumida após ter sido submetida a elevadas temperaturas, sendo as gorduras ou óleos de fritura importantes componentes da dieta (PÉREZ-

CAMINO et al., 1988). Duas causas fundamentais, entre outras, têm contribuído para isso:

- o óleo é o melhor meio de transferência de calor para o preparo rápido de alimentos, adequando-se a estilos de vida e sistemas de alimentação comunitários da atualidade; e, ao mesmo tempo, fornecendo ao produto frito características sensoriais desejáveis;
- a proliferação de indústrias de alimentos fritos ou pré-fritos, com o desenvolvimento de nova tecnologia de fritura em que grande quantidade de óleo é aquecida repetidamente por longos períodos.

Segundo Magnoni (2001), o óleo de soja é utilizado nas cozinhas preferencialmente como base de frituras.

3.2.1 O processo de fritura

No processo de fritura, o alimento é submergido em óleo quente que age como meio de transferência de calor. Essa forma de aquecimento é mais eficiente que o cozimento por ar quente em fornos e mais rápida que o cozimento em água, já que as temperaturas alcançadas pelo óleo, em processo de fritura, são superiores às alcançadas pela água em ebulição (LIMA; GONÇALVES, 1994).

Como resultado da fritura, são produzidas transformações nas propriedades físico-químicas e sensoriais do alimento. O produto alimentício pode sofrer várias transformações estruturais, texturais e

químicas, tornar-se saboroso, adquirir cor dourada, aspecto crocante e desenvolver aromas agradáveis (PAUL; MITTAL, 1997).

A qualidade do óleo ou gordura utilizada para fritura é de grande importância para a qualidade do produto final, pois o óleo de fritura absorvido pelo alimento será consumido como parte desse alimento. Reportam-se valores de 5 a 40% de absorção de óleo de fritura para diferentes tipos de alimentos fritos (ROSSEL, 1998).

3.2.1.1 A fritura por imersão

A fritura por imersão é um processo extraordinariamente complexo, em que se encontram envolvidos uma grande quantidade de fatores. Alguns desses fatores que intervêm são dependentes do próprio processo, como o tipo de equipamento utilizado, a temperatura, o tempo e o método de fritura. Outros, extrínsecos ao processo, relacionam-se com o tipo de gordura utilizada, sua composição, sua relação superfície/volume, suas características físico-químicas, presença de aditivos, contaminantes, etc., assim como a natureza do alimento, peso/volume, modo de preparo (empanados, pré-fritos, etc.) (POZO-DÍEZ, 1995).

A temperatura do meio de fritura varia conforme a adição do alimento e os processos de evaporação da água e absorção da gordura (CUESTA; SÁNCHEZ-MUNIZ, 1994). A temperatura recomendada para diferentes tipos de alimentos em diversos estudos varia de 160 a 200°C,

com um ótimo de temperatura específico dependendo do tipo de alimento, de seu tamanho, da taxa de reposição do óleo, do tamanho da fritadeira, entre outros aspectos (LOPES, 2002). Normalmente se utiliza a temperatura de 180°C para fritura em imersão.

De acordo com Monferrer e Villalta (1993b), temperaturas muito baixas produzem alimentos de cores mais claras, permitindo uma maior absorção de óleo. Cerca de 40% a mais de gordura é absorvida para o interior do alimento quando a temperatura é de 10°C a menos que a recomendada. Já temperaturas muito elevadas aceleram o processo de fritura; porém, produzem um alimento super cozido na superfície e mal cozido no seu interior, uma vez que aceleram a decomposição do óleo.

3.2.1.2 Principais alterações em óleos de fritura

Durante o processo de fritura, os óleos e gorduras estão expostos à ação de três agentes que contribuem para diminuir sua qualidade e modificar sua estrutura: a umidade proveniente dos alimentos, que é causa da alteração hidrolítica; a temperatura em que ocorre a operação, resultando em alteração térmica; e, finalmente, o oxigênio do ar, que entra na massa de óleo através da superfície do recipiente possibilitando a alteração oxidativa (FRITSCH, 1981).

O nível de alteração depende, sobretudo, das características do alimento, da temperatura utilizada e da absorção de ar e, como conseqüência, o aumento do tempo de aquecimento se traduz,

logicamente, em um incremento do nível de alteração (BRACCO; DIEFFENBACHER; KOLAROVIC, 1981).

A Tabela 2 destaca as vias de alteração e os principais compostos originados durante o processo de fritura.

Tabela 2 – Principais compostos originados durante o processo de fritura.

Tipo de alteração	Agente causador	Compostos resultantes
Hidrolítica	Umidade	Ácidos graxos livres Monoalçliceróis Dialçliceróis Glicerol
Térmica	Temperatura	Monômeros cídicos Dímeros e polímeros
Oxidativa	Ar	Monômeros oxidados Dímeros e polímeros Compostos voláteis (aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos, etc.)

Fonte: GUTIÉRREZ; DOBARGANES, 1988.

- *Alteração Hidrolítica*

Sob o ponto de vista quantitativo, a principal modificação na gordura é introduzida pela umidade do alimento, onde uma consequência é a hidrólise dos triadçliceróis (SOUZA, 2001).

A alteração hidrolítica é produzida quando o produto a ser frito tem alto conteúdo de água. O processo inicia-se durante o aquecimento ou resfriamento e durante o armazenamento, quando a temperatura é inferior a 100°C, pois, durante o processo de fritura, o óleo encontra-se a

180 - 190°C e, nessa temperatura, a umidade é eliminada na forma de vapor (MONFERRER; VILLALTA, 1993a).

A hidrólise envolve a quebra de ligações éster nos triacilgliceróis, com formação de ácidos graxos livres, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol. A primeira consequência da reação de hidrólise é o aumento da acidez do óleo ou gordura e a liberação de fumaça (MONFERRER; VILLALTA, 1993a).

Os triacilgliceróis que possuem ácidos graxos de cadeia curta são mais sensíveis à hidrólise do que os que possuem ácidos graxos de cadeia longa. A reação é catalisada pela presença de ácidos graxos livres, portanto, é melhor que se inicie o processo de fritura com óleo novo de baixo teor de ácidos graxos livres. Os produtos da hidrólise são bastante voláteis e também quimicamente mais reativos (BERGER, 1984; DOBARGANES; RIOS; PÉREZ-CAMINO, 1986; POKORNY, 1998). A desidratação da glicerina formada dá origem ao propenal aldeído ou acroleína (FÁBREGA; RIEIRA; BORONAT, 1985).

- *Alteração térmica*

Os principais compostos obtidos na alteração térmica são dímeros, em cuja união não participa o oxigênio e sua formação é explicada por meio de reações Diels-Alder, ou seja, reações entre uma dupla ligação e um dieno conjugado para formar um derivado ciclohexênico tetra substituído (NAWAR, 1985).

Uma vez formados os dímeros, a existência de duplas ligações em outros ácidos graxos das moléculas de triacilgliceróis pode resultar em

uma reação posterior produzindo trímeros, que podem, por sua vez, continuar a polimerização. Esses polímeros, por terem maiores tamanhos e pesos moleculares, tendem a aumentar a viscosidade do óleo, favorecendo a formação de espuma e, portanto, a oxidação e, ainda, induzem a maior absorção do óleo pelo produto. Os polímeros tendem a formar-se na superfície do óleo e a depositar-se nas laterais da fritadeira, formando uma película muito aderente de consistência plástica (MONFERRER; VILLALTA, 1993a). O tratamento térmico também conduz à formação de monômeros ácidos, compostos nutricionalmente indesejáveis, visto que podem ser absorvidos pelo organismo juntamente com os ácidos graxos e serem prontamente assimilados pelo sistema digestivo e linfático (ROJO; PERKINS, 1987). Segundo Sébédio; Septier; Grandgirard (1987), a formação dos monômeros ácidos é significativa somente em óleos com alto conteúdo de ácido linolênico. Os polímeros, compostos de elevado peso molecular, não são absorvidos pelo organismo, sendo de pouca importância nesse aspecto (MONFERRER; VILLALTA, 1993a).

- *Alteração oxidativa*

Durante o processo de fritura, quando a temperatura é muito elevada, o oxigênio atmosférico pode reagir com a camada superficial do óleo e desencadear as alterações oxidativas. A oxidação é um processo degradativo que ocorre quando o oxigênio atmosférico ou aquele que está dissolvido no óleo reage com ácidos graxos insaturados presentes. As reações químicas envolvidas nesse processo são muito complexas e

geram, em estágios mais avançados, produtos sensorialmente inaceitáveis (LIMA; GONÇALVES, 1995).

Farmer et al., citados por Shaidi e Wanasundara (1996), propuseram uma seqüência de reações inter-relacionadas para explicar o processo de autoxidação dos lipídios, como demonstrado na Figura 2. Tal seqüência ocorre em três etapas:

- Iniciação – Começa com a perda de um átomo de hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo insaturado (RH), formando radicais livres (R^\bullet) em condições favorecidas pela luz e calor (TOLEDO; ESTEVES; HARTMANN, 1985).
- Propagação – Os radicais livres, que são prontamente suscetíveis ao ataque do oxigênio atmosférico (O_2), são convertidos em radicais peróxidos (ROO^\bullet), que, ao receberem um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo insaturado (RH), formam hidroperóxidos (ROOH) e radicais livres (ROO^\bullet e R^\bullet) que, por sua vez, contribuem para a reação em cadeia. Em decorrência da estabilização por ressonância de espécies radicais, a seqüência de reação usualmente é acompanhada pela mudança da posição da dupla ligação, dando origem a isômeros de hidroperóxidos que freqüentemente contêm grupos dienos conjugados. Os hidroperóxidos formados são instáveis, podendo se decompor em compostos intermediários (peroxila, alcoila e hidroxila), responsáveis pela formação de aldeídos, álcoois, cetonas e ácidos (MELO; GUERRA, 2002; TOLEDO; ESTEVES; HARTMANN, 1985).

- Término – A redução da quantidade de ácido graxo presente no sistema provoca a formação de produtos estáveis (ROOR ou RR), resultantes da combinação de duas moléculas de radicais livres; estes são os produtos secundários da oxidação (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis) (MELO; GUERRA, 2002; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; TOLEDO; ESTEVES; HARTMANN, 1985).

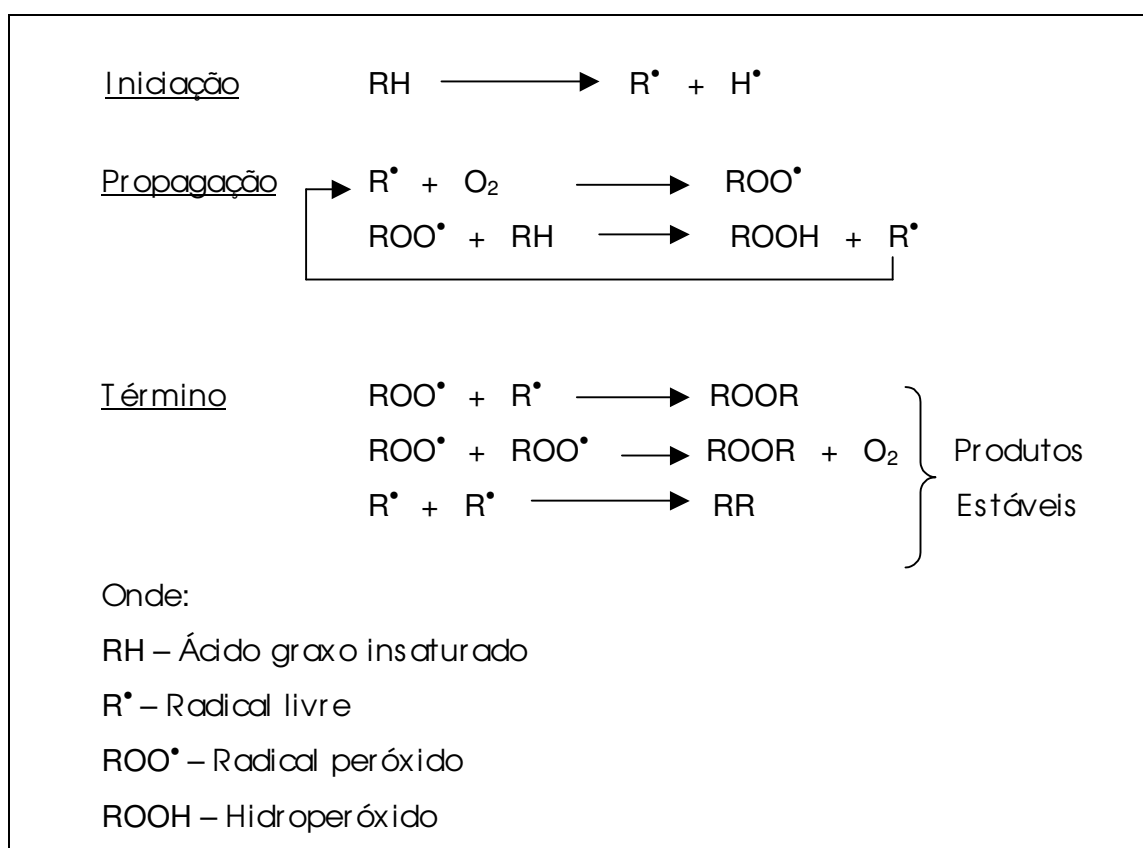


Figura 2 – Esquema geral do mecanismo da oxidação lipídica.

O tipo de aquecimento, contínuo ou descontínuo, é de grande importância; o aquecimento descontínuo provoca maior degradação na gordura. Uma das explicações atribui este efeito ao fato de que, à elevada temperatura, as reações oxidativas ocorrem fundamentalmente na

superfície de contato com o ar; enquanto durante o resfriamento, ao diminuir a velocidade das reações e aumentar a solubilidade do ar, é favorecida a entrada de ar na massa, produzindo maior quantidade de hidroperóxidos e radicais livres durante o posterior aquecimento (POZO-DÍEZ, 1995).

Os ácidos graxos insaturados são mais sensíveis à oxidação do que os saturados. Os óleos e gorduras que tenham sofrido processo de oxidação tendem a escurecer-se, aumentar a viscosidade, incrementar a formação de espumas e desenvolver sabor e aromas indesejáveis (MONFERRER; VILLALTA, 1993a).

3.3 Termoxidação

O processo de termoxidação visa submeter óleos e gorduras a altas temperaturas; é semelhante ao processo de fritura, porém, sem a presença do alimento, ou seja, sem a umidade e demais componentes que provêm do alimento. Sendo assim, a temperatura e o oxigênio proveniente do ar são as variáveis a serem consideradas.

No processo de termoxidação, é importante manter a relação superfície/volume, pois o incremento dessa relação tem um drástico efeito sobre a velocidade de alteração, uma vez que o aumento significa uma maior superfície específica de gordura em contato com o ar, afetando a velocidade das reações oxidativas (JORGE, 1997). De um modo geral, valores selecionados para a relação superfície/volume variam de 0,5 a 1,0

cm⁻¹, correspondendo àqueles usados nas frituras em fritadeiras domésticas e em frigideiras, respectivamente (DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUIZ; PÉREZ-CAMINO, 1993; POZO-DÍEZ, 1995).

3.4 Controle da oxidação lipídica – antioxidantes

Uma preocupação atual das indústrias é estabelecer um controle da alteração de óleos e gorduras durante seu uso, devido à relação com a qualidade e duração do produto frito. Assim, nas últimas décadas, alguns aditivos vêm adquirindo importância significativa devido a sua contribuição tanto na diminuição da deterioração de gorduras como no aumento da vida útil do produto no mercado. Dentro desse contexto, os antioxidantes têm lugar de destaque; sua efetividade como inibidor das reações autoxidativas durante armazenamento, processamento e utilização de gorduras é indiscutível e conduz para sua autorização como aditivos usados em quantidades limitadas (SOUZA, 2001).

A aplicação de antioxidantes, em termos técnicos, é um dos caminhos mais simples para reduzir a oxidação de gorduras (KARPINSKA; BOROWSKI; DANOWSKA, 2001). Além de retardarem a oxidação, essas substâncias protegem os carotenóides, as vitaminas A e D e outros compostos insaturados (ARAÚJO, 1995).

O baixo custo de obtenção, facilidade de emprego, eficácia, termo-resistência, neutralidade organoléptica e ausência reconhecida de toxicidade são premissas para a seleção e a utilização de um antioxidante

em nível industrial (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). Embora em sua grande maioria os antioxidantes apresentem pouca estabilidade frente à exposição a altas temperaturas, nas indústrias de óleos para fritura é importante a utilização de antioxidantes que sejam estáveis em temperaturas elevadas com a finalidade de manter as melhores condições possíveis durante o processo de fritura. Dessa forma, podem-se obter produtos fritos de melhor qualidade organoléptica e, ao mesmo tempo, de maior estabilidade, além de permitir um prolongamento da vida útil dos óleos (MONFERRER; VILLALTA, 1993a; MUKAI et al., 1993).

A rápida perda de antioxidantes presentes nos óleos durante o processo de fritura estimula o início da fase de oxidação (SANIBAL; MANCINI-FILHO, 2002). As mudanças durante a fritura mostram, claramente, que a suscetibilidade à oxidação nesse processo é mais dependente dos antioxidantes remanescentes do que do nível de insaturação (MÁRQUEZ-RUIZ et al., 1999). Assim, para evitar uma iniciação rápida e uma propagação da oxidação durante a fritura, é necessária a manutenção dos níveis de antioxidante do óleo.

3.4.1 Mecanismo de ação

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, numa concentração consideravelmente menor que a do substrato oxidável, retardam ou inibem significativamente a oxidação do substrato, diminuindo a velocidade de reação ou prolongando o seu período de

indução. Essa inibição ou diminuição da velocidade da reação ocorre por ação nas diferentes etapas do processo de oxidação, atuando sobre diversos substratos, desde uma molécula simples a polímeros e biosistemas complexos (CINTRA, 1999).

Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que atuam diretamente sobre radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação oxidativa, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, inativando-as (SIMIC; JAVANOVIC, 1994). O mecanismo de ação para os antioxidantes primários está representado na Figura 3 (MADHAVI; SALUNKHE, 1995).

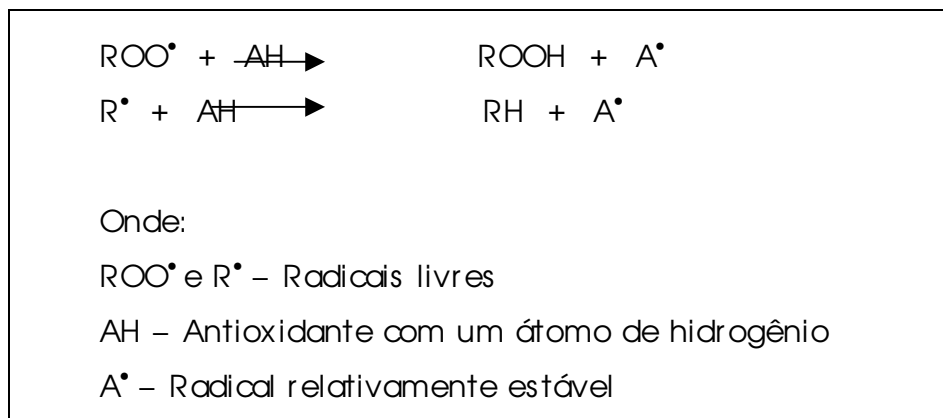


Figura 3 – Mecanismo de ação para os antioxidantes primários.

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é seqüestrado pelos radicais livres R[•] e ROO[•] com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Assim, formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical relativamente estável (A[•]) procedente do antioxidante.

Os principais antioxidantes primários são: butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ), propil galato (PG) e tocoferóis (DUBINSKY, 2000); os compostos do extrato de alecrim também atuam dessa forma (RIZNER-HRAS et al., 2000).

Os antioxidantes secundários contribuem para retardar a reação de autooxidação por mecanismos diferentes ao dos antioxidantes primários. Nesta categoria encontram-se:

- Agentes quelantes – complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Um par de elétrons não compartilhado na sua estrutura molecular promove ação de complexação. Os mais comuns são: ácido cítrico e seus sais, fosfatos e sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) (PRATT, 1996).
- Removedores de oxigênio – atuam capturando o oxigênio presente no meio através de reações químicas estáveis, tornando-o, conseqüentemente, indisponível para atuar como propagador da autooxidação. Ácido ascórbico e ascorbil palmitato são os melhores exemplos desse grupo (PRATT, 1996).
- Compostos que regeneram os antioxidantes primários, como o ácido ascórbico, que regenera o α -tocoferol (DUBINSKY, 2000).

3.4.2 Tipos de antioxidantes

Os antioxidantes podem ser naturais ou sintéticos:

- *Antioxidantes sintéticos*

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são os compostos fenólicos BHA, BHT, TBHQ e PG.

O BHA é uma mistura de isômeros (2-BHA e 3-BHA) na proporção 9:1; é mais efetivo na inibição da oxidação em gorduras animais que em óleos vegetais e apresenta pouca estabilidade frente a elevadas temperaturas.

O BHT é um antioxidante monofenólico e tem propriedades similares ao BHA. Ambos os antioxidantes têm boa solubilidade em gorduras animais e óleos vegetais, mas podem conferir odor a alimentos quando usados em altas temperaturas por longo período (PRATT, 1996).

O TBHQ é um antioxidante difenólico, tem boa estabilidade térmica e é considerado, em geral, mais eficaz em óleos vegetais que o BHA ou o BHT. Ácido cítrico e TBHQ apresentam excelente sinergismo em óleos vegetais (PRATT, 1996).

O PG é um antioxidante trifenólico, eficiente em gorduras animais e em óleos vegetais, mas tem baixa estabilidade térmica (PRATT, 1996).

Esses antioxidantes sintéticos reagem com os radicais livres formados, inativando-os. O radical fenólico procedente do antioxidante é estabilizado por ressonância (Figura 4), não tendo, dessa forma, a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas.

Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de esses antioxidantes apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais (BOTTERWECK et al., 2000). Por esse motivo, o uso de

antioxidantes sintéticos é restringido em vários países, visto que existe a possibilidade de terem efeitos indesejáveis para a saúde humana (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000; CUVELIER; BERSSET; RICHARD, 1994).

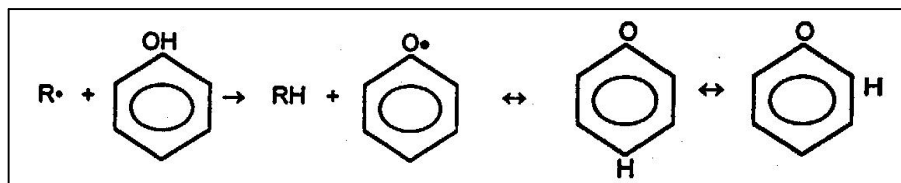


Figura 4 – Grupo fenólico do antioxidante em ressonância.

O TBHQ não é permitido no Canadá e na Comunidade Econômica Européia (REISCHE; LILLIARD; EITENMILLER, 1997). No Brasil, o uso desses antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde que limita a 200 mg/kg para BHA e TBHQ e 100 mg/kg para BHT como concentrações máximas permitidas (BRASIL, 2001).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, há um grande interesse na obtenção e utilização de antioxidantes provenientes de fontes naturais porque são presumidamente seguros, visto que ocorrem em plantas. Nesse sentido, muitas pesquisas têm sido dirigidas com a finalidade de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos (SOARES, 2002).

Vale ressaltar, porém, que substâncias naturais com propriedades antioxidantes também precisam ser submetidas a testes toxicológicos. Muitas vezes tem sido recomendada cautela com relação à suposição de segurança de um antioxidante natural, pois o fato de um antioxidante ser proveniente de fonte natural, integrando a constituição química de muitos vegetais tradicionalmente consumidos, não garante a sua inocuidade (MELO; GUERRA, 2002; MOURE et al., 2001).

- *Antioxidantes naturais*

Os antioxidantes naturais podem ser encontrados e isolados de uma variedade de plantas. Entre as fontes de antioxidantes naturais estão incluídos grãos e sementes de oleaginosas (NAGEM; ALBUQUERQUE; MIRANDA, 1992), de cereais (NAMIKI, 1990; TIAN; WHITE, 1994), sementes de frutas cítricas (PEREIRA, 1996), castanha e nozes (MELO, 1989), frutas (DAWES; KEENE, 1999; PRIOR et al., 1998), legumes (GANTHAVORN; HUGHES, 1997) e especiarias (CHIPAULT et al., 1952; MADSEN; BERTELSEN, 1995; MELO et al., 2003).

As substâncias presentes nessas fontes naturais que são capazes de agir como antioxidantes são, principalmente, vitaminas e compostos fenólicos. Dentre os mais importantes sob o ponto de vista tecnológico, podem-se citar os tocoferóis, os carotenóides, alguns ácidos orgânicos, como os ácidos cítrico e ascórbico, os ácidos fenólicos, incluindo ácido caféico, protocatequínico, ferrúlico e p-cumárico. Os extratos de ervas e especiarias são importantes fontes de ácido rosmarínico, carnosol e ácido carnósico (DUGAN, 1980).

Esses compostos podem agir como redutores, interruptores de radicais livres, inibidores ou supressores de oxigênio singlete e como inativadores de metais pró-oxidantes.

3.5 Tocoferóis

Os compostos que compreendem o grupo da vitamina E dividem-se em duas classes distintas, ambas derivadas de um anel cromanol. A primeira série, os tocoferóis, contêm uma cadeia lateral isoprenóide saturada de 16 carbonos (cadeia de fitilo); a segunda série, os tocotrienóis, corresponde a estruturas similares que contêm uma cadeia lateral com tripla insaturação nos carbonos das posições 4, 8 e 12. Dentro de cada série, os compostos somente diferem no número e na posição de grupos metil na estrutura anelar.

Os tocoferóis, conforme localização do grupo metila no anel, são designados alfa (5,7,8-trimetiltocol), beta (5,8-dimetiltocol), gama (7,8-dimetiltocol) e delta (8-metiltocol), como demonstrado na Figura 5 (CARO, 2002).

O termo vitamina E refere-se aos tocoferóis e tocotrienóis coletivamente (FERRARI, 2001).

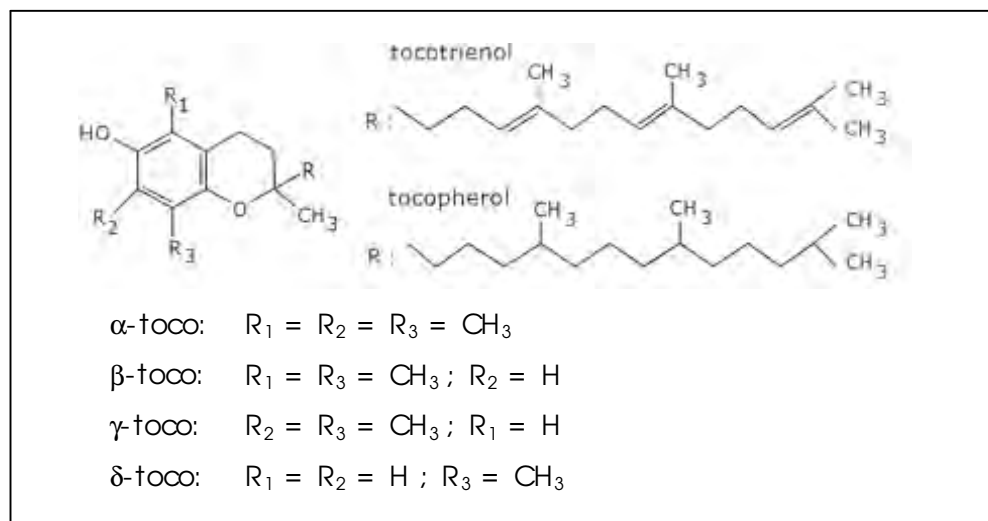


Figura 5 – Vitamina E: α , β , γ e δ -tocotrienol e tocoferol.

Fonte: COATANEA; DARCHEN; HAUCHARD, 2001.

3.5.1 A atividade vitamínica e antioxidante do tocoferol

O α -tocoferol é o homólogo mais largamente distribuído na natureza e é o mais biologicamente ativo de todos os compostos com atividade vitamínica E (KAMAL-ELDIN; APPELQVIST, 1996).

Ao que tudo indica, a principal função do α -tocoferol no organismo é interromper as reações em cadeia (com radicais livres) que ocorrem quando a porção lipídica das células (membranas) entra em peroxidação. A recomendação de consumo de 15 mg/dia para homens e mulheres é baseada em estudos de deficiência induzida em humanos e ensaios de hemólise *in vitro* causada pelo peróxido de hidrogênio (AMAYA-FARFAN; DOMENE; PADOVANI, 2001).

As principais fontes de tocoferóis são os óleos vegetais de milho, algodão, girassol, soja, oliva e amendoim (VALENZUELA; SANHUEZA; NIETO, 2003).

Quando esses óleos são utilizados para fritura, a vitamina E é perdida com a oxidação dos ácidos graxos insaturados durante o aquecimento (CARLSON; TABACCHI, 1986). Esse óleo de fritura é absorvido pelo alimento durante o cozimento (WEISS, 1983). Assim, a qualidade do óleo utilizado afeta a ingestão de tocoferol.

Os tocoferóis são importantes não somente pela sua ação vitamínica "E" *in vivo*, mas também pela sua ação antioxidante, descrita pela primeira vez por Olcott e Emerson (1937). O mecanismo de ação para os tocoferóis está representado na Figura 6 (LAMPI et al., 1999).

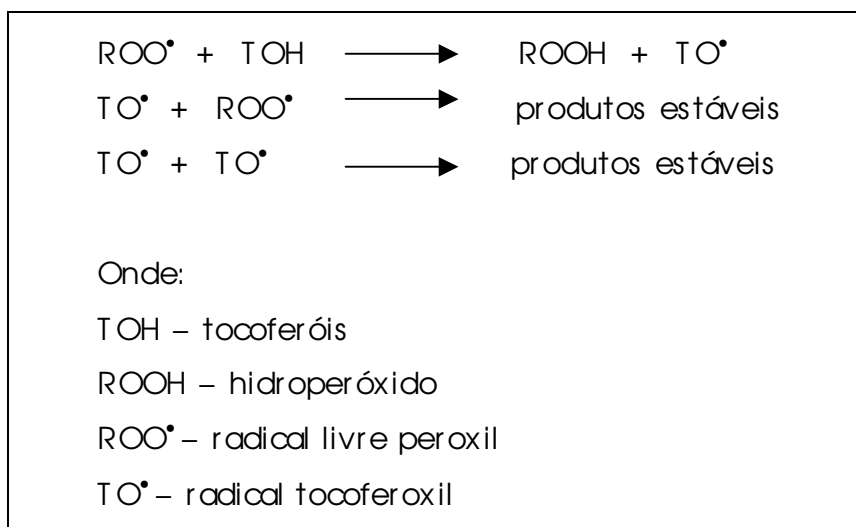


Figura 6 – Mecanismo de ação para os tocoferóis.

A atividade antioxidante dos tocoferóis (TOH) deve-se principalmente a sua capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos

radicais livres lipídicos (ROO^\bullet) de uma molécula lipídica insaturada, formando um hidroperóxido (ROOH) e um radical tocoferoxil (TO^\bullet). O radical tocoferoxil tem uma menor capacidade de propagar a peroxidação lipídica se comparado com o radical peroxil. Ao invés disso, o radical tocoferoxil reage com outro peroxil ou radical tocoferoxil, formando produtos mais estáveis.

Concentrados de tocoferóis são preparados comercialmente por destilação molecular de óleos vegetais ou a partir dos destilados de desodorização destes óleos, particularmente do óleo de soja. Mesmo contendo um grupo hidroxílico fenólico, a perda de tocoferóis no processamento comercial de óleos comestíveis não é grande. Perdas máximas de aproximadamente 6% do nível de tocoferóis totais têm sido reportadas no refino alcalino contínuo e branqueamento; na desodorização, a perda depende da temperatura e do vácuo utilizados, e pode ser suficiente para requerer a reincorporação do concentrado de tocoferóis no produto para obter as propriedades da estabilidade desejada (SONNTAG, 1979).

A concentração relativa dos homólogos de tocoferol no óleo de soja bruto ou desodorizado é: α (4 a 10%), β (1 a 3%), γ (60 a 66%) e δ (24 a 29%) (JUNG; YOON; MIN, 1989). Um óleo de soja refinado, analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), apresentou as seguintes distribuições (em mg/kg de óleo): α -tocoferol, 50; β e γ -tocoferol, 710; δ -tocoferol, 270 (EVANS; KODALI; ADDIS, 2002).

Muitas pesquisas têm sido realizadas nos últimos 40 anos para avaliar o efeito de tocoferóis durante a autooxidação de óleos (WARNER; NEFF; ELLER, 2003), utilizando diferentes substratos, temperaturas e concentrações e tem sido notado que a atividade dos tocoferóis *in vitro* não depende somente de sua capacidade de seqüestrar radicais livres, mas também de muitas outras possíveis reações paralelas que são drasticamente afetadas por suas concentrações (JUNG; MIN, 1990), pela temperatura e luz, pelo tipo de substrato e por outras espécies químicas atuando como pró-oxidante e sinergista no sistema (KOCHHAR, 2000; ROMERO et al., 2004).

A atividade relativa dos tocoferóis também tem recebido muita atenção na literatura. No geral, enquanto a potência biológica como vitamina E decresce conforme a seqüência α , β , γ , δ (YOSHIDA; TATSUMI; KAJIMOTO, 1991), a atividade como antioxidante aumenta (JORGE; GONÇALVES, 1998).

Entretanto, Lea e Ward citados por Warner; Neff; Eller (2003), sugeriram que a atividade antioxidante relativa dos tocoferóis depende de vários parâmetros, incluindo temperatura, composição da gordura, forma da gordura (líquida, emulsão) e concentração de tocoferóis.

Com relação à temperatura, estudos revelaram que esse fator pode ter um efeito significativo no resultado da oxidação usando esses compostos. Segundo Madhavi; Singhal; Kulkarni (1996), a ordem da atividade antioxidante *in vitro* tem sido reportada como $\delta > \gamma > \beta > \alpha$ em temperaturas entre 50 e 100°C, mas essa ordem em baixas temperaturas

(20 a 40°C) segundo Gottstein e Grosch (1990) é alterada para $\alpha > \gamma > \beta > \delta$. Por outro lado, a atividade antioxidante relativa dos tocoferóis em diferentes gorduras armazenadas a 37°C foi $\gamma = \delta > \alpha$ (WARNER; NEFF; ELLER, 2003), o que mostrou o efeito do tipo de substrato.

Sobre a concentração mais indicada, a atividade antioxidante de várias combinações de tocoferóis ainda tem sido alvo de investigações (NORMAND; ESKIN; PRZYBYLSKI, 2001).

Segundo Sterwin (1978), a concentração de tocoferol total para otimizar a estabilidade oxidativa de óleo de soja foi entre 500 e 1.000 mg/kg; por outro lado, para Frankel (1996), a melhor dosagem foi entre 400 e 600 mg/kg. Mais recentemente, Evans; Kodali; Addis (2002), definiram o intervalo de 340 a 660 mg/kg para a concentração ótima da mistura de tocoferóis para óleo de soja.

Sobre a concentração adequada de cada um dos homólogos, Jung e Min (1990) definiram concentrações ótimas de 100 mg/kg de α , 250 mg/kg de γ e 500 mg/kg de δ tocoferóis para aumentar a estabilidade oxidativa de óleo de soja purificado, armazenado no escuro a 55°C. Os tocoferóis apresentaram significantes efeitos pró-oxidantes em concentrações acima desses níveis. A oxidação foi acompanhada pela determinação de peróxidos. Segundo esses mesmos pesquisadores, a concentração ótima de tocoferol pode ser afetada pela qualidade e quantidade de fosfolípidios e outros compostos minoritários.

Para Evans; Kodali; Addis (2002), a concentração ótima de tocoferol para inibir a oxidação do óleo de soja também foi 100 mg/kg

para α , mas para γ foi maior, 300 mg/kg. Para o δ -tocoferol, não foi observada uma concentração ótima; a oxidação do óleo diminuiu regularmente com o aumento da dosagem de 473 para 1.890 mg/kg. Nesse caso, a oxidação foi acelerada pela manutenção do óleo no escuro a 40, 50 e 60°C e a oxidação foi acompanhada pela formação de dienos conjugados, sendo que o comportamento pró-oxidante foi mais pronunciado com o aumento da temperatura. Nesse mesmo estudo, a comparação da atividade antioxidante dos homólogos em suas concentrações ótimas revelou que α tocoferol (~ 100 mg/kg) foi de 3 a 5 vezes mais potente que γ tocoferol (~ 300 mg/kg) e 16 a 32 vezes mais potente que δ tocoferol (~ 1.900 mg/kg).

Em pesquisa realizada por Huang; Frankel; German (1994) com óleo de milho, α -tocoferol também mostrou atividade pró-oxidante em concentrações acima de 250 mg/kg, mas, em contraste, a capacidade do α -tocoferol em inibir a formação do hexanal, um produto da decomposição do hidroperóxido linoleato, que é formado pela oxidação de ácidos graxos como o ácido linoléico, aumentou com o aumento da concentração do antioxidante.

Frankel (1996) também concorda que o α -tocoferol pode atuar como antioxidante ou pró-oxidante, mas afirma que a atividade do α -tocoferol e dos antioxidantes em geral depende não só da concentração, como também do sistema testado, do tempo de oxidação e do método usado para acompanhar a oxidação. Para esse pesquisador, em altas concentrações, o α -tocoferol promove a formação dos hidroperóxidos, mas

inibe a decomposição deles. Em óleo de canola purificado, mantido a 40°C no escuro por 16 dias, o α -tocoferol, adicionado em concentrações que variaram de 5 a 500 mg/kg, também não demonstrou efeito pró-oxidante por meio da análise de anisidina, que mede o teor de compostos secundários (LAMPI et al., 1999). O efeito do antioxidante em inibir a decomposição dos hidroperóxidos pode, dessa forma, ser crítico na preservação da qualidade do alimento pela redução da rancidez devido à formação de aldeídos.

No Brasil, o Ministério da Saúde permite a adição de, no máximo, 0,03% (300 mg/kg) de tocoferóis em óleos e gorduras, como aditivos intencionais, com função antioxidante (BRASIL, 2001).

3.5.2 Estabilidade em alta temperatura

Pokorny et al. (1973) estudaram as alterações do teor de tocoferóis durante aquecimento e estocagem de óleos vegetais. Após longo período de armazenagem, à temperatura ambiente, somente traços de tocoferóis foram detectados e observou-se uma porcentagem elevada de dímeros e polímeros. Segundo esses autores, durante a fritura, o teor de tocoferóis manteve-se relativamente instável, em 150 minutos de fritura a 150 - 210°C, a concentração desses compostos em óleo de soja foi reduzida em 50% (de 120 para 60 mg/kg).

Pesquisas têm revelado que, em alta temperatura, a perda de tocoferóis torna-se geralmente mais rápida, com a diminuição do grau de insaturação do óleo.

Yoshida; Tatsumi; Kajimoto (1991), definem a estabilidade dos tocoferóis a 180°C como relativamente boa em função do tipo de gordura e concordam que a estabilidade térmica dos tocoferóis é menor em gorduras com menor índice de iodo. Resultados semelhantes foram encontrados por Yoshida; Hirooka; Kajimoto (1990) ao observarem que a quantidade de tocoferóis diminuiu substancialmente nos óleos de oliva e palma, enquanto em óleos de soja e milho, 90% do teor de tocoferol original foi mantido após aquecimento. De qualquer modo, o óleo de soja é mais suscetível à oxidação que a oleína de palma, devido a seu grau de insaturação ser mais alto (LALAS; DOURTOGLOU, 2003).

Resultados de pesquisa envolvendo trioleína, trilinoleína e mistura de ambas, aquecidas a 180°C por 10 horas, na ausência de tocoferóis e na presença de α , δ ou mistura de α , β , γ e δ tocoferóis, também demonstraram que o efeito de antipolimerização dos tocoferóis em alta temperatura dependeu do grau de insaturação do substrato, sendo mais afetada a trioleína, por ser o substrato menos insaturado. O máximo efeito para os três substratos foi encontrado quando a mistura de tocoferóis foi adicionada (BARRERA-ARELLANO et al., 1999).

A velocidade relativa de decomposição dos tocoferóis em aquecimento também tem sido alvo de muitas pesquisas. Segundo Jorge e Gonçalves (1998), a seqüência de decomposição desses compostos, em

aquecimento de óleo de soja e girassol simulando fritura (180°C por 12 horas), foi $\alpha > \beta > \gamma > \delta$. Gordon e Kourimská (1995) também concordam que α -tocoferol é perdido mais rapidamente que β , γ ou δ -tocoferol, com redução de 50% de α -tocoferol após 4-5 operações de fritura em comparação com valores de cerca de 7-8 operações de fritura para β e γ -tocoferol, respectivamente, sem adição de outros antioxidantes.

Barrera-Arellano et al. (2002), em pesquisa envolvendo óleos vegetais com diferentes graus de insaturação, aquecidos a 180°C por até 10 horas, na presença ou ausência de seus antioxidantes naturais e também com adição de α , δ ou a mistura α , β , γ , δ tocoferóis, obtiveram resultados que mostraram a perda rápida dos antioxidantes na ordem esperada, com α -tocoferol sendo o menos estável. O efeito protetor do α -tocoferol foi mais pronunciado nos óleos menos insaturados. O nível de degradação dos compostos após 10 horas de aquecimento não dependeu do conteúdo de antioxidantes que permaneceu nos óleos.

Steel (2002), avaliando a ação antioxidante dos tocoferóis em gorduras vegetais parcialmente hidrogenadas de soja e algodão com variação no índice de iodo, verificou uma destruição mais rápida de α e γ que de β e δ tocoferóis durante a termoxidação a 180°C por 10 horas. A destruição dos tocoferóis originais, naturalmente presentes nos óleos e gorduras, foi maior nas gorduras mais saturadas, enquanto que a dos tocoferóis adicionados, em geral, foi maior nas gorduras mais insaturadas.

Em estudos de termoxidação de óleo de girassol e girassol com alto teor de ácido oléico, em ausência de alimentos, conduzidos por Jorge et al. (1996), pode-se observar que o α -tocoferol foi perdido no óleo de girassol com alto teor de ácido oléico com porcentagem de compostos polares menores que 15% ; enquanto no caso do óleo de girassol, a perda foi na ordem de 25% . Segundo Jorge e Gonçalves (1998), o que pode ter ocorrido é que, à elevada temperatura, o α -tocoferol não só atuou como antioxidante, mas também como um substrato competitivo sensível à alteração por si mesmo, ou seja, o α -tocoferol pareceu ter-se alterado mais rapidamente do que o óleo menos insaturado, por isso sua perda foi mais acentuada para uma menor quantidade de compostos polares totais. Por outro lado, foi perdido mais lentamente do que o óleo mais insaturado, tornando-se mais resistente no óleo mais insaturado. Verificou-se também perda da estabilidade de todas as amostras de óleos cujos valores de α -tocoferol encontravam-se em níveis de traços.

Souza (2001) estudou a degradação de gorduras animais (sebo, índice de iodo = 30, e banha, índice de iodo = 60), sem e com a adição de 300 mg/kg de α -tocoferol ou 300 mg/kg de δ -tocoferol ou 300 mg/kg de uma mistura 1:1 de α -tocoferol + δ -tocoferol, comparando-as à oleína de palma, quando submetidas a termoxidação (180°C). Após 10 horas de tratamento, encontraram-se níveis de apenas 5 a 6% de dímeros e polímeros para as amostras de sebo, banha ou oleína isenta dos tocoferóis naturais. A adição de tocoferóis, principalmente de δ -tocoferol, retardou ainda mais a formação de compostos poliméricos, especialmente

no sebo, a gordura mais saturada. Na oleína de palma, os tocoferóis naturais mostraram-se mais eficazes que os adicionados para retardar a formação de dímeros e de polímeros; a amostra original que continha 382,9 mg/kg de tocoferóis totais apresentou os níveis de dímeros e polímeros após 10 horas de termoxidação em 1,8%; com a adição de tocoferóis à amostra de oleína tratada, o melhor resultado obtido para o nível de dímeros e polímeros após 10 horas de termoxidação foi de 3,6% com adição de 300 mg/kg de δ -tocoferol. Quanto à degradação dos tocoferóis adicionados, também nesse caso, foi mais rápida na gordura mais saturada (sebo) e o α -tocoferol também se decompôs mais rapidamente que o δ -tocoferol, independentemente do substrato (sebo, banha ou oleína de palma).

3.6 Alecrim

Desde os primórdios da História, as especiarias têm sido utilizadas para melhorar ou ressaltar as características organolépticas dos alimentos, bem como preservá-los (MELO et al., 2003). Os efeitos preservativos sugeriram a presença de constituintes antimicrobianos e antioxidantes (DUGAN, 1980; NAKATANI, 1996; SIX, 1994).

Os experimentos envolvendo a característica das especiarias em inibir a oxidação se iniciaram nos anos 50. Nessa época, pesquisadores constataram o aumento da estabilidade de óleos adicionados de uma variedade de especiarias e condimentos (CHIPAULT;

MIZUNO; LUNDBERG, 1955; CHIPAULT et al., 1952; SEHTI; AGGAPWAL, 1950).

Dentre as especiarias avaliadas nessas primeiras pesquisas estava o alecrim. Chipault et al. (1952) estudaram o efeito antioxidante de 32 especiarias adicionadas em banha como extratos de éter de petróleo e etanol, em concentrações de 0,2%; alecrim e sálvia apresentaram, particularmente, efeito mais pronunciado.

3.6.1 Composição química

Os compostos responsáveis pela atividade antioxidante do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) são principalmente diterpenos fenólicos, como carnosol, ácido carnósico, rosmanol, epirosmanol, isorosmanol, (CUVELIER; BERSET; RICHARD, 1994; SCHWARZ; TERNES, 1992a) e outros ácidos fenólicos, como o ácido rosmarínico (FRANKEL et al., 1996a). A estrutura química desses compostos pode ser observada na Figura 7.

Por meio da análise de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi observado que o ácido carnósico e o carnosol são os principais diterpenos fenólicos do alecrim; as análises revelaram que o carnosol e o ácido carnósico estão presentes na proporção de 1:10, outros diterpenos são encontrados em menores concentrações (SCHWARZ; TERNEZ, 1992a).

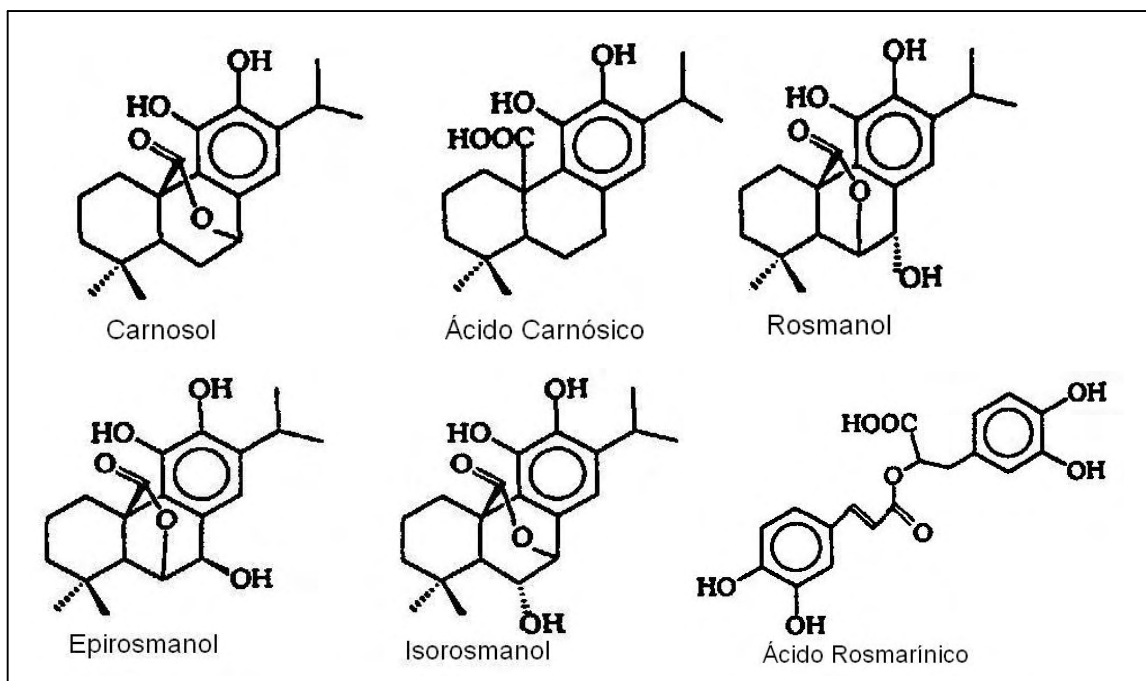


Figura 7 – Estrutura dos principais compostos do extrato de alecrim.

Fonte: MADSEN; BERTELSEN, 1995.

Muitos extratos de alecrim para uso em sistemas alimentícios estão hoje disponíveis no mercado, principalmente na Europa e Estados Unidos, onde, segundo consta, o alecrim representa cerca de 40 a 50% dos antioxidantes naturais comercializados (VALENZUELA; SANHUEZA; NIETO, 2003). No Brasil, o alecrim é classificado como aroma natural, não existindo limite para a dosagem, sendo aplicado principalmente em produtos cárneos, pratos prontos e biscoitos.

A concentração dos diterpenos fenólicos determinados por CLAE em extratos de alecrim comercialmente disponíveis variou de 2,8 a 22,5%, sendo que a atividade antioxidante dos extratos dependeu diretamente da concentração desses compostos (BAUMAN et al., 1999). Sob o aspecto comercial, o valor do extrato de alecrim está correlacionado

com o conteúdo, principalmente, de ácido carnósico e, em segundo plano, com o conteúdo total de diterpenos fenólicos, incluindo carnosol (THORSEN; HILDEBRANDT, 2003).

Segundo os pesquisadores, as diferenças observadas na composição dos extratos comerciais derivam das condições de extração aplicadas, nas quais o ácido carnósico, principal diterpeno fenólico do alecrim fresco, pode ser degradado em diferente extensão, sendo convertido em carnosol ou outros diterpenos (SCHWARZ; TERNES, 1992b). Na extração por CO₂, o ácido carnósico é o principal diterpeno do extrato, enquanto a extração com uso de solventes orgânicos resulta em uma considerável redução no conteúdo de ácido carnósico, favorecendo a permanência, geralmente, de carnosol como diterpeno mais abundante depois do ácido carnósico (SCHWARZ; TERNES; SCHMAUDERER, 1992).

Nesse sentido, muitas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de encontrar o solvente orgânico mais indicado para a extração. Chang et al. (1977) estudaram a propriedade antioxidante dos extratos de alecrim e sálvia em uma ampla variedade de solventes (hexano, benzeno, éter etílico, clorofórmio, dioxano e metanol) aplicados em banha armazenada a 60°C, no escuro. A oxidação foi acompanhada pela determinação de peróxidos; o extrato de alecrim em éter etílico e em metanol mostrou melhores resultados. Wu et al. (1982) confirmaram a eficiência como antioxidante do extrato metanólico de alecrim (0,02%) em banha armazenada no escuro por 6, 14, 21, 28 e 36 dias por meio da

determinação de peróxidos. A eficiência do extrato de alecrim foi comparável à do BHT e superior à do BHA na mesma concentração.

Chen; Shi; Ho (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). Os extratos e os componentes purificados (carnosol, ácidos carnósico e ursólico) foram testados na dosagem de 0,02% em banha pelo método do Randimat. Também nessa pesquisa, o período de indução para o extrato de metanol foi maior do que o do BHA, porém, menor que o do BHT, embora os extratos de hexano e de acetona tenham apresentado maior teor de carnosol e ácido carnósico, que são os principais componentes responsáveis pela atividade antioxidante. Chen; Shi; Ho (1992) também concordaram que extratos com hexano mostraram maior propriedade antioxidante que extratos com metanol.

Além da forma de obtenção do extrato, a eficácia tanto do extrato de alecrim quanto do carnosol e do ácido carnósico é significativamente influenciada pelo tipo de sistema testado (óleo ou emulsão), tipo de óleo como substrato (milho, soja, amendoim, peixe), método usado para acompanhar a oxidação (formação de dienos conjugados, hexanol ou propanol) e concentração utilizada para os antioxidantes (FRANKEL et al., 1996b).

3.6.2 Ação antioxidante

Estudos têm sido conduzidos com o propósito de examinar a atividade antioxidante do alecrim na forma natural e sob a forma de extrato, em comparação com outros antioxidantes naturais ou sintéticos.

Nesse sentido, em pesquisa realizada por Basaga; Acikel; Tekkaya (1997), foi observado que a presença de 100 mg/kg de alecrim em óleos de soja e milho, armazenados a 30°C, preveniu a autooxidação, mas, novamente, foi menos eficiente que o BHT nos dois óleos. A atividade antioxidante foi acompanhada pela determinação de peróxidos.

Almeida-Doria e Regitano-D'Arce (2000) avaliaram a ação antioxidante de extrato etanólico de alecrim em óleo de soja submetido a testes de oxidação acelerada em estufa a 60°C, comparando-o com os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHA + BHT. Verificou-se que os compostos empregados retardaram a oxidação do óleo, entretanto, o extrato natural não atingiu a eficiência do TBHQ, mas foi tão efetivo quanto a mistura BHA + BHT.

Rizner-Hras et al. (2000) compararam o efeito antioxidante do extrato de alecrim com α -tocoferol, ascorbil palmitato e ácido cítrico em óleo de girassol armazenado a 60°C por 11 dias. O extrato de alecrim exibiu a melhor atividade antioxidante. O desenvolvimento da oxidação foi acompanhado pela determinação de peróxidos (compostos primários) e anisidina (produtos secundários).

Também em pesquisa realizada por Lalas e Dourtoglou (2003), o extrato de alecrim demonstrou maior efetividade que α -tocoferol quando utilizado para prevenir a oxidação do óleo de soja. O período de indução do controle, medido por meio do Rancimat a 90°C com fluxo de ar de 15 L/h, foi 35,1 horas, ao passo que, o do óleo acrescido de alecrim ou α -tocoferol na concentração de 400 mg/kg foi 65,3 e 36,5 horas, respectivamente.

Paralelamente à avaliação da atividade antioxidante dos extratos de alecrim, pesquisas têm também focado o isolamento e a atividade antioxidante dos constituintes fenólicos dessa especiaria.

O efeito antioxidante do alecrim deve-se, principalmente, à capacidade dos constituintes fenólicos de doar hidrogênio para os radicais livres, formando radicais estáveis, e também em parte à capacidade de seqüestrar radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$) (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000).

Os vários constituintes do alecrim têm sido testados de forma isolada; alguns estudos revelaram que aproximadamente 90% da atividade antioxidante dessa especiaria é atribuída ao carnosol e ao ácido carnósico, sendo que a atividade como inativador de radicais livres do ácido carnósico é mais alta que a do carnosol (ARUOMA et al., 1992; CHEN; SHI; HO, 1992).

O ácido carnósico também se mostrou mais efetivo que o carnosol, quando testado em óleos de soja, milho e peixe por meio da inibição da formação de dienos conjugados (FRANKEL, 1996). Porém, o

ácido carnósico é bastante instável e pode ser transformado em carnosol, o qual é convertido para rosmanol, epirosmanol e 7-metilrosmanol (HALL; CUPPETT, 1997).

Por outro lado, em pesquisa envolvendo 24 extratos de alecrim, Cuvelier; Richard; Berset (1996) encontraram dados que indicaram que os compostos carnosol, ácido carnósico e ácido rosmarínico foram igualmente os mais efetivos compostos, sendo a atividade antioxidante medida pela autooxidação acelerada de metil linoleato.

Em óleo de milho, tanto o ácido carnósico quanto o ácido rosmarínico apresentaram maior atividade que carnosol; em contraste, em emulsão do mesmo óleo em água, o ácido carnósico e o carnosol foram mais ativos que o ácido rosmarínico. Frankel e Huang (1994) atribuíram as diferenças da capacidade antioxidante em emulsão óleo-água ou em óleo de milho ao denominado "paradoxo polar", ou seja, os antioxidantes hidrofílicos são mais efetivos em óleo devido a uma orientação para a interface ar-óleo, fornecendo uma proteção melhor que os lipofílicos, os quais permanecem solubilizados na fase oleosa e são mais efetivos em sistema de emulsão óleo-água. Ácidos rosmarínico e carnósico, que apresentam maior polaridade, e, assim, solubilidade na fase aquosa da emulsão, demonstraram proteção menor que em óleo de milho (FRANKEL et al., 1994).

Em estudo para determinar o efeito de diferentes sistemas lipídicos na atividade antioxidante do carnosol e ácido carnósico, acompanhada pela medida da formação de hidroperóxidos e dienos

conjugados, o ácido carnósico em metil linoleato mostrou maior atividade antioxidante que o carnosol e ambos foram mais ativos que a mesma concentração molar de α -tocoferol. Em contraste, em ácido linoléico, o carnosol foi mais ativo que o ácido carnósico e teve atividade similar à do α -tocoferol. Em triacilgliceróis do óleo de milho, os diterpenos foram menos ativos que α -tocoferol; a atividade antioxidante do carnosol e do ácido carnósico mostrou ser altamente dependente da polaridade do sistema lipídico oxidado e, por essa razão, segundo Hopia et al. (1996), para entender melhor o efeito de antioxidantes naturais em alimentos, é muito importante considerar o tipo de sistema lipídico usado.

Algumas pesquisas têm sido realizadas com o intuito de comparar a atividade antioxidante dos constituintes fenólicos do alecrim com outros antioxidantes naturais ou sintéticos; nesse sentido, quando testados pelo Método do Oxigênio Ativo, rosmanol e carnosol foram expressivamente mais ativos como antioxidantes que α -tocoferol (NAKATANI; INATANI, 1984).

O efeito antioxidante do rosmaridifenol e da rosmariquinona foi medido em banha; a atividade antioxidante dos dois diterpenos foi superior à do BHA e similar à do BHT (HOULIHAN; HO; CHANG, 1984).

Uma maior atividade antioxidante do extrato da especiaria adicionada ao óleo de milho ou à emulsão óleo-água (0,025%) (FRANKEL et al., 1996b), ou adicionada à banha (0,020%) (WU et al., 1982) foi observada quando comparada à atividade de seus componentes isolados. Segundo Cintra (1999), tais observações podem sugerir que há outros

compostos a serem identificados, e/ou há um efeito sinérgico entre os componentes do alecrim.

3.6.3 Estabilidade em alta temperatura

O aquecimento resulta em alguma redução da atividade antioxidante de muitas especiarias, provavelmente porque a alta temperatura reduz o conteúdo de óleos voláteis, os quais possuem atividade antioxidante, ou porque os compostos antioxidantes fenólicos reagem com diferentes substratos do meio testado (MADSEN; BERTELSEN, 1995).

Por outro lado, segundo Che-Man e Jaswir (2000), o extrato de alecrim é um antioxidante natural que, além da forte característica antioxidante, tem boa resistência térmica. No entanto, segundo esses autores, parecem ser limitadas as informações sobre a efetividade do extrato de alecrim para retardar a deterioração do óleo durante a fritura, bem como o grau de degradação dos diterpenos fenólicos nessas condições. Esses pesquisadores estudaram o efeito do extrato de alecrim nas alterações físico-químicas de óleo de palma refinado, clarificado e desodorizado durante fritura. Os resultados mostraram que o antioxidante retardou significativamente a deterioração do óleo durante 6 dias de fritura de batata *chips*. Foi comprovado também que, durante a fritura, a qualidade do óleo decresceu gradualmente e o antioxidante aumentou a aceitabilidade do produto frito.

Um outro estudo mostrou que o uso de extrato de alecrim, sálvia e ácido cítrico melhorou a pontuação sensorial de batatas fritas durante cinco dias de repetidos processos de fritura. Todos os três antioxidantes influenciaram significativamente nos atributos sensoriais avaliados, como aparência, textura, odor e aceitabilidade global. Os antioxidantes naturais usados também mostraram significativa redução da oxidação da oleína de palma durante a fritura (JASWIR; CHE-MAN; KITTS, 2000).

3.7 Sinergismo entre antioxidantes naturais

A associação de antioxidantes pode levar a um efeito sinérgico. O mecanismo de ação dos sinérgicos varia com o tipo de substância; é comum admitir que eles atuam complexando metais pró-oxidantes, regenerando antioxidantes primários ou inibindo a decomposição de peróxidos, interrompendo, dessa maneira, o processo de autooxidação (CILLARD; CILLARD, 1986).

Muitos estudos têm sido conduzidos com o intuito de investigar o sinérgico entre antioxidantes naturais. O efeito sinérgico do extrato de alecrim com outros antioxidantes, especialmente tocoferóis, tem sido investigado e resultados conflitantes têm sido reportados (BANIAS; OREOPOULOU; THOMOPOULOS, 1992; HOPIA et al., 1996; RIZNER-HRAS et al., 2000; WADA; FANG, 1992).

Em pesquisa realizada por Rizner-Hras et al. (2000), investigando o efeito sinérgico do α -tocoferol com extrato de alecrim em óleo de girassol armazenado a 60°C, foi observado que α -tocoferol reduziu o efeito antioxidante do extrato de alecrim, contudo, o extrato de alecrim aumentou a estabilidade do α -tocoferol. Baseado no índice de peróxidos e anisidina, a ordem da atividade antioxidante foi: extrato de alecrim > extrato de alecrim + α -tocoferol > α -tocoferol. Isso está de acordo com o encontrado por Hopia et al. (1996), que observaram que α -tocoferol diminuiu a estabilidade oxidativa dos dois principais compostos do alecrim; carnosol e ácido carnósico. Banias; Oreopoulou; Thomopoulos (1992) também reportaram que α -tocoferol mostrou um forte efeito negativo com diferentes extratos de plantas, incluindo o alecrim, adicionados em banha mantida a 75°C.

Hopia et al. (1996) afirmaram que um possível mecanismo para esse efeito protetor do alecrim pode ser similar ao do ácido ascórbico e tocoferóis. Tal mecanismo está representado pela Figura 8.

Este mecanismo, no qual o ácido ascórbico reduz o radical tocoferoxil para tocoferol ativo, é geralmente considerado como o responsável pela propriedade antioxidante sinérgica entre misturas de tocoferóis e ácido ascórbico.

Embora os estudos citados não tenham mostrado sinérgismo entre ácido carnósico e α -tocoferol, esse efeito foi anteriormente reportado em óleo de sardinha acrescido de uma mistura de α -tocoferol e alecrim (500 + 200 mg/kg, respectivamente) e armazenado a 30°C e

60°C por 15 dias (WADA; FANG, 1992). Hopia et al. (1996) sugeriram que o efeito protetor do ácido carnósico na estabilidade oxidativa do α -tocoferol pode explicar o sinergismo reportado entre extrato de alecrim e tocoferóis.

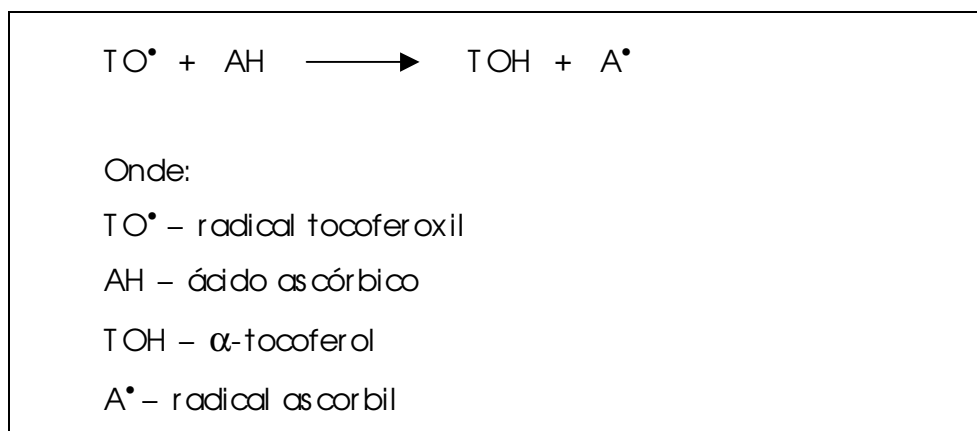


Figura 8 – Mecanismo de ação do ácido ascórbico e do tocoferol.

Fonte: TAPPEL et al., 1961.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Óleo

Para a realização dos testes foi utilizado óleo de soja refinado, gentilmente cedido pela empresa Cargill Agrícola S/A, Uberlândia - MG.

As amostras foram solicitadas ao fornecedor sem a adição de antioxidantes (TBHQ e ácido cítrico). Foram acondicionadas em embalagem opaca de 1 L e congeladas até o início dos ensaios.

4.1.2 Antioxidantes

- Extrato de Alecrim – Foi utilizado extrato de alecrim comercial marca GuardianTM tipo 40, gentilmente cedido pela empresa Danisco S/A. Segundo informações do fabricante, esse extrato tem, em sua composição, 4% de diterpenos fenólicos e 96% de propileno glicol, triacetina e emulsificante grau alimentício como veículo.

- Tocoferol – Foi utilizado α -tocoferol, vitamina E (pureza 97%) marca Sigma Aldrich.

4.1.3 Reagentes e soluções

Solução de ácido acético/dorofórmio (3:2); solução saturada de iodeto de potássio; solução de tiosulfato de sódio 0,01M ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$); solução de amido 1% ; solução de hexano/éter etílico (90:10); iso-octano, n-hexano, acetato de etila e isopropanol das marcas Vetec, Dinâmica, Synth, Merck, grau P.A. ou CLAE.

4.1.4 Adsorventes

- Alumina (Al_2O_3) – óxido de alumínio 90, padronizado para análises cromatográficas de adsorção em coluna de acordo com Brockmann, Merck 1.01097.1000.
- Sílica gel – sílica gel, granulometria de 0,063 a 0,200 mm para cromatografia em coluna, Merck 7734 ou equivalente.

4.1.5 Equipamentos

- Termoxidação – Chapa de aquecimento marca Quimis, modelo 308-26.
- Estabilidade – Registrador e bloco Rancimat marca Metrohm, modelo 743.

- Compostos Polares Totais – Rota evaporador marca Quimis, modelo Q 344B2; Banho ultratermostaticado marca Marconi; Bomba de vácuo marca Marconi, modelo Ma 057; Banho-maria marca Fisaton.
- Dienos Conjugados – Espectrofotômetro marca Shimadzu, modelo UV mini 1240.
- Tocoferóis – Cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) com detector de Fluorescência marca TSP, modelo FL 2000.
- Uso geral – Balança analítica marca Ohaus, modelo AS 200S; Balança semi-analítica marca Marte, modelo AS 2000C; Estufa para secagem e esterilização marca Odontobrás, modelo EL 1-3.

4.2 Procedimento experimental

4.2.1 Ensaaios

Ensaio I

O óleo de soja foi purificado com alumina para a eliminação dos tocoferóis naturais. Esse óleo isento de tocoferóis teve a adição dos antioxidantes naturais α -tocoferol ou extrato de alecrim nas concentrações apresentadas na Tabela 3.

Todos os tratamentos foram conduzidos em duas repetições.

A atividade dos antioxidantes foi avaliada por meio da determinação da estabilidade oxidativa utilizando o Rancimat. Foram

então selecionados os tratamentos em que o extrato de alecrim e o α -tocoferol apresentaram maior proteção ao óleo com relação à oxidação.

Tabela 3 – Concentrações de antioxidantes adicionadas ao óleo purificado.

Tratamento	Antioxidante	Concentração (mg/kg)
A		0
B		100
C		300
D	Extrato de alecrim	500
E		800
F		1.000
G		0
H		100
I		200
J	α -tocoferol	400
K		600
L		700

Ensaio II

Foram submetidos à termoxidação quatro tipos de tratamentos:

- Óleo de soja purificado sem adição de antioxidantes – controle (OP).
- Óleo de soja purificado com adição da concentração de extrato de alecrim mais efetiva no Ensaio I (OP + ALE).
- Óleo de soja purificado com adição da concentração de α -tocoferol mais efetiva no Ensaio I (OP + TOC).

- Óleo de soja purificado com adição da mistura das concentrações mais efetivas de extrato de alecrim e α -tocoferol no Ensaio I (OP + M).

Foi avaliada a evolução da oxidação das amostras após 0; 2,5; 5; 7,5 e 10 horas de termoxidação.

Todos os tratamentos foram conduzidos em duas repetições.

Ensaio III

Foram submetidos à termoxidação três tipos de tratamentos:

- Óleo de soja purificado sem adição de antioxidantes (OP).
- Óleo de soja natural, que é o óleo que não foi purificado com alumina, portanto, provido de seus antioxidantes naturais (ON).
- Óleo de soja natural com adição da concentração de extrato de alecrim mais efetiva no Ensaio I (ON + ALE).

Foi avaliada a evolução da oxidação das amostras após 0; 2,5; 5; 7,5 e 10 horas de termoxidação.

Todos os tratamentos foram conduzidos em duas repetições.

4.2.2 Purificação do óleo com alumina

A purificação do óleo com alumina teve como objetivo determinar a influência apenas do α -tocoferol e do extrato de alecrim adicionados sobre a alteração do substrato lipídico, sem a influência de compostos minoritários não controlados, normalmente presentes nos óleos, com possíveis efeitos antioxidantes ou pró-oxidantes.

As amostras foram purificadas segundo o método descrito por Steel (2002), como segue: a alumina foi ativada em estufa a 180°C durante 2 horas. A quantidade de alumina utilizada foi a metade da quantidade do óleo a ser purificado (p. ex., para 50 g de óleo foram pesados 25 g de alumina) e foi colocada em coluna com tampão de algodão para retê-la. A amostra foi passada pela coluna, pouco a pouco, com auxílio de bomba de vácuo. O produto coletado após a primeira passagem foi pesado para repetir a purificação com alumina através de nova coluna. Esse produto da segunda passagem foi utilizado para o preparo dos tratamentos (óleo purificado com adição de α -tocoferol e extrato de alecrim). Foi conseguido um rendimento de 61 a 64% após a segunda passagem pela coluna de alumina. Steel (2002) conseguiu um rendimento de 50 a 65% ao submeter óleo de soja ao mesmo procedimento.

Após a remoção dos tocoferóis, o óleo foi estocado a -18°C até o início dos ensaios.

Para a caracterização do óleo purificado, foram determinados a estabilidade oxidativa, o teor de compostos polares totais, o índice de peróxidos e o teor de dienos conjugados e de tocoferóis.

4.2.3 Adição de extrato de alecrim e α -tocoferol

Foram adicionadas as quantidades requeridas de extrato de alecrim e de α -tocoferol ao óleo purificado com alumina e extrato de

alecrim ao óleo natural para obtenção das amostras que foram submetidas à termoxidação.

O extrato de alecrim foi adicionado diretamente no óleo, seguido de lenta agitação até completa dissolução. O α -tocoferol foi adicionado na forma de solução 20 mg/mL em n-hexano.

Foram preparados 30 mL de amostra para cada tratamento que foi submetido à termoxidação.

4.2.4 Termoxidação

Os testes para termoxidação dos tratamentos citados foram conduzidos em chapa aquecida, utilizando-se béqueres de 50 mL contendo 30 mL de amostra, com relação superfície/volume $0,4 \text{ cm}^{-1}$. Esse valor corresponde àquele normalmente usado nas frituras em fritadeira. A temperatura utilizada foi 180°C , normalmente utilizada em frituras por imersão. Os aquecimentos foram conduzidos de modo contínuo por diferentes períodos de tempo (0; 2,5; 5; 7,5 e 10 horas). A temperatura foi controlada com auxílio de termômetro com variação de $\pm 5^{\circ}\text{C}$.

Todas as amostras, a diferentes intervalos de tempo, foram recolhidas em frasco âmbar e armazenadas à temperatura de aproximadamente -18°C até o momento das análises.

4.3 Métodos

Segundo Wagner; Wotruba; Elmadfa (2001), para se estudar o efeito antioxidante dos tocoferóis, é necessária a comparação de resultados obtidos por meio de diferentes métodos, já que o efeito dos tocoferóis é altamente dependente das características do material oxidado. Para Silva; Borges; Ferreira (1999), nenhum método para avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras correlaciona-se de um modo perfeito com as modificações sensoriais produzidas no decurso das reações de oxidação, sendo necessário o uso de vários métodos analíticos, já que cada um deles fornece informações sobre um estado particular do processo oxidativo, variável em função das condições aplicadas e dos substratos lipídicos usados.

As amostras termoxidadas do Ensaio II foram analisadas quanto ao valor da estabilidade oxidativa, compostos polares totais, índice de peróxidos, dienos conjugados e quanto ao teor de tocoferóis para amostras em que foram adicionados.

As amostras termoxidadas do Ensaio III foram analisadas quanto ao valor da estabilidade oxidativa, compostos polares totais, dienos conjugados e quanto ao teor de tocoferóis (exceto óleo purificado).

4.3.1 Estabilidade oxidativa

A estabilidade de óleos é definida como o tempo para se atingir nível de rancidez detectável ou surpreendente mudança na taxa de oxidação (ANTONIASI, 2001). Foi determinada pelo método proposto pela AOCS Cd 12b-92 (1993), utilizando o Rancimat que é baseado na determinação da condutividade elétrica dos produtos voláteis de degradação.

A determinação foi realizada a 100°C, com fluxo de ar de 20 L/h, utilizando 3 g de amostra e volume de água destilada de 60 mL nos frascos contendo os eletrodos.

Por esse método, uma curva de condutividade elétrica x tempo é automaticamente registrada com o decorrer da reação e do teste, o período de indução é determinado em horas.

4.3.2 Compostos polares totais

A quantificação de compostos polares é reconhecida como o método mais preciso para a avaliação do grau de degradação de óleos de fritura; inclusive, muitos países da Europa têm estabelecido o limite de 25% de compostos polares totais para o descarte de óleos de fritura (SANIBAL; MANCINI-FILHO, 2004). A base do método é a separação da amostra de óleo, utilizando cromatografia de adsorção, em duas frações

de diferentes polaridades que podem ser determinadas gravimetricamente (STEEL, 2002).

Foi aplicado o método cromatográfico proposto por Dobarganes; Velasco; Dieffenbacher (2000).

Para o preparo da amostra, um grama de óleo foi transferido quantitativamente com cerca de 1 mL de uma mistura de hexano:éter etílico (90:10) para uma coluna de vidro, com 1 cm de diâmetro e 30 cm de comprimento.

Para o preparo da coluna, 5 g de sílica gel (previamente seca em estufa a 105°C/1 hora, resfriada à temperatura ambiente em dessecador e agitada em erlenmeyer de 250 mL com tampa para homogeneização das partículas/10 minutos) foram pesados em um béquer de 50 mL e adicionados cerca de 11 mL de hexano:éter etílico (90:10). Essa mistura foi transferida de uma só vez à coluna, cuja extremidade inferior foi revestida por uma camada de algodão. A sílica residual foi lavada com hexano:éter (90:10) e, em seguida, foi adicionado cerca de 1 g de areia do mar para facilitar a posterior fixação da amostra. A fração apolar foi eluída com 50 mL da mistura de solventes hexano:éter etílico (90:10) e foi recolhida em balão. O solvente foi eliminado em evaporador rotativo com banho de água a 60°C e sistema de vácuo. Em seguida, o balão foi levado à estufa a 60°C até a eliminação completa dos solventes. Depois de resfriado, em dessecador, foi efetuada a pesagem da fração. O teor de triacilgliceróis não alterados, fração apolar, foi calculado pela fórmula:

$$\text{Fração apolar (\%)} = \frac{P_1}{P} \cdot 100$$

Onde:

P_1 = peso da fração não polar, em gramas;

P = peso da amostra adicionada à coluna, em gramas.

O teor de compostos polares, fração polar, foi calculado a partir dos triacilgliceróis não alterados, considerando que os compostos polares retidos estivessem incluídos na fração polar.

$$\text{Fração polar (\%)} = 100 - \text{Fração apolar}$$

4.3.3 Índice de peróxidos

Denomina-se índice de peróxidos os miliequivalentes de oxigênio ativo contidos em um quilograma de óleo, calculado a partir do iodo liberado do iodeto de potássio, operando nas condições indicadas no método proposto pela AOCS Cd 8-53 (1993). A análise foi realizada por meio da dissolução de amostras de 5 g de óleo em 25 mL de solução ácido acético: clorofórmio (3:2) e adição de 1 mL de solução iodeto de potássio saturada, seguida de repouso no escuro por 5 minutos.

Na seqüência foram adicionados 75 mL de água destilada e 0,5 mL de solução aquosa de amido 1%, seguida de titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,01 M. Foi conduzido paralelamente um ensaio em branco. O volume gasto do titulante até o desaparecimento da cor azul indicou a concentração de peróxidos, por meio da fórmula:

$$\text{Índice de Peróxidos (meq O}_2\text{/kg óleo)} = \frac{(A-B) \cdot M \cdot 1000}{P}$$

Onde:

A = volume de Na₂S₂O₃ gasto na titulação da amostra, em mililitros;

B = volume de Na₂S₂O₃ gasto na titulação do branco, em mililitros;

M = molaridade exata da solução de Na₂S₂O₃;

P = peso da amostra, em gramas.

4.3.4 Dienos conjugados

Este método determina dienos conjugados presentes na matéria graxa, expressos como porcentagem de ácidos dienóicos conjugados. Para esta determinação, foi utilizado o método AOCS Ti 1a-64 (1993). O óleo foi diluído em iso-octano (2,2,4-trimetilpentano), de forma que a leitura de absorvância estivesse entre 0,2 e 0,8. Foram utilizados, portanto, balões volumétricos de capacidade adequada para diluição da amostra dependendo do estado oxidativo da mesma. A absorvância foi medida a 233 nm.

A porcentagem de dienos conjugados foi obtida por meio da fórmula:

$$\text{Dienos Conjugados (\%)} = 0,84 \cdot \left(\frac{A}{b \cdot c} - k_0 \right)$$

Onde:

k₀ = absorvância para grupos ácidos (0,03) ou ésteres (0,07);

A = absorvância a 233 nm;

b = espessura da cubeta, em centímetros;

c = concentração da amostra, em g/L.

4.3.5 Tocoferóis

Para a determinação dos teores de tocoferóis foi utilizado o método AOCS Ce 8-86 (1998). A análise foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), com detector de fluorescência, de acordo com as seguintes condições: coluna de sílica de 125 x 4 mm com poro de 5 micrômetros, fluxo de 1,5 mL/min e comprimento de onda de excitação em 292 nm e de emissão em 326 nm. Utilizou-se como fase móvel uma mistura de 98,6% de n-hexano, 1,2% de acetato de etila e 0,2% de isopropanol, todos com grau de pureza para CLAE.

Pesou-se cerca de 1 g da amostra de óleo em balão volumétrico de 10 mL, cujo volume foi completado com n-hexano com grau de pureza para CLAE. O balão volumétrico foi coberto com papel alumínio para evitar degradação dos isômeros pela ação da luz. Em seguida, agitou-se o balão volumétrico, em agitador mecânico, por 1 minuto e depois procedeu-se à filtragem em filtro de 0,45 micrômetros. Depois de filtrada, a amostra foi injetada no cromatógrafo. A mistura dos padrões de tocoferol, que continha todos os isômeros e foi diluída a partir do padrão concentrado, também foi injetada.

Os resultados das injeções foram registrados em computador pelo software "Ezchrom".

Os valores das concentrações foram calculados em base da área dos picos de excitação da leitura e expressos em valores de cada homólogo separadamente, em termos de mg/kg.

4.4 Delineamento experimental

Ensaio I

O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (concentrações de 0; 100; 300; 500; 800; e 1.000 mg/kg para o extrato de alecrim e de, aproximadamente, 0; 100; 200; 400; 600 e 700 mg/kg para o α -tocoferol) e duas repetições (GOMES, 2000).

Os resultados obtidos da estabilidade oxidativa foram submetidos à análise de variância para determinar a influência dos tratamentos na estabilidade dos óleos adicionados de antioxidantes, medida por meio do Randimat.

Ensaio II

Foram considerados os seguintes fatores: Antioxidantes (OP, OP + ALE, OP + TOC, OP + M) e Tempos de aquecimento (0; 2,5; 5; 7,5 e 10 horas).

Os resultados obtidos da estabilidade oxidativa, compostos polares totais, índice de peróxidos e dienos conjugados, em duas repetições, foram submetidos às análises de variância para determinar a

influência dos fatores sobre a alteração dos óleos submetidos à termoxidação. O experimento foi realizado em esquema fatorial 4 x 5, no delineamento inteiramente casualizado (GOMES, 2000).

Ensaio III

Foram considerados os seguintes fatores: Antioxidantes (OP, ON, ON + ALE) e Tempos de aquecimento (0; 2,5; 5; 7,5 e 10 horas).

Os resultados obtidos da estabilidade oxidativa, compostos polares totais e dienos conjugados, em duas repetições, foram submetidos às análises de variância para determinar a influência dos fatores sobre a alteração dos óleos submetidos à termoxidação. O experimento foi realizado em um esquema fatorial 3 x 5, no delineamento inteiramente casualizado (GOMES, 2000).

Teor de α -tocoferol

Para as análises dos teores de α -tocoferol foram selecionadas as amostras dos Ensaios II e III em que este antioxidante estava inicialmente presente. Foram considerados os seguintes fatores: Antioxidantes (OP + TOC, OP + M, ON, ON + ALE) e Tempos de aquecimento (0; 5 e 10 horas).

Os resultados obtidos das determinações, em duas repetições, foram submetidos à análise de variância para determinar a influência dos fatores sobre a alteração dos óleos submetidos à termoxidação. O

experimento foi realizado em esquema fatorial 4 x 3, no delineamento inteiramente casualizado (GOMES, 2000).

Para todos os ensaios, as análises de variância e os testes de Tukey para as médias a 5% foram obtidos por meio do programa ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas – versão 2.0. As Tabelas 4, 5, 6 e 7 apresentam os esquemas das análises de variância para as determinações analíticas dos Ensaios I, II, III, e para a determinação de α -tocoferol, respectivamente.

Tabela 4 – Esquema da análise de variância para a estabilidade oxidativa do Ensaio I.

Causas de Variação	Graus de Liberdade
Concentrações	5
Resíduo	6
Total	11

Tabela 5 – Esquema da análise de variância para a estabilidade oxidativa, compostos polares totais, índice de peróxidos e dienos conjugados do Ensaio II.

Causas de Variação	Graus de Liberdade
Antioxidantes	3
Tempos de Aquecimento	4
Antioxidantes x Tempos de Aquecimento	12
(Tratamentos)	(19)
Resíduo	20
Total	39

Tabela 6 – Esquema da análise de variância para a estabilidade oxidativa, compostos polares totais e dienos conjugados do Ensaio III.

Causas de Variação	Graus de Liberdade
Antioxidantes	2
Tempos de Aquecimento	4
Antioxidantes x Tempos de Aquecimento	8
(Tratamentos)	(14)
Resíduo	15
Total	29

Tabela 7 – Esquema da análise de variância para o α -tocoferol.

Causas de Variação	Graus de Liberdade
Antioxidantes	3
Tempos de Aquecimento	2
Antioxidantes x Tempos de Aquecimento	6
(Tratamentos)	(11)
Resíduo	12
Total	23

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização inicial

Os antioxidantes não revertem os processos de oxidação, apenas evitam sua propagação. Por esse motivo é inútil empregar antioxidantes quando o processo de oxidação já se encontra em estágio avançado (MONFERRER; VILLALTA, 1993a). Dessa forma, fez-se necessário o estudo das características iniciais do óleo recebido da indústria para utilização no projeto, fazendo uso de índices analíticos úteis na definição da qualidade de óleos e gorduras, como a medida da estabilidade oxidativa, quantificação dos compostos polares totais e determinações do índice de peróxidos e do teor de dienos conjugados.

Na Tabela 8, estão apresentadas as características de qualidade iniciais do óleo de soja utilizado.

Tabela 8 – Características iniciais do óleo de soja refinado.

Determinações Analíticas	Óleo de soja natural
Estabilidade Oxidativa (horas)	17,08
Compostos Polares Totais (%)	1,98
Índice de Peróxidos (meq/kg)	0,70
Dienos Conjugados (%)	0,26

De acordo com a Tabela 8, o óleo apresenta uma boa qualidade inicial, visto que:

- apresenta alto valor de estabilidade oxidativa; 17,08 horas. Esse valor é superior ao dos óleos de soja utilizados por Del Ré (2003) e Barrera-Arellano et al. (2002), que encontraram, respectivamente, 12,47 e 13,30 horas de estabilidade oxidativa em Rancimat sob as mesmas condições utilizadas neste estudo. Steel (2002) encontrou 14,00 horas de estabilidade oxidativa para óleo de soja em Rancimat a 110°C, provavelmente a 100°C esse valor também seria maior que os encontrados por Del Ré (2003) e Barrera-Arellano et al. (2002);
- o teor de compostos polares totais de 1,98% está dentro da faixa de variação de 0,4 a 6,4% encontrada por Lumley (1988) ao analisar o conteúdo de compostos polares em 50 amostras de óleo sem uso. De acordo com Masson et al. (1997), a porcentagem de compostos polares em um óleo novo deve ser inferior a 5% ;
- o valor de peróxidos de 0,70 meq/kg está bem abaixo do limite estabelecido pelas normas que regulamentam a adequação de um óleo para consumo no Brasil, a portaria 482/99 – ANVISA, que estabelece o limite de 10 meq/kg para o óleo de soja refinado (BRASIL, 1999);
- o baixo valor para dienos conjugados (0,26%) também retrata a boa qualidade do óleo e está de acordo com os valores encontrados por outros pesquisadores também em óleo de soja: 0,20% (EVANS; KODALI; ADDIS, 2002) e 0,33% (DEL RÉ, 2003).

5.2 Efeitos da purificação com alumina

O óleo de soja natural foi purificado com alumina, conforme descrito em Material e Métodos, item 4.2.2. O óleo obtido após a purificação foi analisado quanto a sua estabilidade oxidativa, teor de compostos polares totais, índice de peróxidos, teores de dienos conjugados e de tocoferóis. A Tabela 9 mostra a média e o desvio padrão dos valores encontrados

Tabela 9 – Caracterização do óleo de soja antes e após purificação com alumina.

Determinações Analíticas	Óleo de soja antes da purificação	Óleo de soja após a purificação
Estabilidade Oxidativa (horas)	17,08 ± 0,11	0,48 ± 0,09
Compostos Polares Totais (%)	1,98 ± 0,07	0,12 ± 0,01
Índice de Peróxidos (meq/kg)	0,70 ± 0,01	1,29 ± 0,01
Dienos Conjugados (%)	0,26 ± 0,01	0,23 ± 0,01
Tocoferóis Totais (mg/kg)	1.058 ± 13	< 0,2

Como pode ser observado na Tabela 9, com relação à estabilidade oxidativa, houve uma drástica redução, 97% do teor inicial, evidenciando a eficácia da purificação com alumina para a retirada dos antioxidantes naturais. Barrera-Arellano et al. (2002), utilizando o mesmo procedimento para a remoção de tocoferóis, conseguiram 88% de redução da estabilidade oxidativa de óleo de soja, medida pelo Randimat nas mesmas condições deste estudo. Romero et al. (2004) conseguiram

reduzir em 89% o período de indução medido pelo Rancimat também a 100°C após submeter o óleo de avelã chilena (*Gevuina avellana* Mol) ao mesmo procedimento para remoção de tocoferóis. A grande diferença na estabilidade entre o óleo purificado e o não purificado enfatiza a importância dos compostos que não são triacilgliceróis como inibidores naturais da oxidação de óleos vegetais (FUSTER et al., 1998).

A purificação mostrou-se também muito eficiente na remoção de compostos polares, uma vez que estes foram quase que totalmente eliminados, com uma redução de 94% do teor inicial. Steel (2002) reduziu em 47% o teor de compostos polares após aplicar o mesmo procedimento para também purificar óleo de soja submetido a termoxidação.

Com relação ao índice de peróxidos, não foi encontrada a esperada redução como a observada por Souza (2001), que, por meio da purificação da oleína de palma com alumina, reduziu o índice de peróxidos de 0,72 para 0,43 meq/kg. Vale salientar que, naquele trabalho, os tocoferóis não foram completamente removidos, restando 74,9 mg/kg.

Os dienos conjugados também foram parcialmente removidos, com uma redução de 11% do teor inicial e não foram encontrados tocoferóis nas amostras de óleo purificado, o que confirmou a eficácia do procedimento para a retirada desses compostos. Barrera-Arelano et al. (2002) e Steel (2002) também não detectaram tocoferóis em óleo de soja após utilizar o mesmo procedimento para remoção desses antioxidantes naturalmente presentes no óleo.

5.3 Ensaio I - Determinação preliminar da atividade antioxidante

O período de indução (também chamado de índice de estabilidade oxidativa) é um parâmetro comparativo muito utilizado para se avaliarem diferentes tipos de óleos para fritura, alteração na composição em ácidos graxos, eficiência da adição de antioxidantes, entre outros (ANTONIASSI, 2001). O aparelho Randimat é uma versão automática do teste AOM (Active Oxygen Method) que determina a estabilidade oxidativa em óleos. Nesse equipamento, induz-se a oxidação de uma amostra de óleo, que é mantida sob temperatura e fluxo de ar constantes. Os produtos voláteis gerados com a oxidação são recolhidos em água destilada, cujo aumento de condutividade elétrica, detectada por eletrodos, gera um gráfico em que se visualiza o período de indução em horas (ANTONIASSI, 2001; LIMA; GONÇALVES, 1994).

Para avaliar a concentração mais efetiva de cada um dos antioxidantes testados, bem como uma possível ação pró-oxidante, foram aplicadas concentrações de 0, 100, 300, 500, 800 e 1.000 mg/kg de extrato de alecrim ou de 0, 100, 200, 400, 600 e 700 mg/kg de α -tocoferol no óleo de soja purificado e a medida da estabilidade oxidativa foi verificada pelo Randimat a 100°C. O limite de 1.000 mg/kg para o extrato de alecrim foi definido por ser esse o máximo valor recomendado pelo fabricante do produto. As concentrações utilizadas para o α -tocoferol, foram baseadas em estudos anteriores (CUESTA; MARTINEZ; CHAPARRO,

1995; FRANKEL et al., 1996a; HUANG; FRANKEL; GERMAN, 1994; LALAS; DOUTORGLOU, 2003; RIZNER-HRAS et al., 2000).

O Anexo A apresenta a análise de variância para a determinação da estabilidade oxidativa do óleo de soja purificado adicionado de alecrim ou de α -tocoferol. Como observado, o teste F foi significativo ($P < 0,01$) para o efeito Concentrações tanto para o extrato de alecrim quanto para o α -tocoferol. As Tabelas 10 e 11 mostram o resultado das médias submetidas ao teste de Tukey para o alecrim e α -tocoferol, respectivamente.

Tabela 10 – Estabilidade oxidativa (horas) do óleo de soja purificado adicionado de diferentes concentrações de extrato de alecrim.

Antioxidante	Concentrações (mg/kg)					
	0	100	300	500	800	1.000
Alecrim	0,48 ^e	0,67 ^e	1,69 ^d	2,96 ^c	5,07 ^b	6,02 ^a

a, b ... (linha) - médias de Concentrações seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Com relação às concentrações de extrato de alecrim adicionadas, verifica-se, pela Tabela 10, que a concentração de 100 mg/kg não demonstrou ação antioxidante, já que não houve diferença significativa entre os valores da estabilidade das amostras com 0 e 100 mg/kg de antioxidante. Verifica-se, porém, que houve diferença significativa entre os valores da estabilidade oxidativa no intervalo de 100 a 1.000 mg/kg e que tais valores aumentaram com o aumento da

dosagem, não demonstrando, portanto, efeito pró-oxidante. Esse resultado está de acordo com o que tem sido verificado por alguns pesquisadores; a atividade antioxidante do extrato de alecrim tem aumentado com o aumento da concentração na faixa de 100 a 1.000 mg/kg (GORDON; KOURIMSKÁ, 1995).

Tabela 11 – Estabilidade oxidativa (horas) do óleo de soja purificado adicionado de diferentes concentrações de α -tocoferol.

Antioxidante	Concentrações (mg/kg)					
	0	100	200	400	600	700
α -tocoferol	0,48 ^e	2,65 ^d	5,42 ^c	6,78 ^b	7,70 ^a	7,71 ^a

a, b ... (linha) - médias de Concentrações seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

No caso das concentrações de α -tocoferol adicionadas, houve diferença significativa entre os valores da estabilidade oxidativa no intervalo de 0 a 600 mg/kg e eles também aumentaram com o aumento da concentração, não apresentando, dessa forma, a característica pró-oxidante relatada pela literatura (EVANS; KODALI; ADDIS, 2002; JUNG; MIN, 1990).

Esse fato pode ser justificado pelo uso de diferentes métodos para acompanhar a oxidação, visto que, segundo Evans; Kodali; Addis (2002), a aparente relação entre a concentração de tocoferol e sua atividade antioxidante pode ser influenciada pelo método analítico usado para determinar a extensão e o ponto final da oxidação; no presente trabalho, foi utilizado o Rancimat a 100°C, enquanto os pesquisadores

citados utilizaram a determinação de peróxidos e dienos conjugados com oxidação acelerada a 50°C. Esse fator tem contribuído para as opiniões conflitantes em trabalhos publicados considerando as concentrações necessárias para estabilizar óleo de soja; vale salientar, inclusive, que as concentrações ótimas de α -tocoferol para inibir a oxidação pela formação ou decomposição de hidroperóxidos são contraditórias (HUANG; FRANKEL; GERMAN, 1994).

Verifica-se, ainda, pela Tabela 11, que não houve diferença significativa na estabilidade oxidativa das amostras com 600 e 700 mg/kg de α -tocoferol.

O efeito de um antioxidante é chamado Fator de Estabilização e é expresso como a razão entre o período de indução de um óleo na presença do antioxidante e o período de indução do mesmo óleo na ausência do antioxidante (KOCHHAR; ROSSEL, 1990; YANISHLIEVA; MARINOVA, 1996). Quanto maior o valor do Fator de Estabilização, melhor a atividade antioxidante (ELIZABLE; BRESSA; ROSA, 1992).

Na Tabela 12, são apresentados os Fatores de Estabilização para todas as concentrações dos antioxidantes testadas no presente trabalho.

Verifica-se, pelos valores do Fator de Estabilização da Tabela 12, que o extrato de alecrim foi eficiente em retardar a oxidação, mas o α -tocoferol foi melhor. Por outro lado, ao avaliar o Fator de Estabilização de 400 mg/kg de extrato de alecrim e a mesma concentração de α -tocoferol em óleo de soja natural, Lalas e Dourtoglou (2003) encontraram

maior valor para o extrato de alecrim do que para α -tocoferol: 1,86 e 1,04, respectivamente. Sobre isso, Chen; Shi; Ho (1992) afirmaram que o nível de proteção contra oxidação é diferente entre os extratos de alecrim e depende do método de extração, estando intimamente relacionado com o teor de diterpenos fenólicos. Em estudo realizado por Schwarz; Ternes; Schmauderer (1992), os 100 mg/kg de extrato de alecrim adicionados em banha, utilizada como substrato lipídico por ter conteúdo de antioxidantes naturais extremamente baixo, aumentaram o período de indução, obtido através do Randimat a 100°C, de 2 horas para 5,8 a 16 horas, conforme a concentração de diterpenos fenólicos do extrato que variou de 2,78 a 22,49% .

Tabela 12 – Fator de Estabilização para os antioxidantes testados em óleo de soja purificado.

Concentrações mg/kg	Fator de Estabilização (F)	
	extrato de alecrim	α -tocoferol
100	1,40	5,52
200		11,29
300	3,52	
400		14,13
500	6,17	
600		16,04
700		*
800	10,56	
1.000	12,54	

* Não houve diferença significativa na estabilidade oxidativa das amostras com 600 e 700 mg/kg de α -tocoferol.

Vale ressaltar que o α -tocoferol utilizado no presente trabalho tem pureza de 97% , enquanto o extrato de alecrim tem 4% de diterpenos fenólicos. Lalas e Dourtoglou (2003) observaram que, além da composição do extrato, a proteção antioxidante também pode ser influenciada pelo efeito sinergista entre os componentes; contudo, o mecanismo deste sinergismo é ainda desconhecido.

No presente estudo, com base na estabilidade oxidativa encontrada e no Fator de Estabilização, a ordem da atividade antioxidante foi 600 mg/kg TOC > 400 mg/kg TOC > 1.000 mg/kg ALE > 200 mg/kg TOC > 800 mg/kg ALE > 500 mg/kg ALE > 100 mg/kg TOC > 300 mg/kg ALE > 100 mg/kg ALE.

O Fator de Estabilização mais alto para o α -tocoferol e para o extrato de alecrim foi na concentração de 600 e 1.000 mg/kg, respectivamente. Dessa forma, foram selecionadas essas concentrações para serem submetidas aos testes de termoxidação.

5.4 Ensaio II – Termoxidação do óleo purificado

Trabalhos em que a fritura ou a termoxidação é realizada em laboratório buscam entender os efeitos das diferentes variáveis envolvidas no processo de fritura para poder fazer recomendações à melhoria do processo, dos óleos e gorduras e dos aditivos utilizados (STEEL, 2002).

Foi realizada a termoxidação do óleo de soja purificado sem (OP) e com adição de 1.000 mg/kg de extrato de alecrim (OP + ALE), 600

mg/kg de α -tocoferol (OP + TOC) e 1.000 mg/kg de extrato de alecrim + 600 mg/kg de α -tocoferol (OP + M).

A evolução da oxidação foi avaliada por meio das determinações da estabilidade oxidativa, compostos polares totais, índice de peróxidos e dienos conjugados.

5.4.1 Estabilidade oxidativa

A estabilidade oxidativa, determinada no presente trabalho pelo Randmat, é intimamente influenciada pela presença de antioxidante que, por sua vez, sofre a ação de elevadas temperaturas.

O Anexo B apresenta a análise de variância para a estabilidade oxidativa. Como observado, o teste F foi significativo ($P < 0,01$) para os efeitos principais e para a interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento. Procedeu-se, então, ao desdobramento dessa interação cujos resultados encontram-se na Tabela 13.

Barrera-Arelano et al. (2002), ao avaliarem a perda de tocoferóis e a formação de compostos de degradação em óleo de soja submetido a aquecimento sob condições de fritura, encontraram, inicialmente, maior valor para a estabilidade oxidativa do óleo purificado (1,60 hora) em comparação com o presente estudo (0,48 hora), e valor semelhante para o óleo purificado com adição de tocoferol (7,80 e 7,21 horas), embora tenham adicionado 500 mg/kg de α -tocoferol e, neste estudo, a adição foi de 600 mg/kg.

Tabela 13 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados da estabilidade oxidativa (horas).

Antioxidantes	Tempos de Aquecimento (horas)				
	0	2,5	5	7,5	10
OP	0,48 ^{cd}	1,29 ^{cd}	0,93 ^{bc}	0,66 ^{bc}	0,60 ^{cc}
OP + ALE	5,85 ^{ac}	1,62 ^{bc}	0,60 ^{cd}	0,39 ^{cc}	0,41 ^{cc}
OP + TOC	7,21 ^{ab}	7,14 ^{ab}	6,64 ^{bb}	6,12 ^{cb}	5,72 ^{db}
OP + M	12,08 ^{aA}	10,55 ^{bA}	9,60 ^{cA}	8,59 ^{dA}	7,74 ^{eA}

(OP) – óleo de soja purificado, (OP + ALE) – OP + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim, (OP + TOC) – OP + 600 mg/kg de α -tocoferol, (OP + M) – OP + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim + 600 mg/kg de α -tocoferol.

a, b ... (linha) - em cada Antioxidante, médias de Tempos de Aquecimento seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).
 A, B ... (coluna) - em cada Tempo de Aquecimento, médias de Antioxidantes seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Observa-se, na Tabela 13, que o óleo purificado, que inicialmente já apresentava uma estabilidade oxidativa bastante reduzida devido a remoção dos antioxidantes naturais, apresentou um comportamento instável ao longo dos tempos de aquecimento. Isso pode ser justificado pela falta de precisão do aparelho para tempos de indução muito curtos. Reynhout (1991) também considerou períodos de indução menores que 0,5 hora fora do limite de capacidade do Rancimat, nesse caso, existe uma recomendação do fabricante de realizar-se a análise a 80°C, mas isso dificultaria a comparação dos resultados.

Para o óleo com alecrim, houve diferença significativa nos tempos 0, 2,5 e 5 horas, tendo a estabilidade oxidativa atingido valor bastante reduzido já no tempo de aquecimento de 5 horas, não diferindo significativamente dos valores encontrados a partir daí.

Verifica-se então, que, pelo valor da estabilidade oxidativa, o extrato de alearim aplicado de forma isolada teve sua eficiência diminuída ao longo do período de aquecimento, não apresentando mais ação antioxidante após ter sido submetido a 5 horas de aquecimento a 180°C. Esse resultado está de acordo com o estudo realizado por Schwarz; Ternes; Schmauderer (1992), em que os diterpenos fenólicos não foram mais detectados depois que o óleo de amendoim e a banha, adicionados de 300 mg/kg de extrato de alearim, foram aquecidos por 5 horas, em condições de fritura. Para esses autores, a rápida redução da quantidade dos diterpenos fenólicos observada durante a fritura em imersão restringiria o uso do extrato para aplicações com alta taxa de reposição, uma adição regular de óleo fresco, nesses casos, garantiria a adição dos antioxidantes. O efeito de estabilização foi mais pronunciado no produto frito do que no óleo de fritura.

Para o óleo com tocoferol, observa-se que os valores da estabilidade oxidativa nos tempos de aquecimento 0 e 2,5 horas não diferiram significativamente entre si e diferiram significativamente dos demais tempos estudados. Observa-se, ainda, que houve uma redução na estabilidade à medida que o tempo de aquecimento foi aumentando, embora não tenha sido tão drástica quanto a sofrida pelo óleo com alearim, já que, após 10 horas de aquecimento, o óleo com tocoferol ainda conservou 79% da estabilidade inicial.

Quanto ao óleo com a mistura dos antioxidantes, houve diferença significativa em todos os tempos com redução gradual dos

valores da estabilidade oxidativa do início ao fim do aquecimento; observa-se a manutenção de 64% da estabilidade inicial após 10 horas de aquecimento.

Para os antioxidantes dentro de cada tempo de aquecimento, observa-se, pela Tabela 13, que os valores da estabilidade oxidativa do óleo com a mistura de antioxidantes diferiram significativamente dos demais em todos os tempos, promovendo a mistura de antioxidantes maior estabilidade ao óleo em todos os tempos de aquecimento, seguida pelo tocoferol, cujos valores da estabilidade oxidativa do óleo também diferiram significativamente dos demais. O óleo com alecrim apresentou valores de estabilidade bem menores; no entanto, demonstrou a ação antioxidante do alecrim quando comparado com o óleo purificado até o tempo de 2,5 horas, uma vez que houve diferença significativa nos valores da estabilidade oxidativa entre esses dois óleos do início até o tempo mencionado, com maiores valores para o óleo com alecrim.

De qualquer forma, no presente estudo, a capacidade do alecrim e do α -tocoferol em aumentar a estabilidade oxidativa do óleo de soja foi maior quando os antioxidantes foram aplicados juntos em comparação com a aplicação de cada antioxidante separadamente.

5.4.2 Compostos polares totais

A fração apolar de óleos e gorduras deteriorados consiste de todos os triacilgliceróis inalterados. Uma quantidade muito pequena de

trímeros e dímeros apolares também faz parte desta fração. Todos os produtos de degradação são denominados coletivamente fração polar, ou compostos polares totais. A fração polar é, de maneira ampla, agrupada em polímeros e produtos de decomposição. Os polímeros se referem ao grupo de todos os produtos de degradação com peso molecular superior ao do triacilglicerol (material altamente polimerizado, trímeros e dímeros). Produtos de decomposição referem-se ao grupo com peso molecular inferior ao dos triacilgliceróis (diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, monômeros ácidos, monômeros adídicos e compostos voláteis) (PAUL; MITTAL, 1997; STEEL, 2002).

A fração polar inclui todos os produtos de alteração e, como consequência, quanto maior a fração polar, pior a qualidade do óleo de fritura (STEEL, 2002).

O Anexo B apresenta a análise de variância para a determinação de compostos polares totais, utilizando os valores obtidos ao longo do período experimental. Observa-se que o teste F foi significativo ($P < 0,01$) para os efeitos principais e para a interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 14.

Em relação aos tempos de aquecimento para cada antioxidante, verifica-se, pela Tabela 14, que os valores de compostos polares totais do óleo purificado e do mesmo óleo com alearim aumentaram de forma gradual ao longo do período em estudo, havendo

diferença significativa em todos os tempos de aquecimento. Para os óleos com tocoferol e com a mistura de antioxidantes, não houve diferença significativa entre os valores de compostos polares nos tempos de aquecimento 0 e 2,5 horas, demonstrando a eficiente ação protetora dos antioxidantes nesse período. Nos demais tempos subsequentes, houve diferença significativa, com aumento gradativo nos valores de compostos polares totais até o final do experimento.

Tabela 14 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados de compostos polares totais (%).

Antioxidantes	Tempos de Aquecimento (horas)				
	0	2,5	5	7,5	10
OP	0,12 ^{eB}	4,73 ^{dA}	8,73 ^{cA}	12,18 ^{bA}	17,13 ^{aA}
OP + ALE	0,13 ^{eB}	3,53 ^{dB}	7,26 ^{cB}	11,86 ^{bA}	15,73 ^{aB}
OP + TOC	2,48 ^{dA}	2,62 ^{dC}	4,22 ^{cC}	5,67 ^{bB}	7,34 ^{aC}
OP + M	2,40 ^{dA}	2,49 ^{dC}	3,27 ^{dD}	4,67 ^{bC}	6,44 ^{aD}

(OP) – óleo de soja purificado, (OP + ALE) – OP + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim, (OP + TOC) – OP + 600 mg/kg de α -tocoferol, (OP + M) – OP + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim + 600 mg/kg de α -tocoferol.

a, b ... (linha) - em cada Antioxidante, médias de Tempos de Aquecimento seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).
 A, B ... (coluna) - em cada Tempo de Aquecimento, médias de Antioxidantes seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

Quanto aos antioxidantes dentro de cada tempo de aquecimento, verifica-se, pela Tabela 14, que os valores de compostos polares totais dos óleos com a mistura de antioxidantes e com tocoferol diferiram significativamente dos valores dos demais tratamentos em todos os tempos e não diferiram significativamente entre si nos tempos 0 e 2,5

horas, diferindo significativamente nos demais tempos estudados. Nota-se, ainda, que a mistura de antioxidantes proporcionou ao óleo menor formação de compostos polares nos tempos de aquecimento de 2,5 a 10 horas, seguida pelo tocoferol.

O óleo com alearim apresentou maiores valores de compostos polares totais quando comparado aos óleos com tocoferol e com a mistura de antioxidantes nos tempos de aquecimento de 2,5 a 10 horas. No entanto demonstrou um efeito protetor do alearim, com relação à formação desses compostos, quando comparado com o óleo purificado nos tempos 2,5; 5 e 10 horas, visto que houve diferença significativa nos valores de compostos polares entre esses dois óleos nesses tempos com menores valores para o óleo com o antioxidante.

Todos os antioxidantes testados retardaram a formação de compostos polares, embora com diferente grau de eficiência. Após 10 horas de aquecimento, o alearim reduziu em 8% a formação de polares, o α -tocoferol reduziu em 57% e a mistura dos antioxidantes reduziu em 62%, demonstrando novamente a maior eficiência dos antioxidantes quando aplicados juntos em comparação com a aplicação isolada de cada um. A grande diferença no teor de compostos polares entre o óleo purificado e o mesmo óleo com tocoferol sugere que a ação antioxidante do α -tocoferol em alta temperatura não pode ser subestimada.

Os resultados de compostos polares totais do óleo purificado e do mesmo óleo adicionado de α -tocoferol, após 10 horas de aquecimento, não confirmaram os valores encontrados por Barrera-Arellano et al.

(2002) em um estudo para verificar a perda de tocoferóis e a formação de compostos de degradação em óleos submetidos a aquecimento a 180°C. Naquele trabalho, os pesquisadores encontraram 26,5 e 23,1% de compostos polares totais para o óleo de soja purificado e para o mesmo óleo adicionado de 500 mg/kg de α -tocoferol, respectivamente.

Segundo Romero et al. (2004), a capacidade antioxidante de um composto em diferentes sistemas testados pode também ser avaliada através do Fator de Proteção (FP), que é definido como segue:

$$FP = \frac{(CP_{\text{controle}} - CP_{\text{amostra}})}{CP_{\text{controle}}}$$

Onde:

CP_{controle} = valor dos compostos polares do óleo analisado em determinado tempo de aquecimento;

CP_{amostra} = valor dos compostos polares formados nas amostras do mesmo óleo acrescido de antioxidante no mesmo tempo.

O FP para cada antioxidante em cada tempo é mostrado na Tabela 15. Como pode ser observado, o alearim, quando aplicado isoladamente, além de apresentar menor efeito protetor, apresentou uma sensível redução desse efeito ao longo dos tempos de aquecimento, não apresentando mais efeito antioxidante por meio da análise do Fator de Proteção no tempo de 7,5 horas de aquecimento.

O α -tocoferol, baseado na formação de compostos polares, apresentou um Fator de Proteção praticamente constante durante todo o

tempo de aquecimento, tendo um valor, em média, 10% mais alto quando utilizado junto com o alearim.

Tabela 15 – Fator de Proteção dos antioxidantes testados em óleo de soja purificado com base na formação de compostos polares.

Antioxidantes	Tempos de Aquecimento (horas)			
	2,5	5	7,5	10
ALE	0,25	0,17	0,03	0,08
TOC	0,45	0,52	0,53	0,57
ALE + TOC	0,47	0,63	0,62	0,62

ALE – 1.000 mg/kg de extrato de alearim, TOC – 600 mg/kg de α -tocoferol, (ALE + TOC) – 1.000 mg/kg de extrato de alearim + 600 mg/kg de α -tocoferol.

5.4.3 Índice de peróxidos

O índice de peróxidos representa a diferença entre a formação e a decomposição de peróxidos, produtos primários de oxidação, incolores e inodoros.

Os peróxidos são intermediários instáveis, sobretudo a temperaturas elevadas (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Com base nesse fato, outros autores (CUESTA et al., 1991; LIMA; GONÇALVES, 1994; MASSON et al., 1997) afirmam que há uma limitação na metodologia para determinação de peróxidos, esclarecendo que essas substâncias que vão sendo formadas durante o processo de fritura aumentam seu peso molecular até que a estrutura se fracione em

moléculas menores, que, mesmo presentes no óleo, nem sempre são detectadas pela análise. Segundo os mesmos autores, esse fato ocorre, principalmente, em tempos de aquecimento mais elevados, fazendo com que este índice não seja um bom indicador do estado de alteração do óleo, pois a velocidade de degradação é maior que a velocidade de formação de peróxidos. Portanto, as concentrações de produtos de oxidação, expressos em índice de peróxidos, podem não indicar a extensão atual da deterioração do óleo (YAGHMUR et al., 2001).

Contudo, segundo Monferrer e Villalta (1993a), o índice de peróxidos pode ser um indicativo de descarte para o óleo de girassol quando atinge valores acima de 15 meq/kg.

O Anexo B apresenta a análise de variância para a determinação do índice de peróxidos. Como observado, o teste F foi significativo ($P < 0,01$) para os efeitos principais e para a interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento. Então, procedeu-se ao desdobramento dessa interação e o resultado é mostrado na Tabela 16.

Observa-se, na Tabela 16, que, para o óleo purificado, houve diferença significativa entre os valores do índice de peróxidos do início até 7,5 horas de aquecimento, aumentando drasticamente já nas primeiras horas do experimento. Esse fato evidencia a importância dos antioxidantes naturais removidos na proteção do óleo com relação à formação dos compostos primários de oxidação. Não houve diferença significativa entre os valores de peróxidos para esse óleo nos dois últimos tempos de aquecimento, provavelmente, porque após 7,5 horas a

velocidade de degradação desses compostos seja tão alta quanto a de formação; peróxidos em condições de alta temperatura, ar e luz são instáveis e podem ser transformados em produtos secundários de oxidação.

Tabela 16 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados do índice de peróxidos (meq/kg).

Antioxidantes	Tempos de Aquecimento (horas)				
	0	2,5	5	7,5	10
OP	1,29 ^{dA}	14,36 ^{cA}	19,02 ^{bA}	23,40 ^{aA}	24,78 ^{aA}
OP + ALE	1,31 ^{dA}	2,74 ^{dB}	4,41 ^{CB}	7,02 ^{bB}	9,27 ^{aB}
OP + TOC	1,65 ^{aA}	1,86 ^{aB}	2,08 ^{aC}	2,23 ^{aC}	2,33 ^{aC}
OP + M	1,58 ^{aA}	1,46 ^{aB}	1,53 ^{aC}	1,58 ^{aC}	1,63 ^{aC}

(OP) – óleo de soja purificado, (OP + ALE) – OP + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim, (OP + TOC) – OP + 600 mg/kg de α -tocoferol, (OP + M) – OP + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim + 600 mg/kg de α -tocoferol.

a, b ... (linha) - em cada Antioxidante, médias de Tempos de Aquecimento seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

A, B ... (coluna) - em cada Tempo de Aquecimento, médias de Antioxidantes seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Com relação ao óleo com alecrim, não se observou diferença significativa entre os valores de peróxidos nos tempos 0 e 2,5 horas. A diferença começou a ser detectada estatisticamente a partir de 2,5 horas, com aumento gradual do valor ao longo dos demais tempos de aquecimento.

Para os óleos com tocoferol e com a mistura de antioxidantes, não houve diferença significativa entre os valores de peróxidos em todos os tempos de aquecimento, evidenciando a eficiência do tocoferol e da

mistura de tocoferol mais alearim na proteção do óleo com relação à formação dos compostos primários da oxidação durante 10 horas de aquecimento a 180°C.

Em pesquisa realizada por Wada e Fang (1992), tanto α -tocoferol quanto o extrato de alearim, aplicados em óleo de peixe nas concentrações de 500 e 200 mg/kg, respectivamente, reduziram a formação de peróxidos após armazenamento a 30°C por um período de 5 a 15 dias.

Em relação aos antioxidantes dentro de cada tempo de aquecimento, verifica-se, pela análise da Tabela 16, que todos os antioxidantes utilizados apresentaram um efeito protetor com relação à formação de peróxidos durante o aquecimento, já que o índice de peróxidos do óleo purificado diferiu significativamente de todos os outros tratamentos, apresentando maior valor de 2,5 horas até o final do aquecimento.

Observa-se que até 2,5 horas de aquecimento não houve diferença significativa entre os valores de peróxidos dos três óleos com antioxidantes, constatando-se que tanto o alearim quanto o tocoferol e a mistura de ambos proporcionaram semelhante ação protetora ao óleo até esse tempo.

Verifica-se ainda, pela Tabela 16, que, no tempo de aquecimento de 5 horas e nos demais tempos subseqüentes, os valores de peróxidos do óleo com alearim diferiram significativamente dos demais, apresentando maiores valores que os dos outros dois óleos com

antioxidantes. Entretanto, os valores de peróxidos do óleo com alecrim foram inferiores ao do óleo purificado, revelando que o alecrim possui capacidade de inibir o processo oxidativo, embora em proporções inferiores ao α -tocoferol e à mistura tocoferol mais alecrim, durante todo o aquecimento, com 63% de redução de peróxidos após 10 horas de aquecimento.

Apesar de ter havido menor formação de peróxidos no óleo com a mistura de antioxidantes do que no óleo com tocoferol, não houve diferença significativa entre os valores de peróxidos desses dois tratamentos em todos os tempos de aquecimento. Tanto a mistura dos antioxidantes quanto o tocoferol foram altamente eficientes na proteção do óleo purificado com relação à formação de compostos primários de oxidação; tocoferol reduziu em 91%, e a mistura tocoferol mais alecrim reduziu em 93% a formação de peróxidos do óleo purificado após 10 horas de aquecimento a 180°C, indicando boa capacidade em inibir o processo oxidativo.

Resultado inverso foi apresentado em estudo realizado por Banias; Oreopoulou; Thomopoulos, (1992), em que 1.000 mg/kg de extrato de alecrim e 200 mg/kg de α -tocoferol aplicados em banha reduziram a formação de peróxidos na ordem de 94 e 45%, respectivamente, após 6 dias em estufa a 75°C. Quando os dois antioxidantes foram aplicados juntos, a redução de peróxidos foi de 83%.

Amostras de óleo de soja contendo 100 mg/kg de extrato de alecrim, mantidas a 30°C por quatro dias, também apresentaram redução,

nesse caso de 45% , na formação de peróxidos, quando comparadas com um controle (BASAGA; ACIKEL; TEKKAYA, 1997). Em condições de fritura, o extrato de alecrim aplicado na concentração de 4.000 mg/kg também reduziu a formação de peróxidos da oleína de palma; após 60 operações de fritura a 180°C, os valores de peróxidos foram 11,5 e 7,2 meq/kg para o controle e para o óleo acrescido de antioxidante, respectivamente, com redução de 37% . Em outro estudo, também envolvendo oleína de palma aquecida em condições de fritura, 200 mg/kg de extrato de alecrim reduziram a formação de peróxidos em 44% após 70 operações de fritura realizadas em 10 dias (CHE-MAN; TAN, 1999).

5.4.4 Dienos conjugados

De acordo com Silva; Borges; Ferreira (1999), a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados ocorre com a formação de hidroperóxidos e deslocamento das duplas ligações, com conseqüente formação de dienos conjugados, compostos que apresentam intensa absorção em 232 nm.

O acompanhamento dos espectros de absorção na faixa do ultravioleta das amostras de óleo fornece uma boa indicação das alterações que ocorrem durante o processo oxidativo, visto que o índice de peróxidos não reflete o aumento de degradação do óleo com o tempo de fritura. Por serem instáveis, os peróxidos são rapidamente formados e quebrados em compostos menores, porém, os dienos conjugados que se

formam concomitantemente permanecem no óleo de fritura (CELLA; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2002).

O Anexo B apresenta a análise de variância para a determinação de dienos conjugados. Como observado, o teste F foi significativo ($P < 0,01$) para os efeitos principais e para a interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento. Então, tornou-se necessário o desdobramento dessa interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 17.

Tabela 17 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados de dienos conjugados (%).

Antioxidantes	Tempos de Aquecimento (horas)				
	0	2,5	5	7,5	10
OP	0,23 ^{eA}	0,63 ^{dA}	1,01 ^{cA}	1,32 ^{bA}	1,74 ^{aA}
OP + ALE	0,22 ^{eA}	0,54 ^{dB}	0,84 ^{cB}	1,26 ^{bB}	1,51 ^{aB}
OP + TOC	0,22 ^{eA}	0,46 ^{dC}	0,63 ^{cC}	0,76 ^{bC}	0,97 ^{aC}
OP + M	0,22 ^{eA}	0,41 ^{dD}	0,56 ^{cD}	0,68 ^{bD}	0,82 ^{aD}

(OP) – óleo de soja purificado, (OP + ALE) – OP + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim, (OP + TOC) – OP + 600 mg/kg de α -tocoferol, (OP + M) – OP + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim + 600 mg/kg de α -tocoferol.

a, b ... (linha) - em cada Antioxidante, médias de Tempos de Aquecimento seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

A, B ... (coluna) - em cada Tempo de Aquecimento, médias de Antioxidantes seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Como pode ser observado na referida Tabela, em relação aos tempos de aquecimento para cada antioxidante, verifica-se que os valores de dienos conjugados diferiram significativamente em todos os tempos para todos os tratamentos, apresentando um aumento do valor, de forma

continuada, do início ao final do aquecimento tanto para o óleo purificado quanto para todos os antioxidantes testados.

Em relação aos antioxidantes em cada tempo de aquecimento, nota-se que, inicialmente, não houve diferença significativa entre os valores dos dienos em todos os tratamentos, mas, depois de iniciado o aquecimento, a porcentagem de dienos conjugados diferiu significativamente em todos os óleos, acrescidos ou não de antioxidantes, e em todos os tempos. A maior formação de dienos no óleo purificado indica formação de compostos primários de oxidação lipídica mais acentuada nesse óleo do que nos demais tratamentos.

Pela análise de dienos, o alecrim demonstrou efeito antioxidante durante todo o aquecimento, embora tenha apresentado o menor nível de proteção, com 13% de redução da formação de dienos após 10 horas de aquecimento, seguido pelo tocoferol, que apresentou uma redução bem maior, 44%.

A aplicação da mistura de tocoferol e alecrim foi a mais efetiva entre os antioxidantes testados na proteção do óleo de soja purificado aquecido a 180°C com relação à formação de dienos conjugados, com 53% de redução na formação desses compostos após o tempo mencionado.

Extratos de alecrim que continham 17,5 e 22,5% de diterpenos fenólicos, quando aplicados em banha na concentração de 300 mg/kg, mantiveram 8 e 24%, respectivamente, da quantidade de diterpenos adicionada, após aquecimento a 170°C por 10 horas

(SCHWARZ; TERNES; SCHMAUDERER, 1992). As análises de peróxidos e dienos (compostos primários de oxidação) do presente trabalho também indicam a manutenção de alguma concentração desses compostos até o final do aquecimento ou a degradação em outros compostos que apresentem alguma atividade antioxidante, embora a estabilidade pelo Rancimat não confirme esse indício.

5.5 Ensaio III – Termoxidação do óleo natural

No ensaio anterior, foi analisado o efeito antioxidante do extrato de alecrim e do α -tocoferol adicionados sem a interferência de compostos minoritários normalmente presentes no óleo, os quais podem apresentar efeitos antioxidantes ou pró-oxidantes. Esse estudo realizado com óleo purificado em ausência de alimentos permitiu a obtenção de dados sobre a ação das variáveis na termoxidação do óleo analisado.

Na terceira etapa deste trabalho, buscou-se verificar o comportamento dos tocoferóis naturalmente presentes no óleo de soja frente a adição do extrato de alecrim, bem como avaliar a influência dos demais compostos minoritários na oxidação do óleo de soja submetido ao aquecimento em alta temperatura. A comparação do óleo purificado com o óleo natural, submetidos à termoxidação, acrescenta dados que podem levar a uma melhor conclusão neste estudo.

Com esse intuito, foi realizada a termoxidação do óleo de soja purificado (OP), do óleo de soja natural (ON), e do óleo de soja natural com adição de 1.000 mg/kg de extrato de alecrim (ON + ALE).

A evolução da oxidação foi avaliada por meio das determinações da estabilidade oxidativa, compostos polares totais e dienos conjugados.

5.5.1 Estabilidade oxidativa

O Anexo C apresenta a análise de variância para a estabilidade oxidativa. Como observado, o teste F foi significativo ($P < 0,01$) para os efeitos principais e para a interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento, sendo, então, necessário proceder ao desdobramento dessa interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 18.

Tabela 18 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados da estabilidade oxidativa (horas).

Antioxidantes	Tempos de Aquecimento (horas)				
	0	2,5	5	7,5	10
OP	0,48 ^{aC}	1,29 ^{aC}	0,93 ^{aC}	0,66 ^{aC}	0,60 ^{aC}
ON	17,08 ^{aB}	10,46 ^{bB}	9,86 ^{bB}	8,56 ^{bB}	7,52 ^{bB}
ON + ALE	23,68 ^{aA}	15,80 ^{bA}	14,68 ^{bcA}	14,47 ^{cA}	13,50 ^{cA}

(OP) – óleo de soja purificado, (ON) – Óleo de soja natural, (ON + ALE) – Óleo de soja natural + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim.

a, b ... (linha) - em cada Antioxidante, médias de Tempos de Aquecimento seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

A, B, C (coluna) - em cada Tempo de Aquecimento, médias de Antioxidantes seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Em relação aos tempos de aquecimento para cada antioxidante, verifica-se, na Tabela 18, que o valor da estabilidade oxidativa do óleo purificado, que já se apresentava bastante reduzido no início, próximo a zero, não apresentou diferença significativa em todos os tempos de aquecimento. Esse resultado indica a eficiência da purificação com alumina para remoção dos antioxidantes naturais; o óleo purificado não apresentava praticamente nenhuma resistência à oxidação desde o início do aquecimento.

Tanto o óleo natural quanto o óleo natural com alearim apresentaram diferença significativa entre os valores da estabilidade oxidativa nos tempos de aquecimento 0 e 2,5 horas, sofrendo ambos uma marcante redução no valor da estabilidade nesse segundo tempo, 39% para o óleo natural e 33% para o óleo natural com alearim. Embora os valores da estabilidade oxidativa dos referidos óleos também tenham diminuído ao longo dos demais tempos estudados, essa redução foi bem menos drástica, não havendo, para o óleo natural, diferença significativa entre os valores nos tempos de aquecimento 2,5 e 5 horas, bem como nos de 7,5 e 10 horas.

Para o óleo natural acrescido de alearim, observa-se que não houve diferença significativa entre os valores da estabilidade oxidativa nos tempos de aquecimento 2,5 e 5 horas, bem como nos de 5; 7,5 e 10 horas. Ao final de 10 horas de aquecimento, o óleo natural e o mesmo óleo adicionado de alearim mantiveram, respectivamente, 44 e 57% do valor de suas estabilidades iniciais.

Quanto aos antioxidantes dentro de cada tempo, nota-se que houve diferença significativa entre os valores da estabilidade oxidativa nos três tratamentos em todos os tempos de aquecimento.

Observa-se a presença dos antioxidantes naturais no óleo natural quando sua estabilidade é comparada com a do óleo purificado, e verifica-se a ação antioxidante do alecrim adicionado em óleo de soja natural pelo aumento da estabilidade desse óleo em todos os tempos de aquecimento. O alecrim aumentou a estabilidade inicial do óleo de soja em 39% e, ao final de 10 horas de aquecimento a 180°C, a diferença foi ainda mais expressiva; o alecrim também aumentou em 80% o valor da estabilidade do óleo natural aquecido sob as mesmas condições.

Lalas e Dourtoglou (2003) também verificaram aumento na estabilidade oxidativa do óleo de soja ao acrescentar 400 mg/kg de extrato de alecrim, embora tenham utilizado Randimat a 90°C, dificultando, dessa forma, uma comparação mais efetiva dos resultados.

5.5.2 Compostos polares totais

O Anexo C apresenta a análise de variância para determinação de compostos polares totais. Como observado, o teste F foi significativo ($P < 0,01$) para os efeitos principais e para a interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento. Procedeu-se, então, ao desdobramento dessa interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados de compostos polares totais (%).

Antioxidantes	Tempos de Aquecimento (horas)				
	0	2,5	5	7,5	10
OP	0,12 ^{eB}	4,73 ^{dB}	8,73 ^{cA}	12,18 ^{bA}	17,13 ^{aA}
ON	1,98 ^{eA}	6,28 ^{dA}	9,23 ^{cA}	11,19 ^{bB}	17,35 ^{aA}
ON + ALE	1,71 ^{eA}	4,46 ^{dB}	5,49 ^{cB}	6,87 ^{bC}	7,99 ^{cB}

(OP) – óleo de soja purificado, (ON) – Óleo de soja natural, (ON + ALE) – Óleo de soja natural + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim.

a, b ... (linha) - em cada Antioxidante, médias de Tempos de Aquecimento seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

A, B, C (coluna) - em cada Tempo de Aquecimento, médias de Antioxidantes seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

Em relação aos tempos de aquecimento para cada antioxidante, verifica-se, pela Tabela 19, que houve diferença significativa entre os valores de compostos polares totais em todos os tempos de aquecimento para cada um dos tratamentos, havendo aumento no valor encontrado ao longo dos tempos de aquecimento para os três tratamentos testados, embora de forma mais branda para o óleo com alecrim.

Observando-se os antioxidantes em cada tempo de aquecimento, verifica-se que houve diferença significativa entre os valores de compostos polares totais dos óleos purificado e natural nos tempos de aquecimento 0; 2,5 horas, com o óleo purificado apresentando menor valor; e 7,5 horas, com menor valor para o óleo natural. Não houve diferença significativa entre os valores de compostos polares dos dois referidos óleos nos demais tempos estudados. Esse resultado, principalmente no final do aquecimento, foi inesperado, já que a remoção

dos antioxidantes naturais deveria tornar o óleo purificado mais suscetível à degradação térmica que o óleo natural. O fato de o óleo natural apresentar valores de compostos polares totais próximos aos do óleo purificado aponta para uma provável presença de compostos minoritários no óleo natural com ação pró-oxidante que podem ter sido removidos no processo de purificação.

Resultados semelhantes aos do presente trabalho, para o óleo natural nos tempos intermediários, foram encontrados por Cruzian; Inhamuns; Barrera-Arellano (1997), em um estudo que comparou a determinação de compostos polares de óleo de soja refinado por dois diferentes métodos: o oficial, utilizando cromatografia em coluna clássica com sílica e por cromatografia em camada delgada e detecção por ionização em chama. Os pesquisadores encontraram 9,39; 10,40; e 11,80% de compostos polares para o óleo de soja aquecido a 180°C por 4, 6 e 8 horas, respectivamente, todavia, após 10 horas de aquecimento, o valor encontrado foi bastante inferior ao do presente trabalho, 12,95% .

Por outro lado, em estudo para verificar a perda de tocoferóis e a formação de compostos de degradação em óleos vegetais aquecidos a 180°C, Barrera-Arellano et al. (2002) encontraram formação de 18,60% de compostos polares para o óleo de soja natural após 10 horas de aquecimento; o resultado foi, portanto, próximo ao do presente estudo.

Com relação ao óleo natural adicionado de alearim, verifica-se, pela Tabela 19, que os valores de compostos polares totais desse óleo diferiram dos demais no tempo de aquecimento de 5 horas e demais

tempos subseqüentes, apresentando, após o início do aquecimento, sempre menores valores, o que evidencia, novamente, o efeito antioxidante do alecrim na proteção do óleo de soja no que se refere à formação de compostos polares mesmo em alta temperatura. Após 10 horas de aquecimento a 180°C, o alecrim reduziu em 54% a formação de compostos polares totais do óleo de soja natural.

O extrato de alecrim adicionado na concentração de 1.000 mg/kg, também reduziu, embora em menor proporção, a formação de compostos polares do óleo de canola submetido a aquecimento a 180°C sob condições de fritura; houve redução de 7% quando comparado com um controle após 12 operações de fritura de batatas por 5 minutos (ZANDI; GORDON, 1999).

5.5.3 Dienos conjugados

O Anexo C apresenta a análise de variância para a determinação de dienos conjugados. Como observado, o teste F foi significativo ($P < 0,01$) para os efeitos principais e para a interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento, sendo, então, necessário proceder ao desdobramento dessa interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 20.

Em relação aos tempos de aquecimento para cada antioxidante, observa-se, na Tabela 20, o mesmo comportamento descrito anteriormente para os compostos polares, ou seja, aumento no teor de

dienos conjugados, havendo diferença significativa entre os teores desses compostos em todos os tempos de aquecimento para cada um dos tratamentos.

Tabela 20 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados de dienos conjugados (%).

Antioxidantes	Tempos de Aquecimento (horas)				
	0	2,5	5	7,5	10
OP	0,23 ^{eA}	0,63 ^{dB}	1,01 ^{cA}	1,32 ^{bA}	1,74 ^{aA}
ON	0,26 ^{eA}	0,68 ^{dA}	0,90 ^{cB}	1,03 ^{bB}	1,61 ^{aB}
ON + ALE	0,26 ^{eA}	0,47 ^{dC}	0,59 ^{cC}	0,70 ^{bC}	0,80 ^{aC}

(OP) – óleo de soja purificado, (ON) – óleo de soja natural, (ON + ALE) – óleo de soja natural + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim.

a, b ... (linha) - em cada Antioxidante, médias de Tempos de Aquecimento seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

A, B, C (coluna) - em cada Tempo de Aquecimento, médias de Antioxidantes seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey (P > 0,05).

Em relação aos antioxidantes em cada tempo de aquecimento, verifica-se que, apesar de no tempo 0 não haver diferença significativa entre os valores dos dienos conjugados dos três óleos, acrescidos ou não de antioxidantes, houve diferença significativa entre os valores dos três óleos em todos os demais tempos estudados.

Comparando-se a formação de dienos conjugados do óleo natural com o óleo purificado, verifica-se que, no tempo de aquecimento de 2,5 horas, o óleo natural apresentou maior valor, mas, nos demais tempos subseqüentes, o óleo purificado apresentou maiores teores de dienos conjugados.

Observa-se também, pela Tabela 20, menor valor de dienos para o óleo natural adicionado de alecrim ao longo de todos os tempos de aquecimento após o tempo 0. Esse fato evidencia, mais uma vez, a característica antioxidante do alecrim, quando aplicado em óleo de soja, inclusive em temperaturas elevadas.

Em pesquisa realizada por Frankel et al. (1996b) para avaliar a atividade antioxidante do extrato de alecrim em vários tipos de óleos, um extrato de alecrim contendo 44 mg/kg de ácido carnósico e 6 mg/kg de carnosol, adicionado na concentração de 1.000 mg/kg em óleo de soja, também inibiu a formação de dienos, com redução de 70,53% quando comparado com um controle. Nesse caso, o processo de oxidação foi acelerado em estufa a 60°C por 20 dias.

No presente trabalho, o extrato de alecrim reduziu em 50% a formação de dienos em óleo de soja após aquecimento por 10 horas a 180°C.

5.6 Tocoferóis – retenção em condições de termoxidação

Considerando ser universalmente aceito que, dentre os homólogos de vitamina E, o α -tocoferol é o mais eficiente antioxidante *in vivo* (KAMAL-ELDIN; APPELQVIST, 1996), sendo também aplicado como um meio para inibir a oxidação de óleos e gorduras comestíveis, torna-se importante estudar a perda de α -tocoferol e seu relacionamento com a deterioração do óleo durante o aquecimento em alta temperatura, bem

como investigar a influência de outras substâncias, no caso o alecrim, na resistência do α -tocoferol.

Para avaliar o efeito dos fatores Antioxidantes e Tempos de Aquecimento, sobre os teores de α -tocoferol, foram realizados os cálculos da análise de variância (Anexo D). Como observado, o teste F foi significativo ($P < 0,01$) para os efeitos principais e para a interação Antioxidantes X Tempos de Aquecimento sendo, então, necessário proceder ao desdobramento dessa interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 21.

Tabela 21 – Desdobramento da interação Antioxidantes x Tempos de Aquecimento para os dados de teores de α -tocoferol (mg/kg).

Antioxidantes	Tempos de Aquecimento (horas)		
	0	5	10
OP + TOC	646 ^{aA}	569 ^{bA}	436 ^{cB}
OP + M	645 ^{aA}	588 ^{abA}	558 ^{bA}
ON	139 ^{ab}	126 ^{ab}	97 ^{aC}
ON + ALE	144 ^{ab}	137 ^{ab}	137 ^{aC}

(OP + TOC) – óleo de soja purificado + 600 mg/kg de α -tocoferol, (OP + M) – óleo de soja purificado + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim + 600 mg/kg de α -tocoferol, (ON) – óleo de soja natural, (ON + ALE) – óleo de soja natural + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim.

a, b ... (linha) - em cada Antioxidante, médias de Tempos de Aquecimento seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

A, B ... (coluna) - em cada Tempo de Aquecimento, médias de Antioxidantes seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Pela análise dos teores de tocoferóis no tempo 0, verifica-se que, para os óleos natural e natural adicionado de alecrim, os teores de α -tocoferol de 139 e 144 mg/kg, respectivamente, estão dentro da faixa de

variação de 9 a 352 mg/kg estabelecida pela AOCS (1996) para o óleo de soja.

A quantidade de α -tocoferol presente em óleo refinado é influenciada pelas condições de processamento. Os valores encontrados no presente estudo são similares aos apresentados por Barrera-Arellano et al. (2002) que, ao analisarem o teor e a composição de tocoferóis do óleo de soja refinado, encontraram 149 mg/kg de α -tocoferol. Por outro lado, Steel (2002), ao analisar o teor de α -tocoferol do mesmo tipo de óleo, encontrou valor mais alto, 207 mg/kg.

Em relação aos tempos de aquecimento para cada antioxidante, verifica-se, pela Tabela 21, que os valores de α -tocoferol do óleo purificado adicionado desse antioxidante diminuíram ao longo dos tempos de aquecimento, havendo diferença significativa nos três tempos estudados.

No caso do óleo purificado adicionado da mistura de antioxidantes, também houve redução dos valores de α -tocoferol com o aquecimento, embora em menor intensidade, havendo diferença significativa entre os valores encontrados nos tempos 0 e 10 horas de aquecimento.

Para os óleos natural e natural adicionado de alecrim, embora tenha havido redução do teor de α -tocoferol, não houve diferença significativa entre os valores desse antioxidante ao longo dos tempos de aquecimento.

Quanto aos antioxidantes dentro de cada tempo de aquecimento, verifica-se, pela Tabela 21, que no tempo 0 não houve diferença significativa entre os valores de α -tocoferol nos dois tratamentos com óleo purificado e nos dois tratamentos com óleo natural, havendo diferença significativa entre os valores do antioxidante nos tratamentos com óleo purificado e com óleo natural. Esse resultado era esperado, já que os tratamentos com óleo purificado foram adicionados da mesma quantidade de α -tocoferol, com a diferença de que, no caso do óleo purificado adicionado da mistura de antioxidantes, houve também acréscimo de alearim. Nos tratamentos envolvendo óleo natural, o resultado também era esperado, porque ambos tratam-se do mesmo substrato lipídico, com ou sem adição de alearim.

No tempo 5 horas de aquecimento, observou-se o mesmo resultado inicial, ou seja, embora o óleo purificado adicionado da mistura de antioxidantes tenha apresentado maior concentração de α -tocoferol que o mesmo óleo adicionado apenas desse antioxidante, pela análise estatística, não houve diferença significativa entre os valores de α -tocoferol nos dois tratamentos. O mesmo aconteceu com os tratamentos envolvendo o óleo natural, ou seja, não houve diferença significativa entre os valores de α -tocoferol dos óleos naturais, adicionados ou não de alearim.

Ao final do aquecimento, houve diferença significativa entre o valor de α -tocoferol do óleo purificado adicionado da mistura de antioxidantes e os demais tratamentos, apresentando maior valor,

seguido pelo óleo purificado adicionado de α -tocoferol, que também diferiu significativamente dos demais. Embora se verifique menor valor de α -tocoferol no óleo natural que no mesmo óleo adicionado de alecrim, continuou não havendo diferença significativa entre ambos.

Decker et al. (2005), ao citarem as considerações gerais que precisam ser observadas ao se avaliar antioxidantes alimentícios, mencionaram que a efetividade de um antioxidante, dentre outras maneiras, pode ser expressa em porcentagem de perda ou de retenção após tempo e demais condições padronizadas. Para facilitar a análise, os mesmos resultados da Tabela 21 são apresentados em porcentagem de α -tocoferol residual na Tabela 22.

Tabela 22 – Teor de α -tocoferol residual (%) do óleo de soja purificado e natural adicionado de antioxidantes.

Antioxidantes	Tempos de Aquecimento (horas)		
	0	5	10
OP + TOC	100	88	67
OP + M	100	91	87
ON	100	91	70
ON + ALE	100	95	95

(OP + TOC) – óleo de soja purificado + 600 mg/kg de α -tocoferol, (OP + M) – óleo de soja purificado + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim + 600 mg/kg de α -tocoferol, (ON) – óleo de soja natural, (ON + ALE) – óleo de soja natural + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim.

Verifica-se, pela Tabela 22, que o óleo purificado adicionado de 600 mg/kg de α -tocoferol apresentou, após 10 horas de aquecimento, 67% de retenção do antioxidante; o resultado foi diferente do encontrado

por Barrera-Arellano et al. (2002), em que a perda de α -tocoferol após submeter óleo de soja purificado adicionado de 500 mg/kg de α -tocoferol às mesmas condições de aquecimento foi total.

A literatura acerca da estabilidade do α -tocoferol em altas temperaturas apresenta resultados conflitantes, ainda que para um mesmo tipo de substrato aquecido sob as mesmas condições de tempo e temperatura. Barrera-Arellano et al. (2002) encontraram 13% de α -tocoferol residual após submeter óleo de soja natural ao aquecimento a 180°C por 10 horas, Steel (2002) encontrou 36% de α -tocoferol no mesmo tipo de óleo sob as mesmas condições e, por outro lado, em pesquisa realizada por Yuki e Ishi-Kawa (1976), 91% do teor original de α -tocoferol permaneceu no óleo de soja após as mesmas condições de aquecimento mencionadas. No presente trabalho, a retenção de α -tocoferol após 10 horas de aquecimento do óleo natural foi de 70% .

Considerando outros tipos de substratos, Corsini (2004), ao avaliar os teores de tocoferóis e a estabilidade oxidativa em óleo de fritura, observou a retenção de 72 e 61% de α -tocoferol para os óleos de algodão e girassol, respectivamente, após aquecimento por 10 horas a 180°C.

Pela Tabela 22, observa-se ainda que, ao final do aquecimento, existiu uma degradação mais acentuada de α -tocoferol nos óleos que não tiveram adição de alectrim. O óleo purificado adicionado apenas de 600 mg/kg de α -tocoferol, após 10 horas de aquecimento, apresentou, como já anteriormente mencionado, 67% de α -tocoferol

residual, enquanto o mesmo óleo adicionado da mesma quantidade de α -tocoferol mais 1.000 mg/kg de alecrim apresentou ao final do mesmo tempo, 87% de α -tocoferol residual, com diferença de 20% em favor da mistura de antioxidantes.

No caso do óleo natural, embora não tenha havido diferença significativa, ao final de 10 horas de aquecimento o óleo natural adicionado de 1.000 mg/kg de alecrim apresentou 25% a mais de α -tocoferol do que o mesmo óleo sem alecrim. A presença do alecrim contribuiu para aumentar a retenção do α -tocoferol de 67 para 87% no caso do óleo purificado e de 70 para 95% no caso do óleo natural, ou seja, a perda tanto de α -tocoferol adicionado quanto do α -tocoferol naturalmente presente no óleo, foi mais rápida quando o alecrim estava ausente.

A maior retenção de α -tocoferol na presença do alecrim está de acordo com o encontrado por Rizner-Hras et al. (2000), que também constataram que o extrato de alecrim aumentou a estabilidade do α -tocoferol presente em óleo de girassol armazenado a 60°C. Gordon e Kourimská (1995) também observaram um efeito protetor do extrato de alecrim para tocoferóis em óleo de canola sob condições de fritura a 162°C.

Segundo Wada e Fang (1992), a maior estabilidade do α -tocoferol na presença do alecrim é devido ao fornecimento de átomos de hidrogênio ao radical tocoferoxil, regenerando o α -tocoferol, ou à

prevenção de sua inativação pela combinação com substâncias como íons metálicos.

Comparando-se o teor de α -tocoferol residual do óleo purificado adicionado desse antioxidante com o do óleo natural, verifica-se uma maior resistência a altas temperaturas do α -tocoferol naturalmente presente no óleo do que quando adicionado. Esse resultado está de acordo com o encontrado por Souza (2001), em que os tocoferóis naturais encontrados na oleína de palma refinada também se mostraram mais resistentes a altas temperaturas do que quando adicionados.

Para efeito de comparação, a Tabela 23 mostra, por meio dos valores médios e do desvio padrão dos dados, o comportamento do α -tocoferol, como citado anteriormente, e dos demais homólogos presentes no óleo de soja natural, adicionado ou não de extrato de alecrim, no tempo 0 e após 10 horas de termoxidação a 180°C. Para facilitar a análise, esses mesmos resultados são apresentados também em porcentagem de tocoferol residual.

De acordo com a American Oil Chemists Society (AOCS, 1996), além da variação de α -tocoferol já citada anteriormente, o óleo de soja deve conter também de 0 a 36 mg/kg de β , 89 a 2.307 mg/kg de γ , e 154 a 932 mg/kg de δ -tocoferol. Com isso, verifica-se que os teores de tocoferóis iniciais do óleo de soja natural e do mesmo óleo adicionado de alecrim do presente estudo estão de acordo com os valores estabelecidos pela AOCS (1996).

Tabela 23 – Resultados médios do teor de tocoferol em mg/kg e em Percentual de retenção (%) do óleo de soja natural adicionado ou não de alecrim.

Antioxidantes	Tempos de Aquecimento (horas)			
	0		10	
	mg/kg	%	mg/kg	%
α -tocoferol				
ON	139 \pm 8	100	97 \pm 45	70
ON + ALE	144 \pm 4	100	137 \pm 0	95
β + γ -tocoferol				
ON	706 \pm 5	100	387 \pm 6	55
ON + ALE	656 \pm 11	100	620 \pm 1	95
δ -tocoferol				
ON	213 \pm 0	100	180 \pm 8	85
ON + ALE	205 \pm 1	100	23 \pm 0	11
Tocoferol total				
ON	1.058 \pm 13	100	663 \pm 30	63
ON + ALE	1.005 \pm 15	100	780 \pm 1	78

(ON) – óleo de soja natural, (ON + ALE) – óleo de soja natural + 1.000 mg/kg de extrato de alecrim.

Os valores de tocoferóis totais do óleo de soja natural e do mesmo óleo adicionado de alecrim do presente estudo, 1.058 e 1.005 mg/kg, foram inferiores ao apresentado por Barrera-Arellano et al. (2002), que, ao analisarem o teor e a composição de tocoferóis do óleo de soja refinado, encontraram 1.353 mg/kg. Supõe-se que as diferenças encontradas estejam relacionadas às condições de processamento dos óleos, principalmente no que se refere à desodorização.

Verifica-se, pela Tabela 23, que todas as frações de tocoferóis, tanto do óleo natural quanto do mesmo óleo adicionado de alearim, sofreram uma redução após 10 horas de aquecimento, embora em diferentes proporções. Pode-se observar que o alearim contribuiu para reduzir a degradação do α -tocoferol de 30 para 5%, apesar de, como mencionado anteriormente, não ter havido diferença significativa entre o óleo natural com ou sem alearim e também contribuiu para reduzir a degradação do $\beta + \gamma$ -tocoferol de 45 para 5%; no entanto, na presença do alearim, a degradação do δ -tocoferol aumentou consideravelmente, de 15 para 89%.

Ainda com relação à estabilidade dos tocoferóis, embora, pela literatura, a seqüência para alta temperatura seja $\delta > \gamma > \beta > \alpha$ (KAMAL-ELDIN; APPELQVIST, 1996), verifica-se, no presente trabalho, que para o óleo natural a estabilidade dos tocoferóis decresceu na ordem $\delta > \alpha > \beta + \gamma$. Esse resultado está de acordo com pesquisas realizadas por Steel (2002) e Yuki e Ishi-Kawa (1976), em que α -tocoferol também se mostrou mais estável que γ -tocoferol. Também em estudo para avaliar o efeito de tocoferóis na estabilidade de óleo de canola submetido a fritura, γ tocoferol degradou de forma mais rápida que α tocoferol (NORMAND; ESKIN; PRZYBYLSKI, 2001).

Para o óleo natural com alearim, essa seqüência foi alterada para $\alpha = \beta + \gamma > \delta$ devido ao aumento da estabilidade do α e $\beta + \gamma$ -tocoferóis e redução da estabilidade do δ -tocoferol. Em pesquisa realizada por Gordon e Kourimská (1995) para avaliar a perda de tocoferol em óleo

de canola adicionado ou não de 1.000 mg/kg de extrato de alecrim e submetido a aquecimento sob condições de fritura, também houve um claro aumento da estabilidade do α , β e γ -tocoferóis no óleo com alecrim. Devido ao baixo índice de δ -tocoferol em óleo de canola (10 a 20 mg/kg), tal antioxidante não foi considerado no referido estudo.

Após 10 horas de termoxidação a 180°C, o óleo de soja natural do presente estudo manteve 63% do tocoferol total inicial, mas, a esse respeito, a literatura tem mostrado resultados conflitantes. Barrera-Arellano et al. (2002) e Steel (2002) verificaram uma menor retenção de tocoferol total ao submeter o óleo de soja à mesma temperatura pelo mesmo tempo, 47 e 34% , respectivamente. Por outro lado, Yuki e Ishikawa (1976) verificaram uma maior retenção, 80% do tocoferol total permaneceu no óleo de soja após 10 horas de aquecimento a 180°C. De qualquer forma, apesar do efeito negativo do alecrim sobre o δ -tocoferol, observa-se, pela Tabela 23, que o óleo de soja com alecrim apresentou, ao final do aquecimento, uma maior retenção dos tocoferóis totais do que o mesmo óleo sem esse antioxidante.

6 CONCLUSÕES

Em relação aos objetivos fundamentais do presente estudo, observam-se as seguintes conclusões:

Tanto o α -tocoferol quanto o extrato de alecrim demonstraram ter efeito protetor sobre o óleo de soja contra a oxidação sob altas temperaturas.

Dentre as concentrações avaliadas, 600 mg/kg de α -tocoferol e 1.000 mg/kg de extrato de alecrim promoveram maior estabilidade oxidativa ao óleo de soja purificado medida por meio do Rancimat.

A mistura extrato de alecrim + α -tocoferol promoveu uma maior estabilidade, medida pelo Rancimat, e menor formação de compostos polares em óleo de soja purificado submetido ao aquecimento a 180°C por 10 horas, seguida pelo α -tocoferol. O extrato de alecrim, que continha 4% de diterpenos fenólicos, demonstrou efeito protetor por meio dessas duas medidas, mas, em menor intensidade e por menos tempo.

Todos os antioxidantes foram efetivos em inibir a formação de compostos primários de oxidação durante as 10 horas de aquecimento do óleo de soja purificado, medidos através das análises de peróxidos e dienos conjugados, mas, novamente, a mistura dos antioxidantes foi a que surtiu maior efeito, sendo seguida pelo α -tocoferol e extrato de alecrim.

A adição de 1.000 mg/kg de extrato de alecrim em óleo de soja natural submetido à termoxidação aumentou significativamente a

estabilidade oxidativa do óleo e reduziu consideravelmente não só a formação de polímeros e produtos de decomposição, medidos por meio do teor de compostos polares, como também a formação dos produtos primários de oxidação medidos através do teor de dienos.

O extrato de alearim contribuiu para aumentar a retenção do α -tocoferol em óleo de soja aquecido em alta temperatura.

O α -tocoferol original, naturalmente presente em óleo de soja, mostrou-se mais resistente à alta temperatura que o adicionado.

A adição de extrato de alearim ao óleo de soja natural mostrou efeito positivo sobre a estabilidade oxidativa e térmica desta matéria-prima e poderia ser indicado como antioxidante alternativo na conservação de óleos.

A mistura alearim + α -tocoferol também pode ser sugerida como uma prática tecnologicamente viável para reduzir a degradação térmica e oxidativa de óleos e gorduras.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em: <http://www.abiove.com.br>. Acesso em: 3 jan. 2005.

ALMEIDA-DORIA, R. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 01-14, 2000.

AMAYA-FARFAN, J.; DOMENE, S. M. A.; PADOVANI, R. M. DRI: Síntese comentada das novas propostas sobre recomendações nutricionais para antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 71-78, 2001.

ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 353-380, 2001.

AOCS – AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign, 1993.

AOCS – AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign, 1996.

AOCS – AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. Champaign, 1998.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa/Impr. Univ., 1995. cap. 2, p. 65-85.

ARUOMA, O. I. et al. Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. **Xenobiotica**, London, v. 22, n. 2, p. 257-268, 1992.

BANIAS, C.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. The effect of primary antioxidants and synergists on the activity of plant extracts in lard. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 69, p. 520-524, 1992.

BARRERA-ARELLANO, D. et al. Loss of tocopherols and formation of degradation compounds at frying temperatures in oils differing in degree of unsaturation and natural antioxidant content. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 82, p. 1696-1702, 2002.

BARRERA-ARELLANO, D. et al. Loss of tocopherols and formation of degradation compounds in triacylglycerol model systems heated at high temperature. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, p. 1923-1928, 1999.

BASAGA, H.; ACIKEL, F.; TEKKAYA, C. Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. **Lebensmittel – Wissenschaft und –Technologie**, London, v. 30, n. 1, p. 105-108, 1997.

BAUMAN, D. et al. Supercritical fluid extraction of rosemary and sage antioxidants. **Acta Alimentaria**, Budapest, v. 28, p. 15-28, 1999.

BELITZ., H. D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1985. 813 p.

BERGER, K. G. The practice of frying. **Porim Technology**, Malásia, v. 9, n. 5, p. 1-34, 1984.

BOTTERWECK, A. A. et al. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, p. 599-605, 2000.

BRACCO, U.; DIEFFENBACHER, A.; KOLAROVIC, L. Frying performance of palm oil and palm liquid fractions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 58, n. 1, p. 6-12, 1981.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 04/88. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO, **Compêndio da Legislação de Alimentos**. São Paulo: ABIA, 2001. v. 1, p. 3-26.

BRASIL. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. **Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de óleos e gorduras vegetais**. Diário Oficial da União, Brasília-DF, v. 196. 13 out. 1999. Seção I, p. 82-87.

CARLSON, B. L.; TABACCHI, M. H. Frying oil deterioration and vitamin loss during foodservice operation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 51, n. 1, p. 218-221, 1986.

CARO, A. S. B. **Determinação e padronização da vitamina E e seus isômeros: comparação entre o método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e o método espectrofotométrico por redução de íons cúpricos**. 2002. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

CELLA, R. C. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. Comportamento do óleo de soja refinado utilizado em fritura por imersão com alimentos de origem vegetal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 2, p. 111-116, 2002.

CERT, A.; MOREDA, W.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 881, p. 131-148, 2000.

CHANG, S. S. et al. Natural antioxidants from rosemary and sage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 42, n. 4, p. 1102-1106, 1977.

CHE-MAN, Y. B.; JASWIR, I. Effect of rosemary and sage extracts on frying performance of refined, bleached and deodorized (RBD) palm olein during deep-fat frying. **Food Chemistry**, London, v. 69, p. 301-307, 2000.

CHE-MAN, Y. B.; TAN, C. P. Effects of natural and synthetic antioxidants on changes in refined, bleached and deodorized palm olein during deep-fat frying of potato chips. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 76, n. 3, p. 331-339, 1999.

CHEN, Q.; SHI, H.; HO, C. T. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 69, p. 999-1002, 1992.

CHIPAULT, J. R.; MIZUNO, G. R.; LUNDBERG, W. O. Antioxidants properties of spices in oil-in-water emulsions. **Food Research**, Chicago, v. 20, p. 443-448, 1955.

CHIPAULT, J. R. et al. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, Chicago, v. 17, p. 46-55, 1952.

CILLARD, J.; CILLARD, P. Inhibitors of the prooxidant activity of α -tocopherol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 63, n. 9, p. 1165-1169, 1986.

CINTRA, R. M. G. C. **Efeito antioxidante de especiarias – avaliação da salsa (*Petroselinum sativum* Hoffm), cebolinha verde (*Allium schoenoprasum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)**. 1999. 152 f. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

COAT ANEA, M.; DARCHEN, A.; HAUCHARD, D. Eletroanalysis at ultramicroelectrodes of oils and fats application to the determination of vitamin E. **Sensors and Actuators B**, Lausanne, v. 76, p. 539-544, 2001.

CORSINI, M. S. **Medidas dos teores de tocoferóis e estabilidade oxidativa em óleos de fritura**. 2004. 153 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2004.

CRUZIAN, J. L.; INHAMUNS, A. J.; BARRERA-ARELLANO, D. Determinación de compuestos polares por TLC-FID en aceites refinado y semi-hidrogenado de soja sometidos a calentamiento prolongado. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 48, n. 3, p. 148-153, 1997.

CUESTA, C.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Alteración de aceites de girasol en frituras realizadas con o sin reposición de aceites sin usar. **Alimentación, Equipos y Tecnología**, (S.l.), v. 4, p. 39-43, 1994.

CUESTA, C. et al. Modificaciones de un aceite de oliva durante las frituras sucesivas de patatas. Correlaciones entre distintos índices analíticos y de evaluación global de la degradación. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v. 31, n. 4, p. 523-531, 1991.

CUESTA, P. J. M.; MARTINEZ, E. R.; CHAPARRO, M. G. Enranciamiento oxidativo de aceites vegetales in presencia de α -tocoferol. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 46, n. 6, p. 349-353, 1995.

CUVELIER, M. E.; BERSET, C.; RICHARD, H. Antioxidant constituents in sage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, p. 665-669, 1994.

CUVELIER, M. L.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extract of sage and rosemary. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 73, n. 5, p. 645-652, 1996.

DAWES, H. W.; KEENE, J. B. Phenolic composition of kiwi-fruit juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 47, p. 2398-2403, 1999.

DECKER, E. A. et al. Measuring antioxidant effectiveness in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 10, p. 4303-4310, 2005.

DEL RÉ, P. V. **Comportamento de óleos vegetais em frituras descontínuas de produtos pré-fritos congelados**. 2003. 121 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biotecnologia, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto-SP, 2003.

DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Thermal stability and frying performance of genetically modified sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 41, n. 4, p. 678-681, 1993.

DOBARGANES, M. C.; RIOS, J. J.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Relaciones entre la composición de aceites vegetales y los componentes volátiles producidos durante su termoxidación. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 37, n. 2, p. 61-67, 1986.

DOBARGANES, M. C.; VELASCO, J.; DIEFFENBACHER, A. Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 72, n. 8, p. 1563-1575, 2000.

DUBINSKY, E. Utilización de antioxidantes en aceites y grasas. **Aceites y Grasas**, Buenos Aires, junio, p. 191-199, 2000.

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.

DZIEDZIC, S. Z.; ROBINSON, J. L.; HUDSON, B. J. F. Fat of propyl gallate and diphosphatidylethanolamine in lard during autoxidation at 120°C. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 34, p. 1027-1029, 1986.

ELIZABLE, B. E.; BRESSA, F.; ROSA, M. D. Antioxidative action of maillard reactions volatiles: influence of maillard solution level. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 69, p. 331-334, 1992.

EVANS, J. C.; KODALI, D. R.; ADDIS, P. B. Optimal tocopherol concentration to inhibit soybean oil oxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 79, p. 47-51, 2002.

FÁBREGA, J. J. P.; RIEIRA, J. B.; BORONAT, M. C. T. Modificaciones químicas de los aceites calentados. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 36, p. 217-222, 1985.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Statistical Databases. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em: 3 jan. 2005.

FAO/OMS. **Grasas y aceites en la nutrición humana**. Organización Mundial de la Salud, 1997.

FERRARI, R. A. Componentes minoritários de óleos vegetais. **Óleos & Grãos**, Curitiba, p. 20-28, jan/fev, 2001.

FERRER, P. A. R. Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados en la alimentación del lactante. **Archivos Argentinos de Pediatría**, Buenos Aires, n. 98, p. 231-236, 2000.

FRANKEL, E. N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. **Food Chemistry**, London, v. 57, n. 1, p. 51-55, 1996.

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

FRANKEL, E. N. et al. Antioxidant activity of a rosemary extracts and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 1, p. 131-135, 1996a.

FRANKEL, E. N. et al. Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 72, p. 201-208, 1996b.

FRANKEL, E. N. et al. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils versus emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, p. 1054-1059, 1994.

FRITSCH, C. W. Measurements of frying fat deterioration: a brief review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 58, n. 3, p. 272-274, 1981.

FUSTER, M. A. et al. Effects of α and γ -tocopherols on the autoxidation of purified sunflower triacylglycerols. **Lipids**, Champaign, v. 33, p. 715-722, 1998.

GANTHAVORN, C.; HUGHES, J. S. Inhibition of soybean oil oxidation by extracts of dry beans (*Phaseolus vulgaris*). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 74, p. 1025-1030, 1997.

GOMES, F. P. **Curso de estatística experimental**, 14. ed. Piracicaba: Editora Nobel, 2000. 477 p.

GORDON, M. H.; KOURIMSKÁ, L. Effect of antioxidants on losses of tocopherols during deep-fat frying. **Food Chemistry**, London, v. 52, p. 175-177, 1995.

GOTTSTEIN, T.; GROSCH, W. Model study of different antioxidant properties of α and γ -tocopherols in fats. **Fat Science Technology**, (S.I.), v. 92, p. 139-143, 1990.

GUNSTONE, F. D. **Fatty acid and lipid chemistry**. London: Chapman & Hall, 1996. 252 p.

GUTIÉRREZ, G. Q.; DOBARGANES, M. C. Analytical procedures for the evaluation of used frying fats. In: VARELA, G.; BENDER, A. E.; MORTON, I. A. (Ed.). **Frying of food: principles, changes, new approaches**. Chichester: Ellis Horwood, 1988. p. 141-154.

HALL, C.; CUPPETT, S. Structure-activities of natural antioxidants. In: ARUOMA, O.; CUPPETT, S. (Ed.) **Antioxidant methodology, in vivo and in vitro concepts**, Champaign: AOCS Press, 1997. p. 141-172.

HOPIA, A. I. et al. Effects of different lipid systems on antioxidant activity of rosemary constituents carnosol and carnosic acid with and without α -tocopherol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 8, p. 2030-2036, 1996.

HOULIHAN, C. M.; HO, C. T.; CHANG, S. S. Elucidation of a chemical structure of a novel antioxidant, rosmaridiphenol, isolated from rosemary. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 61, p. 1036-1039, 1984.

HUANG, S. W.; FRANKEL, E. N.; GERMAN, J. B. Antioxidant activity of α and γ tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, p. 2108-2114, 1994.

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

JORGE, N. Alterações em óleos de fritura. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 11, n. 52, p.15-22, 1997.

JORGE, N.; GONÇALVES, L. A. G. Aditivos utilizados em óleos e gorduras de frituras. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, n. 1, p. 40-47, 1998.

JORGE, N. et al. Influence of dimethylpolysiloxane addition to edible oils: dependence on the main variables of the frying process. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 47, n. 1-2, p.14-19, 1996.

JUNG, M. Y.; MIN, D. B. Effects of α , γ , e δ tocopherols on oxidative stability of soybean oil. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 5, p. 1464-1465, 1990.

JUNG, M. Y.; YOON, S. H.; MIN, D. B. Effects of processing steps on the contents of minor compounds and oxidation of soybean oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 66, p. 118-120, 1989.

KAMAL-ELDIN, A.; APPELQVIST, L. A. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. **Lipids**, Champaign, v. 31, p. 671-701, 1996.

KARPIŃSKA, M.; BOROWSKI, J.; DANOWSKA, O. M. The use of natural antioxidants in ready-to-serve food, **Food Chemistry**, London, v. 72, p. 5-9, 2001.

KOCHHAR, S. P. Stabilization of frying oils with natural antioxidative components. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 102, p. 552-559, 2000.

KOCHHAR, S. P.; ROSSEL, J. B. Detection, stimulation and evaluation of antioxidants. In: HUDSON, B. J. F. (Ed.). **Food antioxidants**. London: Applied Science, 1990. p. 65-69.

LALAS, S.; DOURTOGLOU, V. Use of rosemary extract in preventing oxidation during deep-fat frying of potato chips. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 80, p. 579-583, 2003.

LAMPI, A. M. et al. Antioxidant activities of α and γ tocopherols in the oxidation of rapeseed oil triacylglycerols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 76, n. 6, p. 749-755, 1999.

LAWSON, H. **Food oils and fats**: technology, utilization, and nutrition. New York: Chapman & Hall, 1995. 339 p.

LIMA, J. R.; GONÇALVES, L. A. G. Avaliação analítica de óleos utilizados em processo de fritura. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 2, p. 186-192, 1995.

LIMA, J. R.; GONÇALVES, L. A. G. Parâmetros de avaliação da qualidade de óleo de soja utilizado para fritura. **Química Nova**, São Paulo, v. 17, n. 5, p. 392-396, 1994.

LOLOS, M.; OREOPOULOU, V.; TZIA, C. Oxidative stability of potato chips: effect of frying oil type, temperature and oxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, p. 1524-1528, 1999.

LOPES, M. R. V. **Estudo comparativo entre métodos analíticos tradicionais e testes rápidos utilizados na avaliação da qualidade dos óleos e gorduras de fritura**. 2002. 136 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biodiências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto – SP, 2002.

LUMLEY, I. D. Polar compounds in heated oils. In: VARELA, G.; BENDER, A. E.; MORTON, I. D. (Ed.). **Frying of foods**: principles, changes, new approaches. Chichester: Ellis Horwood, 1988. p. 166-173.

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.

MADHAVI, D. L.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Technological aspects of food antioxidants. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. (Ed). **Food antioxidants** – technological, toxicological and health perspectives. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 159-265.

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

MAGNONI, D. A importância socioeconômica da soja. **Qualidade em Alimentos e Nutrição**, (S.l.), v. 9, jun/jul, p. 10-12, 2001.

MAHAN, L. K.; ARLIM, M. T. Lipídios. In: MAHAN, M. T.; ARLIN, M. T. **Krause**: alimentos, nutrição e dietoterapia. São Paulo: Roca, 1995. p. 40-51.

MÁRQUEZ-RUIZ, G. et al. Influence of used frying oil quality and natural tocopherol content on oxidative stability of fried potatoes. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 76, n. 4, p. 421-425, 1999.

MASSON, L. et al. Comportamiento de aceites poliinsaturados en la preparación de patatas fritas para consumo inmediato: Formación de nuevos compuestos y comparación de métodos analíticos. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 48, n. 5, p. 273-281, 1997.

MELO, M. S. O. N. **Antioxidantes naturais da castanha do Brasil (*Bertolletia excelsa* H.B.R.), castanha de caju (*Anacardium occidentale*, L.) e fruto do dendezeiro (*Elaeis guineensis*, Jacq).** 1989. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

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

MELO, E. A. et al. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 195-199, 2003.

MONFERRER, A.; VILLALTA, J. La fritura desde un punto de vista práctico (I). **Alimentación, Equipos y Tecnología**, (S.l.), v. 21, n. 3, p. 85-90, 1993a.

MONFERRER, A.; VILLALTA, J. La fritura desde un punto de vista práctico (II). **Alimentación, Equipos y Tecnología**, (S.l.), v. 21, n. 4, p. 87-91, 1993b.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1998. 150 p.

MORTON, I. D. Geography and history of the frying process. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 49, n. 3-4, p. 247-249, 1998.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, London, v. 72, p. 145-171, 2001.

MUKAI, K. et al. Kinetic study of reactions between tocopheroxyl radicals and fatty acids. **Lipids**, Champaign, v. 28, n. 8, p. 753-756, 1993.

NAGEM, T. J.; ALBUQUERQUE, T. T. O.; MIRANDA, L. C. G. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v. 35, p. 129-138, 1992.

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. Two antioxidative diterpenes from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and a revised structure for rosmanol. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 48, p. 2081-2085, 1984.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagenics in food. Critical Review. **Food Science and Nutrition**, (S.I.), 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.

NORMAND, L.; ESKIN, N. A. M.; PRZYBYLSKI, R. Effect of tocopherols on the frying stability of regular and modified canola oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 78, n. 4, p. 369-373, 2001.

OLCOTT, H. S.; EMERSON, O. H. Antioxidants and the antioxidation of fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 59, n. 6, p. 1008-1009, 1937.

ORTHOEFER, F. T. Vegetable oils. In: BAILEY, A. E. **Bailey's industrial oil & fat products**. 5th ed. New York: John Wiley, 1996. v. 1, cap. 2, p. 19-43.

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.

PAUL, S.; MITTAL, G. S. Regulation of the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil frying. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 37, n. 7, p. 635-662, 1997.

PEREIRA, R. B. **Avaliação da atividade antioxidante de sementes de frutas cítricas**. 1996. 90 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

PÉREZ-CAMINO, M. C. et al. Alteración de grasas usadas en fritura. III. Correlación entre índices analíticos y métodos de evaluación directa de compuestos de degradación. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 39, n. 2, p. 72-76, 1988.

POKORNY, J. Substrate influence on the frying process. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 49, n. 3, p. 265-270, 1998.

POKORNY, J. et al. Changes in tocopherols during heating and storage of vegetable oils. **Oleagineux**, Paris, v. 28, n. 8/9, p. 409-412, 1973.

POZO-DÍEZ, R. M. **Estudio del proceso de fritura de alimentos frescos y congelados prefritos. Comportamiento del aceite de semilla de girasol de alto contenido en ácido oleico**. 1995. 338 f. Tese (Doutorado em Farmácia) – Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares, 1995.

PRATT, D. E. Antioxidants: technical and regulatory considerations. In: BAILEY, A. E. **Bailey's industrial oil & fat products**. 5th ed. New York: John Wiley, 1996. v. 3, cap. 13, p. 523-543.

PRIOR, R. L. et al. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, p. 2686-2693, 1998.

QUIJANO, J. A. T. Óleo de palma: um produto premium. **Óleos & Grãos**, Curitiba, p. 30-39, jul/ago, 1999.

REISCHE, D. W.; LILLIARD, D.; EITENMILLER, R. R. Antioxidants. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1997. cap. 16, p. 423-448.

REYNHOUT, G. The effect of temperature on the induction time of a stabilized oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 68, n. 12, p. 983-984, 1991.

RIZNER-HRAS, A. et al. Comparison of antioxidative and synergistic effect of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. **Food Chemistry**, London, v. 71, p. 229-233, 2000.

ROJO, J. A.; PERKINS, E. G. Cyclic fatty acid monomer formation in frying fats. I. Determination and structural study. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 64, n. 3, p. 414-421, 1987.

ROMERO, N. et al. Effect of α -tocopherol and α -tocotrienol on the performance of chilean hazelnut oil (*Gevuina avellana* Mol) at high temperature. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, p. 943-948, 2004.

ROSSEL, J. B. Industrial frying process. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 49, n. 3-4, p. 282-295, 1998.

RUPÉREZ, F. J. et al. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, n. 935, p. 45-69, 2001.

SANIBAL, E. A. A.; MANCINI-FILHO, J. Alterações físicas, químicas e nutricionais de óleos submetidos ao processo de fritura. **Food Ingredients South American**, São Paulo, v. 18, p. 64-71, 2002.

SANIBAL, E. A. A.; MANCINI-FILHO, J. Frying oil and fat quality measured by chemical, physical, and test kit analyses. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 81, n. 9, p. 847-852, 2004.

SCHWARZ, K.; TERNES, W. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. I. Determination of phenolic diterpenes with antioxidative activity amongst tocopherols using HPLC. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, Berlin, v. 195, p. 95-98, 1992a.

SCHWARZ, K.; TERNES, W. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, Berlin, v. 195, p. 99-103, 1992b.

SCHWARZ, K.; TERNES, W.; SCHMAUDERER, E. Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. III. Stability of phenolic diterpenes of rosemary extracts under thermal stress as required for technological processes. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, Berlin, v. 195, p. 104-107, 1992.

SÉBÉDIO, J. L.; SEPTIER, C.; GRANDGIRARD, A. Fractionation of commercial frying oil simples using Sep-Pak Cartridges. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 63, n. 12, p. 1541-1543, 1987.

SEHTI, S. C.; AGGAPWAL, J. S. Stabilization of edible fats by condiments or spices. **Nature**, London, v. 166, n. 2, p. 518-519, 1950.

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.

SHILS, M. E. et al. **Tratado de nutrição moderna na saúde e doença**. 9. ed., v. 1. São Paulo: Manole, 2002. 2122 p. 2 v.

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

SIMIC, M. G.; JAVANOVIC, S. V. Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis. In: HO, C. T.; OSAWA, T.; HUANG, T. M.; ROSEN, R. T. (Ed.). **Food phytochemicals for cancer prevention**. Washington: American Chemical Society, 1994. p. 20-33.

SIPOS, E. F.; SZUHAJ, B. F. Soybean oil. In: BAILEY, A. E. **Bailey's industrial oil & fat products**. 5th ed. New York: John Wiley, 1996. v. 2, p. 499.

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

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2002.

SONNTAG, N. O. V. Structure and composition of fats and oils. In: SWERN, D. **Bailey's industrial oil and fat products**. 4th ed. New York: John Wiley & Sons, 1979. v. 1, cap. 1, p. 1-98.

SOUZA, W. S. M. **Termoxidação de gorduras animais**. 2001. 79 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

STEEL, C. J. **Gorduras vegetais hidrogenadas: produtos da termoxidação e ação antioxidante dos tocoferóis**. 2002. 334 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

STERWIN, E. R. Oxidation and antioxidants in fat and oil processing. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 55, p. 809-812, 1978.

TAPPEL, A. L. et al. Unsaturated lipid peroxidation catalyzed by hematin compounds and its inhibition by vitamin E. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 38, p. 5-9, 1961.

THORSEN, M. A.; HILDEBRANDT, K. S. Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 995, p. 119-125, 2003.

TIAN, L. L.; WHITE, P. J. Antioxidant of oat extract in soybean and cottonseed oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 71, n. 10, p. 1079-1086, 1994.

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

TURATTI, J. M. **Lipídios**: aspectos funcionais e novas tendências. Campinas: ITAL, 2002. 78 p.

TURATTI, J. M. Óleos vegetais como fonte de alimentos funcionais. **Óleos & Grãos**, Curitiba, p. 20-27, set/out, 2000.

VALENZUELA, A. B.; SANHUEZA, J.; NIETO, S. Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 54, p. 295-303, 2003.

WADA, S.; FANG, X. The synergistic antioxidant effect of rosemary extract and α -tocopherol in sardine oil model system and frozen-crushed fish meat. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, v. 16, n. 3, p. 263-274, 1992.

WAGNER, K. H.; WOTRUBA, F.; ELMADFA, I. Antioxidative potential of tocotrienols and tocopherols in coconut fat at different oxidation temperatures. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 102, p. 552-559, 2001.

WARNER, K.; NEFF, W. E.; ELLER, F. J. Enhancing quality and oxidative stability of aged fried food with γ -tocopherol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 623-627, 2003.

WEISS, T. J. **Food oils and their uses**. 2. ed. Chichester: Ellis Horwood, 1983. 310 p.

WU, J. W. et al. Elucidation of the chemical structures of natural antioxidants isolated from rosemary. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 59, n. 8, p. 339-345, 1982.

YAGHMUR, A. et al. Evaluation of argan oil for deep-fat-frying. **Lebensmittel - Wissenschaft und - Technologie**, London, v. 34, p. 124-130, 2001.

YANISHLIEVA, N. V.; MARINOVA, E. M. Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. **Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung**, Berlin, v. 203, p. 203-223, 1996.

YOSHIDA, H.; HIROOKA, N.; KAJIMOTO, G. Microwave energy effects on quality of seed oils. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 5, p. 1412-1416, 1990.

YOSHIDA, H.; TATSUMI, M.; KAJIMOTO, G. Relationship between oxidative stability of vitamin E and production of fatty in oil during microwave heating. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 68, n. 8, p. 566-570, 1991.

YUKI, E.; ISHI-KAWA, Y. Tocopherol contents of nine vegetable frying oils, and their changes under simulated deep-fat frying conditions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 53, p. 673-676, 1976.

ZANDI, P.; GORDON, M. H. Antioxidant activity of extracts from old tea leaves. **Food Chemistry**, London, v. 14, p. 285-288, 1999.

ZILLER, S. **Grasas y aceites alimentarios**. Zaragoza: Acribia, 1994. 71 p.

ANEXOS

ANEXO A – Análise de variância para a estabilidade oxidativa do óleo de soja purificado com adição de extrato de alecrim ou α -tocoferol.

Causas de Variação	G.L.	Quadrados Médios	
		Alecrim	α -tocoferol
Concentrações	5	10,6782**	17,5156**
Resíduo	6	0,0381	0,0367
Desvio Padrão		0,1953	0,1917
Coef. de Variação (%)		6,94	3,74

** teste significativo ($P < 0,01$).

ANEXO B – Análise de variância para a estabilidade oxidativa (EO), compostos polares totais (CPT), índice de peróxidos (IP) e dienos conjugados (DC).

Causas de Variação	G.L.	Quadrados Médios			
		EO	CPT	IP	DC
Antioxidantes	3	174,7518**	54,6250**	493,4388**	0,4541**
Tempos de Aquecimento	4	9,8463**	135,9088**	80,7860**	1,3245**
Antioxidantes x Tempos	12	2,6030**	14,3299**	39,7568**	0,0623**
Resíduo	20	0,0113	0,0297	0,2547	0,0001
Desvio Padrão		0,1064	0,1722	0,5046	0,0091
Coef. de Variação (%)		2,26	2,80	8,04	1,21

** teste significativo ($P < 0,01$).

ANEXO C – Análise de variância para a estabilidade oxidativa (EO), compostos polares totais (CPT), e dienos conjugados (DC).

Causas de Variação	G.L.	Quadrados Médios		
		EO	CPT	DC
Antioxidantes	2	625,5735**	43,9047**	0,4915**
Tempos de Aquecimento	4	40,2404**	142,7370**	1,1063**
Antioxidantes x Tempos	8	11,1595**	10,3283**	0,0841**
Resíduo	15	0,1588	0,0905	0,0003
Desvio Padrão		0,3985	0,3009	0,0163
Coef. de Variação (%)		4,28	3,91	2,01

** teste significativo (P < 0,01).

ANEXO D – Análise de variância para a determinação de α -tocoferol (mg/100g).

Causas de Variação	G.L.	Quadrados Médios
Tempos de Aquecimento	2	150,1850**
Antioxidantes x Tempos	6	41,2261**
Resíduo	12	6,5267
Desvio Padrão		2,5547
Coef. de Variação (%)		7,27

** teste significativo (P < 0,01).