

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS – IBILCE
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

DÉBORA MARIA MORENO LUZIA

**ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÓLEO DE SOJA ADICIONADO
DE EXTRATO DE SEMENTES DE LIMÃO (*Citrus limon*)**

**São José do Rio Preto
2008**

DÉBORA MARIA MORENO LUZIA

**ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÓLEO DE SOJA ADICIONADO
DE EXTRATO DE SEMENTES DE LIMÃO (*Citrus limon*)**

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 obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciências de Alimentos (Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos).

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

**São José do Rio Preto
2008**

Luzia, Débora Maria Moreno.

Estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) / Débora Maria Moreno Luzia. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2008

110 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Neuza Jorge

Dissertação (mestrado – Engenharia e Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

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

CDU - 664.34

DÉBORA MARIA MORENO LUZIA

**ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÓLEO DE SOJA ADICIONADO
DE EXTRATO DE SEMENTES DE LIMÃO (*Citrus limon*)**

COMISSÃO JULGADORA
DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

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

Prof^a. Dr^a. Sabria Aued-Pimentel
2º Examinador

Prof. Dr. David Ariovaldo Banzatto
3º Examinador

São José do Rio Preto, 28 de Novembro de 2008.

Aos meus pais, Eugênio e Margarete, e ao meu marido Fábio,
pelo apoio incondicional,

dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora das Graças pelo dom da vida e oportunidade de crescimento moral, espiritual e intelectual;

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

Aos colegas da Pós-Graduação e às companheiras das jornadas no laboratório, Cássia, Denise, Patrícia e Priscila que tanto me auxiliaram;

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

Ao Técnico do Laboratório de Óleos e Gorduras, Luiz, pelo apoio, carinho e dedicação;

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos;

Ao meu pai Eugênio a quem tanto amo e me orgulho muito, e à minha mãe Margarete, que sempre me deu muito amor, carinho, estímulo e dedicação e, especialmente, por estar em meu lado em todos os momentos;

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

Ao meu irmão Deivid, pela infinita cumplicidade e apoio incondicional;

À minha amiga Marilene e ao meu avô Antônio, pela ajuda nas coletas das sementes de limão;

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

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

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
Capítulo 1. Revisão bibliográfica	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. ÓLEOS E GORDURAS	3
2.1. Fontes de óleos e gorduras	4
2.2. Óleo de soja	4
2.3. Composição química	5
2.4. Ácidos graxos	5
2.5. Compostos minoritários	7
3. OXIDAÇÃO LIPÍDICA	7
4. AVALIAÇÃO OXIDATIVA DE ÓLEOS E GORDURAS	10
4.1. Teste acelerado em estufa	10
4.2. Termoxidação	11
5. ANTIOXIDANTES	12
5.1. Classificação e mecanismo de ação	12
5.2. Tipos de antioxidantes	14
5.3. Sinergismo	17
5.4. Efeitos na saúde humana	18
6. FRUTAS CÍTRICAS – LIMÃO	18
7. COMPOSTOS FENÓLICOS	19
7.1. Flavonóides	20
7.2. Ácidos fenólicos	21
7.3. Tocoferóis	22
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
Capítulo 2. Potencial antioxidante de extratos de sementes de limão (<i>Citrus limon</i>)	33

RESUMO	34
1. INTRODUÇÃO	35
2. MATERIAL E MÉTODOS	36
2.1. Material	36
2.1.1. Óleo	36
2.1.2. Sementes de limão	37
2.1.3. Extratos de sementes de limão	37
2.2. Métodos	37
2.2.1. Composição centesimal	37
2.2.2. Estabilidade oxidativa	38
2.2.3. Método do radical livre DPPH	38
2.2.4. Compostos fenólicos totais	39
2.3. Análise estatística	39
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
3.1. Composição centesimal das sementes de limão	39
3.2. Rendimento dos extratos de sementes de limão	40
3.3. Estabilidade oxidativa	41
3.4. Atividade antioxidante	43
4. CONCLUSÕES	45
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
6. ANEXOS	48

Capítulo 3. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (<i>Citrus limon</i>) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada	49
RESUMO	50
1. INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1. Material	53
2.1.1. Sementes de limão	53
2.1.2. Óleo de soja	53
2.1.3. Antioxidantes	54
2.1.4. Ensaio experimental	54

2.2. Métodos	55
2.2.1. Índice de peróxidos	55
2.2.2. Dienes conjugados	55
2.3. Análise estatística	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.1. Índice de peróxidos	56
3.2. Dienes conjugados	57
4. CONCLUSÕES	60
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
6. ANEXOS	64

Capítulo 4. Ação antioxidante do extrato de sementes de limão (<i>Citrus limon</i>) adicionado ao óleo de soja sob termoxidação	65
RESUMO	66
1. INTRODUÇÃO	67
2. MATERIAL E MÉTODOS	69
2.1. Material	69
2.1.1. Sementes de limão	69
2.1.2. Óleo de soja	69
2.1.3. Antioxidantes	69
2.1.4. Ensaio experimental	70
2.2. Métodos	71
2.2.1. Índice de peróxidos	71
2.2.2. Dienes conjugados	71
2.3. Análise estatística	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1. Índice de peróxidos	72
3.2. Dienes conjugados	73
4. CONCLUSÕES	75
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
6. ANEXOS	79

Capítulo 5. Estabilidade oxidativa e resistência de α-tocoferol em óleo de soja adicionado de extrato de sementes de limão (<i>Citrus limon</i>) sob termoxidação	80
RESUMO	81
1. INTRODUÇÃO	82
2. MATERIAL E MÉTODOS	83
2.1. Material	83
2.1.1. Sementes de limão	83
2.1.2. Óleo	83
2.1.3. Antioxidantes	84
2.1.4. Ensaio experimental	84
2.2. Métodos	85
2.2.1. Estabilidade oxidativa	85
2.2.2. α -tocoferol	85
2.3. Análise estatística	86
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
3.1. Estabilidade oxidativa	86
3.2. α -tocoferol	88
4. CONCLUSÕES	90
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
6. ANEXOS	92
Capítulo 6. Perfil de ácidos graxos e avaliação da alteração do óleo de soja termoxidado adicionado de extrato de sementes de limão (<i>Citrus limon</i>)	93
RESUMO	94
1. INTRODUÇÃO	95
2. MATERIAL E MÉTODOS	97
2.1. Material	97
2.1.1. Sementes de limão	97
2.1.2. Óleo	97
2.1.3. Antioxidantes	97

2.1.4. Ensaio experimental	98
2.2. Métodos	98
2.2.1. Composição em ácidos graxos	98
2.2.2. Compostos polares totais	99
2.3. Análise estatística	99
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	100
3.1. Composição em ácidos graxos	100
3.2. Compostos polares totais	100
4. CONCLUSÕES	107
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
6. ANEXOS	110

Capítulo 1

Revisão bibliográfica

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, características estas dos alimentos submetidos ao 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).

Os óleos e gorduras estão sujeitos a diversas reações que resultam em modificações de suas características originais. Estas envolvem alterações biológicas, físicas e químicas, dentro das quais se enquadra o processo de oxidação lipídica (NAMIKI, 1990; NAWAR, 1985).

O retardo ou a prevenção da oxidação lipídica, uma das principais causas da deterioração de alimentos, pode ser realizado pela adição de antioxidantes, que mantêm a qualidade e prolongam a vida de prateleira do alimento (MONFERRER; VILLALTA, 1993; MUKAI et al., 1993).

Os antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais. Os mais utilizados na indústria de alimentos são os antioxidantes sintéticos butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e galato de propila (GP). O uso destes é restrito, devido a possíveis riscos à saúde humana.

A aplicação de antioxidantes 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, 2004). Os carotenóides juntamente com as vitaminas são as substâncias mais investigadas como agentes quimiopreventivos, funcionando como antioxidantes em sistemas biológicos (POOL-ZOBEL et al., 1997).

Em pesquisas, foi evidenciado que compostos fenólicos exibem ação antioxidante. Pearson et al. (1999) demonstraram que os fenólicos presentes em suco comercial e extrato fresco de maçãs (casca, polpa e fruta inteira) inibiram, *in vitro*, a oxidação de LDL humana. Desta maneira, a atividade antioxidante apresentada por vários vegetais, incluindo frutas cítricas, como limão, laranja e tangerina, além de outras frutas a exemplo da cereja, uva, ameixa, pêra, maçã e mamão, sendo encontrados em maiores quantidades na polpa que no suco da fruta estão correlacionadas aos teores de compostos fenólicos totais (MELO et al., 2008).

Tendo em vista o alto consumo de óleos vegetais, como o de soja, utilizado no Brasil principalmente no preparo de alimentos em alta temperatura, constata-se que, devido ao interesse em reduzir a perda nutricional com relação ao conteúdo de vitaminas e a tendência pelo uso de antioxidantes naturais, faz-se necessário um estudo sobre a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extratos vegetais entre eles o de sementes de limão.

2. ÓLEOS E GORDURAS

Os óleos e gorduras são substâncias insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. 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 um papel fundamental na alimentação humana. Fornecem calorias; além disso, agem como veículos de vitaminas lipossolúveis (A, E, D e K) e de ácidos graxos essenciais como o linoléico e o linolênico e contribuem para melhorar a palatabilidade dos alimentos (CASTRO et al., 2004).

Exercem também uma importante função na fisiologia humana, atuando na estrutura, na composição e na permeabilidade das membranas e das paredes celulares. São os componentes majoritários do tecido adiposo, que serve de isolamento para o organismo e como proteção para os órgãos internos, contribuindo ao mesmo tempo para a configuração do corpo. Além disso, desempenham importantes papéis tecnológicos como emulsificantes, texturizantes, aromatizantes, umectantes e são transmissores de calor a alta temperatura (ORDÓÑEZ et al., 2005).

2.1. Fontes de óleos e gorduras

Os óleos e gorduras podem ser de origem animal, vegetal ou mesmo microbiana (TURATTI, 2002). Embora o óleo mais consumido no Brasil seja o óleo de soja, a produção mundial de óleos vegetais em 2007 foi de 113,6 milhões de toneladas. O mercado cresce continuamente a taxas de aproximadamente 5% ao ano e, devido ao avanço na produção de biodiesel para o ano safra de 2007/2008, a estimativa de aumento da produção é de 6,5 milhões de toneladas. O aumento do consumo foi estimado em 9 milhões de toneladas. Portanto, houve um *déficit* a ser coberto com os estoques e o preço dos principais óleos vegetais aumentou mais de 40% este ano (BIODIESEL, 2007).

Os óleos vegetais mais comuns, cuja matéria-prima é abundante no Brasil, são: soja, milho, amendoim, algodão, babaçu e palma (FERRARI; OLIVEIRA; SCABIO, 2005). Aproximadamente 80% dos óleos vegetais produzidos são usados em alimentos e envolvem óleos para saladas, frituras, maioneses e margarinas, já os 20% restantes são dirigidos para aplicações industriais que incluem detergentes, cosméticos, lubrificantes, tintas, vernizes e plásticos (RIBEIRO et al., 2005).

2.2. Óleo de soja

O feijão soja (*Glycine max*) é um dos mais antigos produtos agrícolas que o homem conhece, pois foi domesticado pelos chineses há cerca de 5.000 anos. No Brasil, o grão chegou com os primeiros imigrantes japoneses em 1908, mas foi introduzido oficialmente no Rio Grande do Sul em 1914. Porém, a expansão da soja no Brasil aconteceu nos anos 70, com o interesse crescente da indústria de óleo e demanda do mercado internacional.

A soja é um produto agrícola de grande interesse mundial graças à versatilidade de aplicação de seus produtos na alimentação humana e animal e ao seu valor econômico nos mercados nacional e internacional (MELO FILHO et al., 2004).

O Brasil é responsável por cerca de 28% da produção mundial de soja, com a safra de 2007 ao redor de 57 milhões de toneladas. O país é o segundo maior produtor e exportador mundial de soja em grão, farelo e óleo (ABIOVE, 2008).

O óleo de soja é composto por cerca de 59,8% de ácidos graxos poliinsaturados (ácidos linoléico e linolênico), 23,6% de ácidos graxos monoinsaturados (ácido oléico) e 16,6% de ácidos graxos saturados (ácidos palmítico e esteárico) (MALACRIDA; JORGE, 2003).

2.3. Composição química

Óleos e gorduras são compostos basicamente formados por triacilgliceróis, cuja estrutura química está representada na Figura 1. Os triacilgliceróis podem ser formados por três ácidos graxos iguais ou, geralmente diferentes, que podem ser saturados ou insaturados, sendo os últimos mais reativos devido às duplas ligações.

As demais substâncias dos óleos e gorduras presentes nos sistemas biológicos e alimentares representam 5%, as quais são constituídas por uma mistura de tri, di e monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios e esteróis.

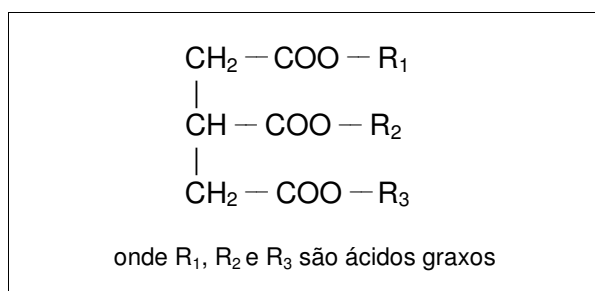


Figura 1 – Estrutura química dos triacilgliceróis.

2.4. Ácidos graxos

Ácidos graxos são ácidos orgânicos com moléculas lineares que podem ter de 4 a 26 carbonos em sua estrutura, são formados por cadeia reta de hidrocarbono com um grupo carboxila em um extremo e um grupo metila no outro (SHILS et al., 2002). São classificados em saturados, monoinsaturados, com uma dupla ligação, e poliinsaturados, com mais de uma dupla ligação. Essa diferença de tamanho, grau e posição da insaturação na molécula confere propriedades físicas, químicas e nutricionais diferentes (BELITZ; GROSCH, 1997).

Ocorrem na natureza como substâncias livres e esterificadas e os que

ocorrem com mais freqüência na natureza são conhecidos pelos seus nomes comuns, como nos casos dos ácidos butírico, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico, behênico, entre os saturados, oléico, linoléico, linolênico, araquidônico e erúcico, que pertencem ao grupo dos ácidos graxos insaturados (MORETTO; FETT, 1998).

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, erúcico – 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 se classificam como essenciais e não são sintetizados pelos seres humanos e, sobretudo, apresentam um papel fundamental na saúde humana (VAZ et al., 2006).

Os ácidos graxos essenciais para o ser humano são os ácidos da família ω -3 que compreende o ácido graxo essencial (alfa-linolênico – C18:3), do qual, por alongamento e dessaturação, são gerados os ácidos eicosapentaenóico (EPA – C20:5) e ácido docosahexaenóico (DHA – C22:6). A família ω -6 compreende o ácido graxo essencial linoléico, que pode originar o ácido araquidônico (C20:4) (LIRA et al., 2004).

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

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

Ácidos graxos	Concentração (%)
Láurico, C12:0	ND – 0,1
Mirístico, C14:0	ND – 0,2
Palmítico, C16:0	8,0 – 13,5
Palmitoléico, C16:1	ND – 0,2
Esteárico, C18:0	2,0 – 5,4
Oléico, C18:1	17,0 – 30,0
Linoléico, C18:2	48,0 – 59,0
Linolênico, C18:3	4,5 – 11,0
Araquídico, C20:0	0,1 – 0,6
Gadoléico, C20:1	ND – 0,5
Behênico, C22:0	ND – 0,7
Erúcico, C22:1	ND – 0,3
Lignocérico, C24:0	ND – 0,5

Fonte: CODEX-STAN 210, 2005.

2.5. Compostos minoritários

Os óleos vegetais apresentam compostos minoritários como fosfolipídios, traços de carboidratos, ácidos graxos livres e produtos de degradação dos ácidos graxos. Além disso, na fração correspondente à matéria insaponificável estão presentes os esteróis, tocoferóis, carotenóides, hidrocarbonetos e ceras (RIBEIRO et al., 2005).

De acordo com Rupérez et al. (2001), os óleos vegetais possuem quantidades diferentes de vitamina E e os teores de tocoferol e tocotrienol, 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 (CODEX-STAN 210, 2005.)

3. OXIDAÇÃO LIPÍDICA

A oxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, tornando os alimentos impróprios para consumo, além de também

provocar outras alterações que irão afetar não só a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, mas também a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos potencialmente tóxicos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

O mecanismo da oxidação lipídica é tradicionalmente descrito por diferentes caminhos:

- *Reações hidrolíticas*

As reações hidrolíticas são catalisadas pelas enzimas lipases, presentes nas sementes oleaginosas, ou pela ação de calor e umidade, com formação de ácidos graxos livres, que aumentam a acidez do óleo e, em menor quantidade, a formação de metilcetonas e lactonas, podendo produzir aromas desagradáveis (MORETTO; FETT, 1998; O'BRIEN, 1998).

- *Oxidação enzimática*

A oxidação por via enzimática ocorre pela ação das enzimas lipoxigenases que atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poliinsaturada. O resultado é a formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas que podem envolver-se em diferentes reações degradativas (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

- *Fotoxidação*

O mecanismo de fotoxidação de gorduras insaturadas é promovido essencialmente pela radiação UV em presença de fotossensibilizadores (clorofila, mioglobina, riboflavina e outros), que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o oxigênio tripleto ($^3\text{O}_2$), gerando o estado singlete ($^1\text{O}_2$) (BERGER; HAMILTON, 1995).

O oxigênio singlete reage diretamente com as ligações duplas por adição, formando hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência de luz e de sensibilizadores, e que por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (SÁ; OLIVEIRA; REGITANO D'ARCE, 2004).

● *Autoxidação*

A autoxidação é o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras (WENG; WANG, 2000).

Segundo Ordóñez et al. (2005), o mecanismo de oxidação é uma das principais reações de deterioração dos alimentos, implicando no aparecimento de sabores e odores desagradáveis. Essa reação de deterioração provoca redução no valor nutritivo do alimento, como consequência da perda de ácidos graxos essenciais, sendo alguns produtos, resultantes da reação, potencialmente tóxicos.

De acordo com Jadhav et al. (1996), a oxidação dos óleos e gorduras está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados e ocorre conforme as etapas ilustradas na Figura 2.

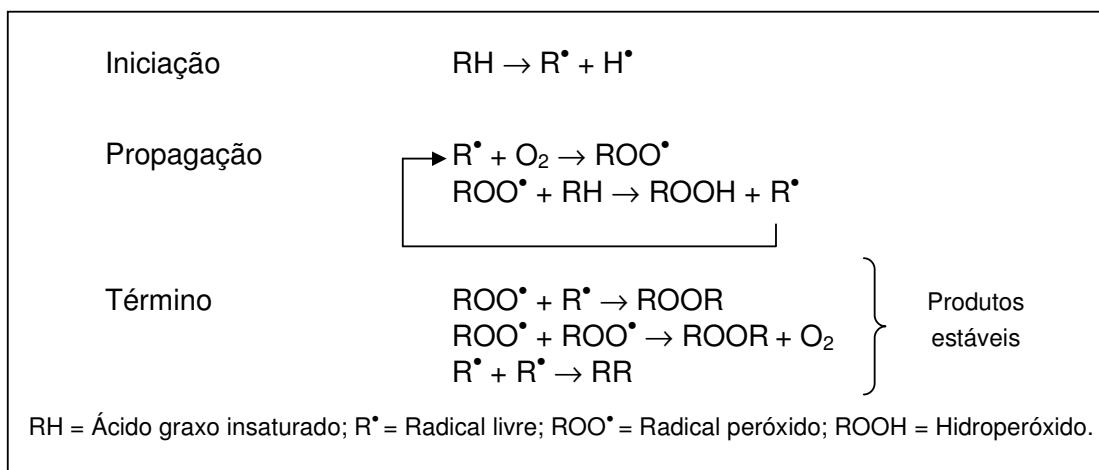


Figura 2 – Mecanismo de reação da oxidação lipídica.

Na etapa da iniciação, ocorre a formação de radicais livres devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo, em condições favorecidas por luz e calor. Na propagação, os radicais livres (moléculas susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico) são convertidos em (outros radicais) produtos primários da oxidação lipídica (peróxidos e hidroperóxidos). Os radicais livres formados atuam como propagadores da reação, resultando num processo autocatalítico. No término, os radicais combinam-se formando produtos estáveis (produtos secundários de oxidação), obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não-voláteis) (MELO; GUERRA, 2002).

Para prevenir a autoxidação de óleos/gorduras, há a necessidade de

diminuir a incidência de todos os fatores que a favorecem, mantendo ao mínimo os níveis de energia, temperatura e luz, que são responsáveis pelo desencadeamento do processo de formação de radicais livres, evitando a presença de traços de metais no óleo, evitando ao máximo o contato com o oxigênio e bloqueando a formação de radicais livres por meio de antioxidantes, os quais, em pequenas quantidades, atuam interferindo nos processos de oxidação de lipídios (JORGE; GONÇALVES, 1998).

4. AVALIAÇÃO OXIDATIVA DE ÓLEOS E GORDURAS

4.1. Teste acelerado em estufa

Os métodos de determinação da estabilidade oxidativa surgiram a partir de uma tentativa de prever a vida de prateleira de óleos e gorduras, pois o acompanhamento das alterações ocorridas nestes produtos, nas condições de armazenamento, é lento e pode consumir grande quantidade de reagentes (GORDON, 2003). A dificuldade, porém, está em trabalhar com temperaturas que possibilitem correlações com o comportamento ao ambiente.

A estabilidade de óleos adicionados de antioxidantes pode ser avaliada pela sua estocagem em condições normais de armazenamento e em condições aceleradas, nas quais análises periódicas são realizadas para acompanhar alterações químicas, físicas ou sensoriais. Além disso, podem-se mensurar alterações primárias e secundárias; contudo, não há um padrão para detectar alterações oxidativas em todos os tipos de alimentos. Os métodos mais utilizados são o Método do Oxigênio Ativo (AOM) e o teste em estufa ("Schaal Oven Test") (DUTTON, 1978; FARIA, 1994).

Para se avaliar a estabilidade oxidativa ou a sua susceptibilidade à oxidação, o óleo (ou gordura) é submetido ao teste de oxidação acelerada, sob condições padronizadas, em que um ponto final é escolhido. Este ponto corresponde ao estado em que se observam sinais de deterioração oxidativa. Para acelerar a oxidação, os testes incluem elevação de temperatura, adição de metais, aumento da pressão de oxigênio, estocagem sob luz e agitação. Porém, o aquecimento é o meio mais utilizado e eficiente (FRANKEL, 1993; WAN, 1995).

O teste acelerado em estufa pode ser avaliado de acordo com os índices de peróxidos, análise sensorial, determinação de dienos conjugados, análise de

voláteis, entre outros (DROZDOWSKI; SZUKALSKA, 1987).

No teste acelerado em estufa, 50 a 100 gramas de óleo são mantidos a 60 – 70°C em estufa termostatizada até o aparecimento dos primeiros sinais de oxidação. As amostras são examinadas em intervalos de tempo regulares, avaliando-se o estado de oxidação do produto sensorialmente ou, de modo alternativo, pela determinação do índice de peróxidos. Ao detectar sensorialmente o primeiro sinal de rancidez ou mudança no índice de peróxidos, determina-se a estabilidade oxidativa, medida em dias ou horas (ANTONIASSI, 2001).

Gámez-Meza et al. (1999) utilizaram óleo de soja com extrato de bagaço de uva em três diferentes concentrações de fenólicos totais (0,1; 0,3 e 0,5%), submetido ao método de estufa a 60°C por um período de 21 dias, encontrando forte inibição da oxidação para as concentrações de 0,3 e 0,5%.

Rehman (2006) realizou pesquisas com o óleo de milho adicionado de extrato de cascas de citros submetido ao teste acelerado em estufa a 25 e 45°C, por 6 meses. Os resultados após o período de estocagem estudado exibiram forte atividade antioxidante em comparação com os antioxidantes sintéticos, BHA e BHT.

4.2. 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 desta 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, correspondendo àqueles usados nas frituras em fritadeiras domésticas e em frigideiras, respectivamente (JORGE; JANIERI, 2005; MALACRIDA; JORGE, 2006).

A termoxidação pode ser avaliada, quanto à formação de compostos oxidativos, devido à formação dos ácidos graxos livres, dienos conjugados,

compostos polares, viscosidade, ponto de fumaça, cor, índice de refração, estabilidade oxidativa, índice de iodo, índice de peróxidos e vários outros compostos. Entretanto, a determinação dos compostos polares totais em gorduras de frituras é a mais indicada para mensurar com maior confiabilidade o grau de deterioração de óleos (TYAGI et al., 1996).

Shyamala et al. (2005) utilizaram o processo de termoxidação a 180°C de extratos etanólicos de folhas de vegetais em óleo de girassol para avaliar a capacidade antioxidante e a proteção contra os processos oxidativos, simulando, da mesma forma, o processo de fritura por imersão.

5. ANTIOXIDANTES

O uso de antioxidantes na indústria de alimentos e seus mecanismos funcionais têm sido amplamente estudados. 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 vida de prateleira do produto frito. Portanto, nas últimas décadas, alguns aditivos vêm adquirindo importância significativa, devido à sua contribuição, tanto na diminuição da deterioração de gorduras, como no aumento da vida útil do produto no mercado. Dentro deste contexto, os antioxidantes têm lugar de destaque, cuja efetividade como inibidor das reações autoxidativas durante armazenamento, processamento e utilização de gorduras é indiscutível e conduz sua autorização como aditivos usados em quantidades limitadas (SOUZA, 2001).

Embora em sua grande maioria os antioxidantes apresentem pouca estabilidade frente à exposição em 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, para se obter produtos fritos de melhor qualidade organoléptica e ao mesmo tempo de maior estabilidade e também para permitir um prolongamento da vida útil dos óleos (MONFERRER; VILLALTA, 1993; MUKAI et al., 1993).

5.1. Classificação e mecanismo de ação

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que,

presente em baixas concentrações quando comparada à do substrato oxidável, retardam ou inibem significativamente a oxidação daquele substrato, diminuindo a velocidade de reação ou prolongando a sua estabilidade oxidativa (MOURE et al., 2001).

O antioxidante, para ser empregado em alimentos, além de ser efetivo em baixa concentração, deve atender aos seguintes requisitos: ser compatível com o substrato, não conferir odor ou sabor estranho ao produto, ser efetivo durante o período de estocagem do produto alimentício, ser estável ao processo de aquecimento e ser facilmente incorporado ao alimento (MELO; GUERRA, 2002).

Os antioxidantes, segundo o mecanismo de ação, são classificados em antioxidantes primários e secundários. Os primários são compostos, como por exemplo os de estrutura fenólica que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (SIMIC; JAVANOVIC, 1994). Madhavi e Salunkhe (1995) apresentaram o mecanismo de ação para os antioxidantes primários, representado na Figura 3.

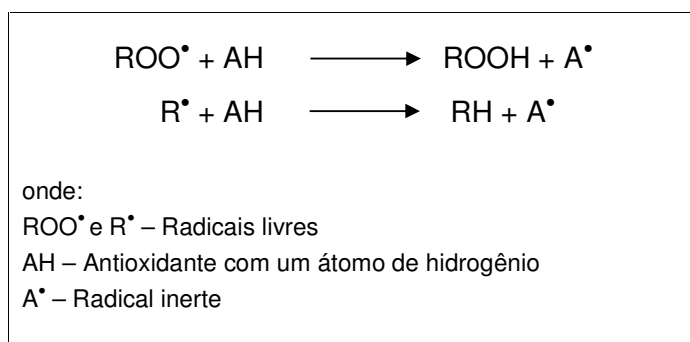


Figura 3 – Mecanismo de ação dos antioxidantes primários.

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é seqüestrado pelos radicais livres R^{\bullet} e ROO^{\bullet} com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas. Assim, formam-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte (A^{\bullet}) procedente do antioxidante. Este radical, estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas.

Os principais antioxidantes primários são: butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), galato de propila (GP), terc-butilhidroquinona (TBHQ), e tocoferóis (DUBINSKY, 2000).

Os antioxidantes secundários contribuem para retardar a autooxidação por mecanismos diferentes aos dos antioxidantes primários (DUBINSKY, 2000; PRATT, 1996). 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).
- Removedores de oxigênio – atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis, tornando-os, conseqüentemente, indisponíveis para atuar como propagadores da autooxidação. Ácido ascórbico e palmitato de ascorbila são os melhores exemplos deste grupo.
- Compostos que decompõem os hidroperóxidos – formam produtos finais estáveis, como os fosfolipídios em determinadas condições.
- Compostos que regeneram os antioxidantes primários – como o ácido ascórbico, que regenera o α -tocoferol.

5.2. Tipos de antioxidantes

● *Antioxidantes sintéticos*

Os antioxidantes sintéticos de estrutura fenólica (Figura 4) como BHA, BHT, GP e TBHQ são os mais utilizados na indústria de alimentos para diminuir a fase de propagação da reação de oxidação. Entretanto, apresentam o inconveniente de serem voláteis e facilmente decompostos em altas temperaturas (MARTÍNEZ-TOMÉ et al., 2001).

O BHA é muito estável em gorduras animais e em óleos vegetais, sendo um dos antioxidantes mais eficazes. É bastante estável aos tratamentos aplicados aos alimentos e muito eficaz em gorduras animais e óleos vegetais. Apresenta, porém, o inconveniente de ser ligeiramente volátil e, por isso, pode evaporar e perder-se parcialmente nos processos de desidratação e destilação; ainda assim, o BHA residual pode revelar-se como um ativo antioxidante (ORDÓÑEZ et al., 2005).

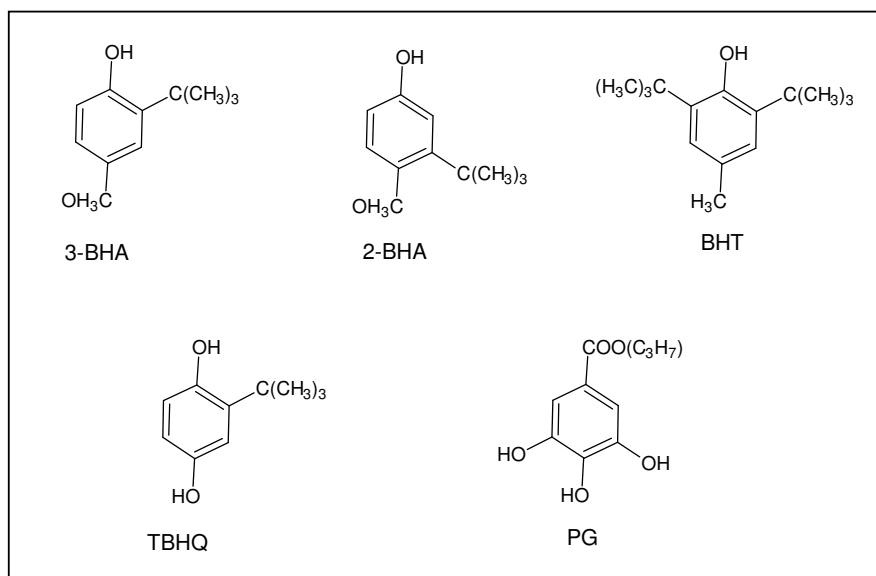


Figura 4 – Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos.

O BHT, assim como o BHA, é solúvel em gorduras e resiste bem ao calor. É mais volátil que o BHA e, por essa razão, no caso do preparo de alimentos desidratados, é utilizado em combinação com ele. Esse antioxidante é mais eficaz em gorduras animais do que em óleos vegetais. Seu odor é um pouco desagradável (ORDÓÑEZ et al., 2005).

O BHA e o BHT são sinergistas entre si. O BHA age como seqüestrante de radicais peróxidos, enquanto o BHT age como sinergista, ou regenerador de radicais BHA (RAMALHO; JORGE, 2006a).

GP é mais solúvel em água do que nas gorduras, é pouco resistente ao calor, não suportando tratamentos de cocção. Junto com o ferro, dá origem a sais de cor azul-escura que podem provocar efeitos adversos durante o armazenamento dos óleos. Tem uma concentração ótima de atividade como antioxidante, e quando usado em níveis elevados pode atuar como pró-oxidantes (ORDÓÑEZ et al., 2005).

TBHQ é um pó cristalino branco e brilhante, moderadamente solúvel em óleos e gorduras e não se complexa com íons de cobre e ferro como o galato. É considerado, em geral, mais eficaz em óleos vegetais que BHA ou BHT; em relação à gordura animal, é tão efetivo quanto o BHA e mais efetivo que o BHT ou o GP (ORDÓÑEZ et al., 2005). O TBHQ é considerado também o melhor antioxidante para óleos de fritura, pois resiste ao calor e proporciona uma excelente estabilidade para os produtos acabados. Ácido cítrico e TBHQ apresentam excelente sinergismo em óleos vegetais (RAMALHO; JORGE, 2006a).

Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade desses 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; RICHARD; BERSET, 1996).

O TBHQ não é permitido no Canadá e na Comunidade Econômica Européia (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002). No Brasil, o uso de antioxidantes é controlado pelo Ministério da Saúde que limita em 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 e frutas. 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 testadas. 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 não prova sua assumida segurança (MOURE et al., 2001).

● *Antioxidantes naturais*

Os antioxidantes naturais podem ser encontrados e isolados de uma variedade de alimentos. Entre as fontes de antioxidantes naturais estão incluídos algas marinhas (RAYMUNDO; HORTA; FETT, 2004), café e cacau (DELGADO-ANDRADO; MORALES, 2005; OTHMAN et al., 2007), cereais (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2005), cogumelos (ELMASTAS et al., 2007), ervas e especiarias (YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNÝ; 2006), grãos e sementes de oleaginosas (NAMIKI, 1990; TSUDA et al., 1993), hortaliças (MELO et al., 2006), plantas medicinais (SOUSA et al., 2007), sementes de frutas cítricas (PEREIRA, 1996).

As substâncias presentes nessas fontes naturais, que são capazes de agir como antioxidantes, são minerais (principalmente enzimas), vitaminas e compostos fenólicos. Dentre os mais importantes, sob o ponto de vista tecnológico, pode-se citar os tocoferóis, os carotenóides, alguns ácidos orgânicos como cítrico e ascórbico, e os flavonóides. Os extratos de frutas cítricas como o limão são importantes fontes de ácidos fenólicos, como o ácido hidroxicinâmico e de flavonóides (flavononas e flavonóis) (DIMITRIOS, 2006; ECONOMOS; CLAY, 1999).

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

5.3. Sinergismo

Os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada com eles, sendo o ácido cítrico o mais conhecido. Alguns antioxidantes primários, quando usados em combinação, podem atuar sinergisticamente (POKORNÝ, 2007).

Vários estudos têm sido conduzidos com o intuito de investigar o sinergismo entre antioxidantes (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000; PEREIRA, 1996; RAMALHO; JORGE, 2006a).

Segundo Almeida-Doria e Regitano-D'Arce (2000), os antioxidantes naturais e suas misturas, extrato etanólico de orégano e de alecrim, apresentaram eficiência semelhante à mistura dos antioxidantes sintéticos BHT e BHA.

Em estudo realizado por Pereira (1996), os resultados mostraram que a mistura dos extratos metanólicos de citros com a solução de BHT reduziu em 50% o uso do antioxidante sintético para se obter os mesmos níveis de inibição de oxidação encontrados para o BHT utilizado isoladamente.

De acordo com Ramalho e Jorge (2006b), a associação do extrato de alecrim com α -tocoferol promoveu maior estabilidade e menor formação de compostos polares em óleo de soja purificado submetido ao aquecimento a 180°C por 10 horas, sendo uma alternativa viável para reduzir a degradação térmica e oxidativa de óleos e gorduras.

5.4. Efeitos na saúde humana

Alguns pesquisadores relataram que antioxidantes sintéticos na alimentação humana têm causado câncer em experimentos com animais (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002). 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).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, vários estudos têm sido conduzidos com a finalidade de substituí-los por antioxidantes naturais ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos (SOARES, 2002). Além disso, estudos epidemiológicos sugerem que antioxidantes naturais podem ser benéficos ao organismo humano, prevenindo doenças (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002). Porém, faz-se necessário submeter estes antioxidantes a testes toxicológicos.

O organismo humano produz alguns antioxidantes endógenos e outros podem ser consumidos através da alimentação. A maioria dos fenólicos possui a capacidade de reagir com radicais livres e exercer funções antioxidantes no organismo (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005).

Jeong et al. (2005) estudaram o efeito da ingestão do BHA nas funções do sistema reprodutivo de camundongos machos e fêmeas. Foi demonstrado neste estudo que, em altas doses, o BHA provocou disfunções no sistema reprodutivo dos animais e alterações nos níveis hormonais.

6. FRUTAS CÍTRICAS – LIMÃO

O limão é uma fruta cítrica rica em vitaminas, principalmente vitamina C, fibras e potássio (FERRARI; TORRES, 2002). É extensamente cultivado em pomares e viveiros, pois induz a maturação precoce das frutas, proporcionando melhores preços no início da safra. É utilizado para a fabricação de sucos naturais e concentrado, além de ser tecnologicamente usado como flavorizante em alimentos, devido ao óleo essencial presente em sua casca (REDA et al., 2005).

O Brasil se destaca como o segundo maior produtor de frutas cítricas e o maior exportador de sucos cítricos. A produção brasileira de limão está localizada no

Estado de São Paulo, sendo o primeiro produtor destes frutos, representando 81,3% da produção, seguido pelo Rio de Janeiro e Bahia com 3,9 e 2,7%, respectivamente.

Grande parte do resíduo sólido das sementes de limão é uma fonte inexplorada de óleo que pode alcançar 55% de rendimento (FERNANDES et al., 2002). Este óleo pode ser aproveitado pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética.

As frutas cítricas são conhecidas por conterem antioxidantes naturais no óleo, na polpa, na semente e na casca (PEREIRA, 1996).

Em pesquisa realizada por Ajewole e Adeyeye (1993), óleos de sementes cítricas apresentaram propriedades físico-químicas e composição de ácidos graxos comparáveis aos óleos vegetais de boa qualidade, podendo ser utilizados para o consumo humano. Verificou-se que os óleos destas sementes são compostos basicamente por triacilgliceróis e, em menor quantidade, por ácidos graxos livres, hidrocarbonetos, esteróis e matéria não-gordurosa, como limonina e naringina. Também podem apresentar compostos com atividade biológica, como limonóides e seus glicosídeos, que causam inibição de tumor cancerígeno induzido em ratos, camundongos e *hamsters* (SCHMANDKE, 2003).

Segundo Pereira (1996), os resultados obtidos dos extratos metanólicos de sementes de frutas cítricas, como o limão, indicaram atividade antioxidante inibindo o processo oxidativo em 73,4%.

Em outro estudo, realizado por Kang et al. (2006), observou-se que as frutas cítricas são ricas em compostos fenólicos, sendo estas frutas de interesse industrial em retardar a oxidação e melhorar a qualidade nutricional dos alimentos.

7. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os fitoquímicos derivados de fenilalanina e tirosina, que apresentam um anel aromático com uma ou mais hidroxila, recebem a denominação de compostos fenólicos e, geralmente, apresentam propriedade antioxidante. Dentre eles, destacam-se os flavonóides, os ácidos fenólicos e o tocoferol como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (MELO; GUERRA, 2002).

Esses compostos encontram-se largamente em plantas, como em cascas e sementes de frutas cítricas (BOCCO et al., 1998). Os fenólicos, em plantas, são essenciais no crescimento e na reprodução dos vegetais, além de atuarem como

agente antipatogênico e contribuírem na pigmentação (SHAHIDI; NACZK, 1995). Em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência, aroma (PELEG; BODINE; NOBLE, 1998) e estabilidade oxidativa (NACZK; SHAHIDI, 2004).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente à sua propriedade redutora e estrutura química. Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias (CHUN et al., 2005; HASLAM, 1996; SOARES, 2002).

Segundo Decker (1997), as propriedades benéficas dos compostos fenólicos podem ser atribuídas à sua capacidade de seqüestrar os radicais livres. Os compostos fenólicos mais estudados são: os ácidos caféico, gálico e elágico. Esses compostos de considerável importância na dieta podem inibir o processo de peroxidação lipídica (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

7.1. Flavonóides

Os flavonóides são compostos largamente distribuídos no reino vegetal e encontram-se presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas (MELO; GUERRA, 2002). São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono, organizados na configuração $C_6-C_3-C_6$.

A estrutura química dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos, denominados A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 6).

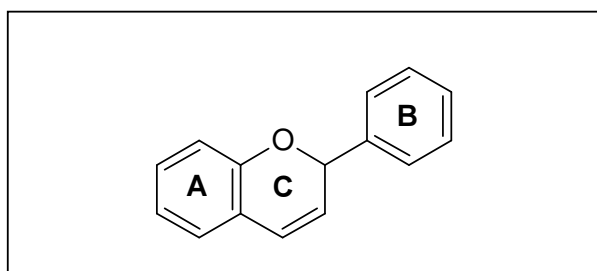


Figura 6 – Estrutura química dos flavonóides.

O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina (MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002). As variações na substituição do anel C padrão resultam na divisão dos flavonóides em 14 classes, sendo os que se incluem na dieta humana divididos essencialmente em 6 grupos:

- Flavanóis – possuem um grupo hidroxila na posição 3. Exemplos: catequina e epicatequina;
- Flavonóis – possuem um grupo carbonila na posição 4, um grupo hidroxila na posição 3 e uma ligação dupla entre as posições 2,3. Exemplos: quercitina, campferol e quercitagetina;
- Flavonas – possuem um grupo carbonila na posição 4 e uma ligação dupla entre as posições 2 e 3. Exemplos: rutina, apigenina, luteolina;
- Antocianidinas – possuem um grupo hidroxila na posição 3 e duas ligações duplas, uma entre o átomo de oxigênio e o carbono 2 e a outra entre os carbonos 3 e 4. Exemplos: cianidina, petunidina, malvidina;
- Isoflavonóides – possuem um grupo carbonila na posição 4 e o anel B encontra-se ligado ao restante da molécula através do carbono 3. Exemplos: genisteína, coumestrol;
- Flavononas – possuem um grupo carbonila na posição 4. Exemplos: miricetina, hesperidina, naringina, naringenina.

7.2. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes para os vegetais (SOARES, 2002).

Os ácidos fenólicos consistem em dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico e derivados do ácido hidroxicinâmico (Figura 7). Os ácidos hidroxibenzóicos incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecúico, vanílico e sirínico, que têm estrutura comum, C₆-C₁ (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006); enquanto os ácidos hidroxicinâmicos, são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C₆-C₃), como os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e sináptico, sendo os mais comuns (BRAVO, 1998).

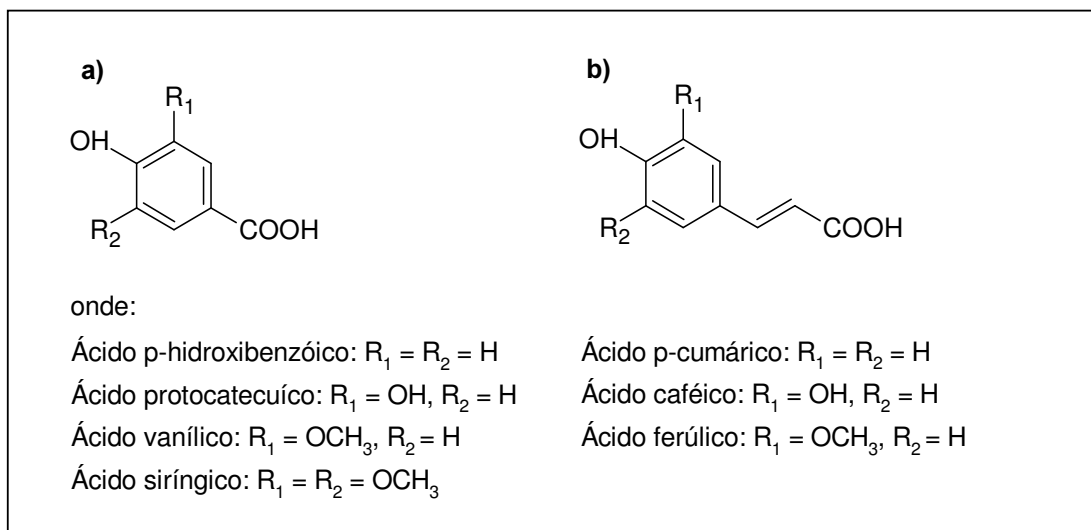


Figura 7 – Estrutura química dos ácidos hidroxibenzóicos (a) e hidroxicinâmicos (b).

Os ácidos sináptico, ferúlico e *p*-cumárico são antioxidantes mais ativos do que os derivados do ácido benzóico, tais como ácido protocatecuíco, siríngico e vanílico (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006). Isso se deve à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico, que participa da estabilidade do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, enquanto os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica (WANASUNDARA; AMAROWICZ; SHAHIDI, 1994).

Em um estudo para avaliação do potencial dos ácidos caféico, protocatequínico, *p*-hidroxibenzóico, ferúlico e *p*-cumárico em banha, na concentração de 200 mg/kg, utilizando o método Rancimat à temperatura de 90°C, os ácidos caféico e protocatequínico apresentaram atividade antioxidante maior que o α -tocoferol e o BHT na mesma concentração (GADOW; JOUBERT; HANSMANN, 1997).

7.3. Tocoferóis

Os tocoferóis são compostos que compreendem o grupo da vitamina E, considerado um dos melhores antioxidantes naturais amplamente aplicados como meio para inibir a oxidação dos óleos e gorduras comestíveis, prevenindo a oxidação dos ácidos graxos insaturados (JORGE; GONÇALVES, 1998).

Os óleos vegetais são fontes importantes de tocoferol, como óleo de girassol, milho, algodão, soja, oliva e amendoim (VALENZUELA; SANHUEZA; NIETO, 2003).

Existem, basicamente, oito formas de vitamina E, agrupadas em duas séries de compostos com estrutura química semelhante e recebem o nome de α -, β -, γ -, δ -tocoferol e α -, β -, γ -, δ -tocotrienol, (Figura 8). Os compostos da série tocoferóis possuem cadeia saturada ligada ao anel, enquanto que os da série tocotrienóis possuem cadeia insaturada (CERT; MOREDA; PÉREZ-CAMINO, 2000).

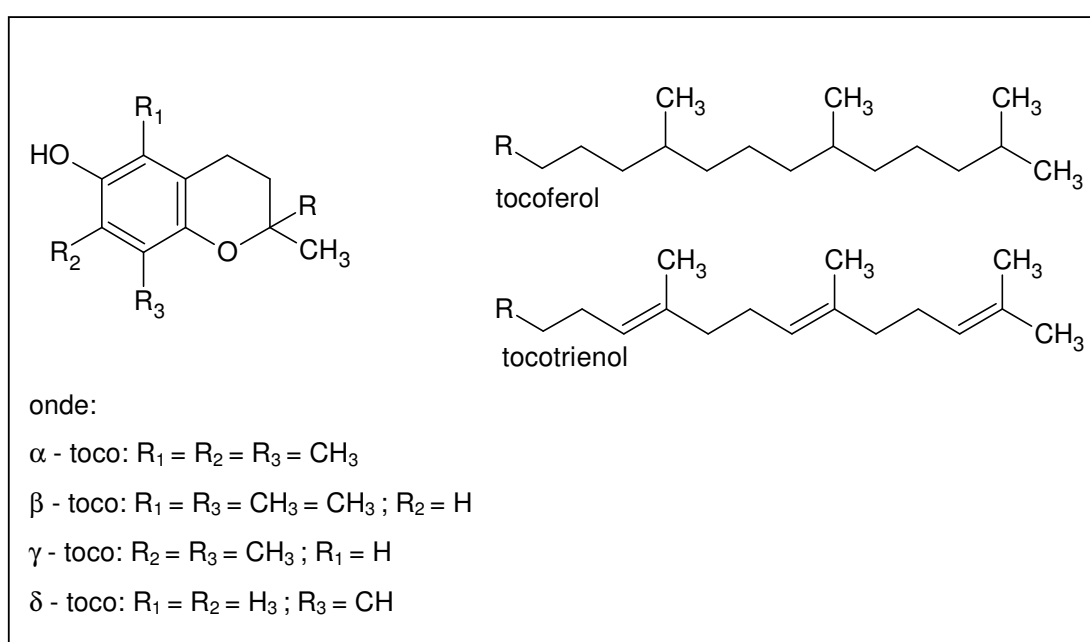


Figura 8 – Estrutura química do tocoferol e tocotrienol.

A capacidade antioxidante dos tocoferóis se dá principalmente devido à capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos, interrompendo a propagação em cadeia. A atividade antioxidante dos tocoferóis decresce do composto δ - para o α -tocoferol, assim, o δ -tocoferol é o mais efetivo antioxidante, o β - e γ -tocoferol têm atividade intermediária e o α -tocoferol apresenta a mais baixa atividade antioxidante, porém, este é o mais abundante na natureza (HEMEDA; KLEIN, 1990; SIX, 1994).

O poder antioxidante dos tocoferóis deve-se à sua capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais lipídicos livres, formando um hidroperóxido e um

radical tocoferoxila. O radical tocoferoxila tem uma menor capacidade de propagar a peroxidação lipídica se comparado com o radical peroxila. Ao invés disso, o radical tocoferoxila reage com outro peroxila ou radical tocoferoxila, formando produtos mais estáveis (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2003).

Warner, Neff e Eller (2003) sugerem que a atividade antioxidante relativa dos tocoferóis depende de vários parâmetros como: temperatura, composição, tipo de gordura e concentração de tocoferóis.

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

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A oxidação lipídica é uma das principais alterações que afetam tanto óleos ou gorduras como um alimento que os contêm. As reações químicas envolvidas nesse processo são muito complexas e geram, em estágios mais avançados, produtos sensorialmente inaceitáveis. A aplicação de antioxidantes, em termos técnicos, é um dos caminhos mais simples para reduzir a oxidação de óleos/gorduras. Desta maneira, o poder antioxidante pode ser representado por vários vegetais, como frutas, folhas, sementes, especiarias e plantas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em: <http://www.abiove.com.br>. Acesso em: 11 abr. 2008.

AJEWOLE, K.; ADEYEYE, A. Characterization of Nigerian citrus seed oils. **Food Chemistry**, London, v. 47, n. 1, p. 77-78, 1993.

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. 1-14, 2000.

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.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3. ed. Viçosa: Editora UFV, 2004. 480 p.

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

BELITZ, H. D.; GROSCH, W. **Química de los alimentos**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 1997. p. 68-70.

BERGER, K. G.; HAMILTON, R. J. (Ed.) **Developments in oils and fats**. London: Chapman & Hall, 1995, cap. 7.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIODIESEL. O NOVO COMBUSTÍVEL DO BRASIL. Disponível em: <http://www.biodiesel.com.br>. Acesso em: 17 maio. 2007.

BOCCO, A. et al. Antioxidant activity and phenolics composition of citrus peel and seed extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 6, p. 2123-2129, 1998.

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, n. 1, p. 599-605, 2000.

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.

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

CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 146-156, 2004.

CERT, A.; MOREDA, W.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 881, n. 1-2, p. 131-148, 2000.

CHUN, S. S. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 4, p. 809-816, 2005.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (FAO/WHO). Codex Standards for vegetable oils, CODEX STAN 210 - 2005. Codex Alimentarius, Roma, Itália, rev. 3, 2005.

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**, Champaign, v. 73, n. 5, p. 645-652, 1996.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v. 55, n. 11, p. 396-407, 1997.

DELGADO-ANDRADO, C.; MORALES, F. J. Unraveling the contribution of melanoidins to the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 5, p. 1403-1407, 2005.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolics antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, Guildford, v. 17, n. 9, p. 505-512, 2006.

DROZDOWSKI, B.; SZUKALSKA, E. A rapid instrumental method for the evaluation of the stability of fats. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 64, n. 7, p. 1008-1011, 1987.

DUBINSKY, E. Utilización de antioxidantes en aceites y grasas. **Aceites y Grasas**, Sevilla, v. 12, n. 1, p. 191-199, 2000.

DUTTON, H. J. Analysis of fats and oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 55, n. 5, p. 806-808, 1978.

ECONOMOS, C.; CLAY, W. D. Nutritional and health benefits of citrus fruits. **Food, Nutrition and Agriculture**, Roma, v. 24, n. 1, p. 8-11, 1999.

ELMASTAS, M. et al. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3, p. 337-345, 2007.

FARIA, J. A. F. Antioxidantes e estabilidade de óleos comestíveis. **Óleos e Grãos**, Curitiba, v. 20, n. 4, p. 32-34, 1994.

FERNANDES, J. B. et al. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbiote. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1091-1095, 2002.

FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 3, p. 375-382, 2002.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 19-23, 2005.

FRANKEL, E. N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 4, n. 7, p. 220-225, 1993.

GADOW, V. A.; JOUBERT, E.; HANSMANN, C. F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*) α -tocoferol, BHT and BHA. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 3, p. 632-638, 1997.

GÁMEZ-MEZA, N. et al. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompson grape bagasse. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 76, n. 12, p. 1445-1447, 1999.

GORDON, M. Measuring antioxidant activity. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. (Ed.). **Antioxidants in food: practical applications**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2003. 71-84 p.

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

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.

HEMEDA, H. M.; KLEIN, B. P. Effects of naturally antioxidants on peroxidase activity of vegetable extracts. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 1, p. 184-185, 1990.

JADHAV, S. J. et al. Lipid oxidation in biological and food systems. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. **Food antioxidants: technological, toxicological and health perspectives**. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 5-63.

JEONG, S. H. et al. Effects of butylated hydroxyanisole on the development and functions of reproductive system in rats. **Toxicology**, Limerick, v. 208, n. 1, p. 49-62, 2005.

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.; JANIERI, C. Avaliação do óleo de soja submetido ao processo de fritura de alimentos diversos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 5, p. 1001-1007, 2005.

KANG, H. J. et al. Studies on the development of functional powder from citrus peel. **Bioresource Technology**, Essex, v. 97, n. 4, p. 614-620, 2006.

KARPINSKA, M.; BOROWSKI, J.; DANOWSKA, O. M. The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. **Food Chemistry**, London, v. 72, n. 1, p. 5-9, 2001.

LIRA, G. M. et al. Perfil de ácidos graxos, composição centesimal e valor calórico de moluscos crus e cozidos com leite de coco da cidade de Maceió-AL. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 529-537, 2004.

MADHAVI, D. L.; SALUNKHE, D. K. Antioxidants. In: MAGA, J.; TU, A. T. (Ed.). **Food additive toxicology**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 89-178.

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

MALACRIDA, C. R.; JORGE, N. Alterações do óleo de soja e da mistura azeite de dendê-óleo de soja em frituras descontínuas de batatas chips. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 245-249, 2003.

MALACRIDA, C. R.; JORGE, N. Influência da relação superfície/volume e do tempo de fritura sobre as alterações da mistura azeite de dendê-óleo de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 4, p. 724-730, 2006.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. et al. Los flavonóides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición Hospitalaria**, [S. l.], v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MARTÍNEZ-TOMÉ, M. et al. Antioxidant properties of mediterranean spices compared to common food additives. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n. 9, p. 1412-1419, 2001.

MELO FILHO, O. L. et al. Grain yield and seed quality of soybean selected for high protein content. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 445-450, 2004.

MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Campinas, v. 44, n. 2, p. 193-201, 2008.

MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.

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.

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, 1993.

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

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, London, v. 72, n. 2, 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.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.

NAMIKI, M. Antioxidants/ antimutagenics in food. Critical review. **Food Science Nutrition**, Cleveland, 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.

O'BRIEN, R. D. **Fats and oils: formulating and processing for applications**. Lancaster: Technomic Publishing, 1998. p. 204-211.

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

OTHMAN, A. et al. Antioxidant capacity and phenolics content of cocoa beans. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 4, p. 1523-1530, 2007.

PEARSON, D. A. et al. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. **Life Sciences**, Elmsford, v. 64, n. 5, p. 1913-1920, 1999.

PELEG, H.; BODINE, K. K.; NOBLE, A. C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 371-378, 1998.

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-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Literature data may underestimate the actual activity of cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 13, p. 5036-5040, 2005.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais**: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Varela, 2005. 95 p.

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

POOL-ZOBEL, B. L. et al. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 18, n. 9, p. 1847-1850, 1997.

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

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006a.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Atividade antioxidante do α -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 65, n. 1, p. 15-20, 2006b.

RAYMUNDO, M. S.; HORTA, P.; FETT, R. Atividade antioxidante *in vitro* de extratos de algumas algas verdes (Chlorophyta) do litoral catarinense (Brasil). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 495-502, 2004.

REDA, S. Y. et al. Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus limonia* Osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 672-676, 2005.

REHMAN, Z. Citrus peel extract – a natural source of antioxidant. **Food Chemistry**, London, v. 99, n. 3, p. 450-454, 2006.

REISCHE; D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. Antioxidants. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids**: chemistry, nutrition and biotechnology. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 489-516.

RIBEIRO, A. P. B. et al. Aplicações da tecnologia de membranas no processamento de óleos vegetais. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 23, n. 1, p. 1-22, 2005.

RUPÉREZ, F. J. et al. Chromatographic analysis of α -tocopherol and related

compounds in various matrices. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 45, n. 935, p. 45-69, 2001.

SÁ, J. T. G.; OLIVEIRA, B.; REGITANO D'ARCE, M. A. B. Determining economical TBHQ doses for corn oil stability. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 3, p. 413-418, 2004.

SCHMANDKE, H. Citrus limonoids – bitter principle and anticarcinogenic activity. **Ernaehrungs-Umschau**, [S. l.], v. 50, n. 11, p. 432-435, 2003.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Antioxidant properties of food phenolics. In: SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications**. Lancaster: Technomic Publishing, 1995. p. 235-277.

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

SHYAMALA, B. N. et al. Leafy vegetable extracts – antioxidant activity and effect on storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Berlin, v. 6, n. 2, p. 239-245, 2005.

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.

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.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

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.

TSUDA, T. et al. Antioxidant activity of pea bean (*Phaseolus vulgaris L.*). **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 70, n. 9, p. 909-913, 1993.

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

TYAGI, V. K et al. Changes in the characteristics and comparison of the oils during deep-fat frying. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 73, n. 4, p. 499-506, 1996.

VALENZUELA, A. B.; SANHUEZA, J.; NIETO, S. Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 54, n. 3, p. 295-303, 2003.

VAZ, J. S. et al. Ácidos graxos como marcadores biológicos da ingestão de gorduras. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 4, p. 489-500, 2006.

WAN, P. J. Accelerated stability methods. In: WARNER, K.; ESKIN, N. A. M. **Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods**. Champaign: AOCS Press, 1995. p. 179-189.

WANASUNDARA, U.; AMAROWICZ, R.; SHAHIDI, F. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 6, p. 1285-1290, 1994.

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, n. 2, p. 623-627, 2003.

WENG, X. C.; WANG, W. Antioxidant activity of compounds isolated from *Salvia plebeia*. **Food Chemistry**, London, v. 71, n. 4, p. 489-493, 2000.

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

YANISHLIEVA-MASLAROVA, N. V. Inhibiting oxidation. In: POKORNÝ, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. H. (Ed.). **Antioxidants in food**: practical applications. Cambridge: Woodhead Publishing, 2003. p. 22-70.

Capítulo 2

Potencial antioxidante de extratos de sementes de limão (*Citrus limon*)

RESUMO

O presente trabalho teve como principais objetivos avaliar o comportamento do óleo de soja adicionado de extratos de sementes de limão, em diferentes concentrações, por meio da estabilidade oxidativa e medir a atividade antioxidante através do método do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e compostos fenólicos totais. A concentração de 2.400 mg/kg para o extrato de sementes de limão, variedade galego, foi a que conferiu melhor estabilidade oxidativa ao óleo de soja. As atividades antioxidantes máximas e os valores da concentração suficiente para obter 50% do efeito máximo, estimado em 100% (EC_{50}), determinados pelo método DPPH para o extrato e ácido gálico foram 70,58%, 69,94 $\mu\text{g/mL}$ e 75,07%, 64,73 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A concentração de compostos fenólicos totais, determinada pelo método de Folin-Ciocalteu, foi de 76 mg EAG/g. Foi possível concluir, que o extrato de sementes de limão galego possui ação antioxidante natural, podendo ser aplicado em alimentos.

Palavras-chave: antioxidante natural; compostos fenólicos totais; estabilidade oxidativa.

1. INTRODUÇÃO

O retardo ou a prevenção da oxidação lipídica, uma das principais causas de deterioração no processo de aquecimento de óleos vegetais, pode ser realizado pela adição de antioxidantes, que mantêm a qualidade e prolongam a vida de prateleira do alimento (RAMALHO; JORGE, 2006).

No entanto, o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade. Sendo assim, pesquisas são realizadas para a busca de compostos naturais que apresentem esta propriedade funcional, podendo atuar como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e diminuir o uso dos antioxidantes sintéticos. Os antioxidantes naturais podem ser encontrados e isolados em uma variedade de alimentos. Dentre as fontes de antioxidantes naturais podem ser citados os cereais, os cogumelos, as ervas e especiarias e as sementes de frutas cítricas (ELMASTAS et al., 2007; PEREIRA, 1996; PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2005; YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNÝ, 2006).

As substâncias presentes nessas fontes naturais, que são capazes de agir como antioxidantes, são minerais (principalmente constituindo enzimas), vitaminas e compostos fenólicos. Dentre os mais importantes, sob o ponto de vista tecnológico, podem ser citados os tocoferóis, os carotenóides, alguns ácidos orgânicos, como os ácidos cítrico e ascórbico, e os flavonóides. Os extratos de frutas cítricas, como o limão, são importantes fontes de ácidos fenólicos, como o ácido hidroxicinâmico e de flavonóides (flavononas e flavonóis) (DIMITRIOS, 2006; ECONOMOS; CLAY, 1999). Esses compostos podem agir como redutores, interruptores de radicais livres, inibidores ou supressores de oxigênio singlete e como inativadores de metais pró-oxidantes.

Existem diversos métodos utilizados para a avaliação, identificação e quantificação da capacidade antioxidante, dentre eles podem ser citados o método TBA (valor do ácido tiobarbitúrico), a determinação dos compostos fenólicos totais, o sistema do β -caroteno/ácido linoléico, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), e os métodos de detecção de sequestradores de radicais livres, como o 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS) e o 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).

No teste do DPPH, a ação do radical DPPH é acompanhada pelo monitoramento da diminuição da absorbância a 515 nm, que ocorre devido à sua reação com algum antioxidante ou com algum radical livre (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

O DPPH é um radical livre, estável à temperatura ambiente, que produz uma coloração violeta quando em contato com etanol. Este radical é reduzido na presença de uma molécula de antioxidante doador de hidrogênio. O DPPH captura os hidrogênios, mudando a coloração de violeta para amarelo, passando para sua forma estável DPPH-H. O radical DPPH mostra forte banda de absorção em 515 nm.

Alguns estudos demonstraram que a interação entre antioxidante e DPPH depende de sua conformação estrutural. A redução do número de moléculas de DPPH está relacionada com o número de grupos hidroxilas disponíveis no composto antioxidante (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

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

Assim, os principais objetivos deste trabalho foram avaliar o comportamento do óleo de soja adicionado de extratos de sementes de limão, em diferentes concentrações, por meio da estabilidade oxidativa e medir a atividade antioxidante através do método do radical livre DPPH e compostos fenólicos totais presentes no extrato.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Óleo

Para a realização deste trabalho, utilizou-se óleo de soja refinado, sem adição de antioxidantes sintéticos (TBHQ e ácido cítrico), adquirido em embalagens de 900 mL, processado pela empresa Cargill Agrícola S/A, Uberlândia-MG.

2.1.2. Sementes de limão

As frutas maduras, variedades cravo e galego, foram provenientes de uma plantação no município de Itajobi/SP, colhidas em Janeiro de 2007. Os limões foram cortados pela metade e as sementes retiradas manualmente e, em seguida, lavadas ligeiramente com água destilada para remover restos de polpas e açúcares solúveis provenientes das frutas. As sementes foram secas em estufa, com circulação de ar forçada a 45°C por 24 horas, para redução do teor de umidade abaixo de 10%. Depois, foram armazenadas em recipientes plásticos, vedados com tampas de rosca e devidamente rotulados para análises posteriores.

2.1.3. Extratos de sementes de limão

Os extratos de sementes de limão, cravo e galego, foram obtidos de acordo com a metodologia descrita por Pereira (1996). As sementes de limão desidratadas e trituradas (10 g) foram mantidas sob agitação permanente com metanol (100 mL) à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) durante 6 horas e, em seguida, a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm, por 10 minutos e o sobrenadante filtrado em filtro de papel. Após a transferência do sobrenadante, o precipitado foi novamente submetido ao processo de extração nas mesmas condições anteriormente explicitadas, e os sobrenadantes resultantes das duas extrações foram combinados. Em seguida, procedeu-se à remoção do solvente utilizado para a obtenção dos extratos, sob pressão reduzida a 40°C. Os extratos secos foram pesados e ressuspensos em metanol, obtendo-se soluções-estoques contendo 1 grama de extrato para cada 10 gramas de solvente metanol (1:10), utilizadas para aplicações diretas no óleo de soja.

2.2. Métodos

2.2.1. Composição centesimal

As determinações analíticas de umidade, lipídios, cinzas e carboidratos totais nas sementes foram realizadas de acordo com os métodos oficiais da AOCS (1993). As proteínas foram determinadas pelo método de Kjeldahl descrito pela

AOAC (1995) e as fibras foram quantificadas pela diferença do valor obtido pela somatória de umidade, lipídios, proteínas, cinzas e carboidratos totais.

2.2.2. Estabilidade oxidativa

Os extratos de sementes de limão foram aplicados ao óleo de soja em diferentes concentrações (0, 500, 1.000, 1.500, 2.000 e 2.500 mg/kg) com o objetivo de avaliá-los quanto à estabilidade oxidativa. As amostras foram analisadas segundo o método proposto pela AOCS Cd 12-92 (1993), utilizando o equipamento Rancimat[®] modelo 743, marca Metrohm, nas seguintes condições: 3,0 g de óleo; fluxo de ar de 20 L/h, temperatura de 100°C e 60 mL de água destilada nos frascos contendo os elétrodos, cuja medida se baseia na determinação da condutividade elétrica dos produtos voláteis de degradação.

A amostra selecionada, cuja variedade e concentração do extrato considerada de maior eficiência contra a oxidação lipídica, foi aquela que apresentou maior período de indução, em horas. Em seguida, foi avaliada quanto à sua atividade antioxidante pelo método de DPPH e compostos fenólicos totais.

2.2.3. Método do radical livre DPPH

O teor de antioxidantes foi determinado segundo a metodologia descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Neste procedimento, preparou-se uma solução metanólica com concentração de 500 µg/mL de extrato de sementes de limão. Cada amostra desta solução (0,3 mL) foi adicionada a 2,7 mL de solução de DPPH (40 µg/mL) em diferentes concentrações (5, 10, 25, 50, 125 e 250 µg/mL). Após o tempo de reação de 30 minutos, a absorbância foi lida em 515 nm e convertida em porcentagem de atividade antioxidante (AA) por meio da seguinte fórmula: $AA (\%) = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle}\}$, onde Abs = absorbância.

Um controle foi feito com 2,7 mL de DPPH e o branco realizado com 0,3 mL de solução metanólica do extrato e 2,7 mL de metanol, para cada concentração.

Esta metodologia permite a determinação do valor EC₅₀ (mg/L), definido como a concentração de extrato natural suficiente para atingir 50% da atividade antioxidante máxima, estimada em 100%, obtida por regressão linear.

2.2.4. Compostos fenólicos totais

A quantificação de compostos fenólicos totais foi determinada por espectrofotometria, por meio do reagente Folin-Ciocalteu, segundo a metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965).

Neste procedimento, pipetou-se 100 µL da solução de extrato natural em tubos de ensaio e adicionou-se 500 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de solução saturada de carbonato de sódio 20% e 6 mL de água destilada.

Essa mistura permaneceu em repouso por 2 horas em temperatura ambiente e a absorbância foi determinada a 765 nm. Para a quantificação, foi feita uma curva de calibração, utilizando ácido gálico em concentrações de 0 a 500 mg/L. O coeficiente de determinação da curva analítica foi de $R^2 = 0,9986$. Os teores de compostos fenólicos totais foram expressos como mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g).

2.3. Análise estatística

O experimento foi realizado em esquema fatorial 2 x 6, no delineamento inteiramente casualizado, em duas repetições (BANZATTO; KRONKA, 2006). Os resultados obtidos de duas determinações foram submetidos à análise de variância para estudar a interação entre as variedades e concentrações e a regressão polinomial, a fim de determinar a influência das concentrações sobre a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extrato de sementes de limão, medida pelo Rancimat, em horas. A análise de variância e o teste de Tukey para as médias a 5% foram obtidos por meio do programa ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0 (UNESP, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição centesimal das sementes de limão

Como pode ser observado na Tabela 1, os teores para as variedades, cravo

e galego, diferiram significativamente pelo teste de Tukey para umidade, lipídios, proteínas e carboidratos, porém, para os teores de cinzas não diferiram, enquanto as fibras foram obtidas por diferença.

Tabela 1 – Composição centesimal das sementes de limão, variedades cravo e galego, em base úmida.

Componentes	Quantidade (%)*	
	Cravo	Galego
Umidade	7,57 ^a	6,62 ^b
Lipídios	34,61 ^b	40,00 ^a
Proteínas	17,83 ^b	20,28 ^a
Cinzas	2,22 ^a	2,26 ^a
Carboidratos	12,05 ^a	11,04 ^b
Fibras (por diferença)	25,72	19,80

*Valores médios em duplicata seguida pelas mesmas letras nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

De acordo com os resultados obtidos das determinações analíticas, as sementes de limão, variedades cravo e galego, apresentaram 7,57 e 6,62% de umidade, respectivamente, uma vez que as sementes foram previamente secas. Foram verificadas elevadas porcentagens de lipídios (34,61 e 40%), proteínas (17,83 e 20,28%), carboidratos (12,05 e 11,04%) e fibras (25,72 e 19,80%).

Pereira (1996) encontrou 13% de lipídios e 10,4% de proteínas em sementes de limão cravo. Em sementes de tangerina, Gondim et al. (2005) reportaram quantidades de 10% de carboidratos e 0,9% de fibras, sendo estes valores menores que os encontrados em sementes de limão.

3.2. Rendimento dos extratos de sementes de limão

As sementes frescas de limão *in natura*, variedades cravo e galego, apresentaram teores de umidade de 46,10 e 46,95%, respectivamente, sendo estes valores próximos aos encontrados por Reda et al. (2005) para as sementes de limão rosa (48,00%) e limão siciliano (48,30%). Após a desidratação, para a obtenção dos

extratos, os teores de umidade das sementes passaram a ser 7,57 e 6,62%, para as sementes de limão cravo e galego, respectivamente.

A Tabela 2 apresenta o rendimento percentual dos extratos obtidos após a remoção do solvente orgânico empregado no processo de extração. Observa-se que os rendimentos diferiram significativamente ($p < 0,05$), e o maior rendimento em extrato seco foi obtido para a variedade de limão galego (12,47%).

Tabela 2 – Rendimento dos extratos de sementes de limão, variedades cravo e galego, obtidos por extração com metanol.

Solvente orgânico	Rendimento (%)*	
	Cravo	Galego
Metanol	11,18 ^b	12,47 ^a

*Valores médios em duplicata seguida por diferentes letras diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os rendimentos, em porcentagem, dos extratos de sementes de limão foram próximos aos encontrados por Rehman (2006) que, em diferentes solventes orgânicos, obteve valores que variaram de 7,88 a 19,87% para os extratos de cascas de frutas cítricas.

3.3. Estabilidade oxidativa

Para determinar a concentração mais efetiva dos extratos testados, bem como uma possível ação pró-oxidante, foram aplicadas concentrações de 0, 500, 1.000, 1.500, 2.000 e 2.500 mg/kg dos extratos de sementes de limão, cravo e galego, no óleo de soja e a atividade antioxidante foi medida por meio da estabilidade oxidativa, utilizando-se o Rancimat a 100°C.

O Anexo 1 apresenta a análise de variância para a determinação da estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extratos de sementes de limão, variedades cravo e galego. Como observado, o teste foi significativo ($p < 0,01$) para os efeitos principais Variedades e Concentrações, porém sua interação não foi significativa ($p > 0,05$). A Tabela 3 mostra o resultado das médias submetidas ao teste de Tukey.

Tabela 3 – Médias da estabilidade oxidativa para os fatores Variedades e Concentrações do extrato de sementes de limão.

Fatores	Estabilidade oxidativa (horas)*
Variedades	
Limão Cravo	13,74 ^b
Limão Galego	14,37 ^a
Concentrações (mg/kg)	
0	10,52 ^c
500	13,84 ^b
1.000	14,32 ^b
1.500	14,98 ^a
2.000	15,21 ^a
2.500	15,47 ^a

*Valores médios seguidas pelas mesmas letras não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Observa-se que, dentre as variedades estudadas, o limão galego apresentou maior estabilidade oxidativa quando comparado com o limão cravo, sendo a diferença evidenciada estatisticamente, conforme teste de Tukey ($p < 0,05$).

Verifica-se que houve efeito protetor contra a oxidação lipídica quando foram empregadas concentrações de 500 a 2.500 mg/kg. A estabilidade oxidativa foi diretamente proporcional ao aumento da concentração do extrato de sementes de limão. Porém, as concentrações a partir de 1.500 mg/kg apresentaram maior efeito protetor ao óleo de soja, apesar de não diferirem significativamente pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Em geral, as mesmas características são encontradas na literatura para a ação antioxidante de extratos naturais, ou seja, a tendência é o aumento da atividade antioxidante, conforme o aumento da concentração de extrato (AZIZAH; RUSLAWATI; TEE, 1999; LEE; KIM; ASHMORE, 1986).

O Anexo 2 apresenta a análise de regressão para a determinação da estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extratos de sementes de limão, em função das concentrações. Observa-se que a regressão cúbica foi significativa ($p < 0,01$), porém, o coeficiente de determinação da regressão quadrática ($R^2 = 0,9282$) foi maior que 0,9, sendo portanto, utilizado para explicar o comportamento dos extratos de sementes de limão.

Por meio da regressão polinomial (Figura 1), observa-se que a maior atividade antioxidante, medida pela estabilidade oxidativa, foi para a concentração de 2.400 mg/kg, obedecendo, assim, a equação de 2º grau, $y = -1E-06x^2 + 0,0048x + 11,075$, onde y é a estabilidade oxidativa (horas) e x as concentrações dos extratos de sementes de limão (mg/kg).

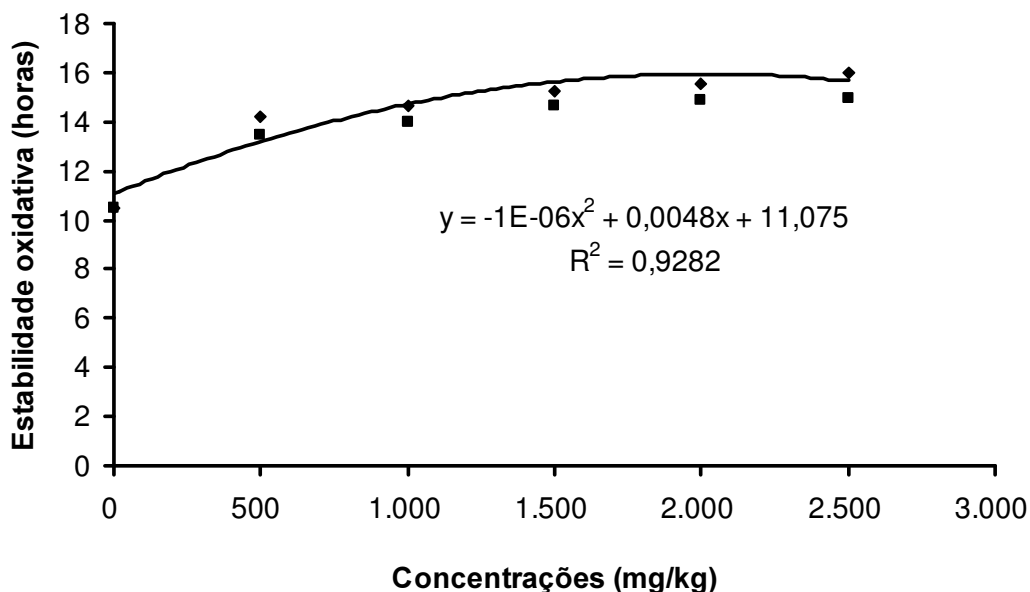


Figura 1 – Regressão polinomial para as concentrações dos extratos de sementes de limão.

Com base na estabilidade oxidativa, a amostra correspondente à variedade limão galego, na concentração de 2.400 mg/kg, foi a que teve maior estabilidade (16,84 horas), passando então a ser avaliada quanto à sua atividade antioxidante pelo método de DPPH e compostos fenólicos totais.

3.4. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato de sementes de limão galego foi determinada pelo método do radical DPPH. Esta metodologia permite a avaliação do comportamento antioxidante dos compostos através da capacidade de seqüestrar radical livre em determinado período de tempo. A atividade antioxidante dos compostos, representada pelo valor de EC_{50} , é calculada pela redução de 50% da

concentração inicial de DPPH. Ressalta-se que, quanto menor o valor de EC_{50} , maior a atividade antioxidante do composto analisado.

O Anexo 3 apresenta a análise de variância para os valores da $AA_{máxima}$ e EC_{50} do extrato de sementes de limão galego e ácido gálico. Como observado, o teste foi significativo ($p < 0,01$) para os tratamentos estudados. A Tabela 4 mostra o resultado das médias submetidas ao teste de Tukey.

Tabela 4 – Valor, em porcentagem, de $AA_{máxima}$ e EC_{50} para o extrato de sementes de limão galego (ESLG) e ácido gálico (AG).

Antioxidante	$AA_{máxima}$ (%)*	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)*
ESLG	70,58 ^b \pm 0,14	69,94 ^a \pm 0,14
AG	75,07 ^a \pm 0,14	64,73 ^b \pm 0,14

*Valores médios \pm desvio padrão seguidas por diferentes letras nas colunas diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); EC_{50} é definido como a concentração suficiente para obter 50% do efeito máximo, estimado em 100%.

Os valores de EC_{50} , obtidos por regressão linear, para o extrato de sementes de limão galego e ácido gálico, apresentaram bons coeficientes de determinação, 0,9109 e 0,9115, respectivamente. As atividades antioxidantes máximas atingidas para extrato e ácido gálico foram 70,58 e 75,07%, e para EC_{50} foram 69,94 e 64,73 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Observa-se, que o extrato de sementes de limão galego e ácido gálico, usado para comparação, diferiram significativamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em estudo realizado por Sousa et al. (2007) foi demonstrado que os extratos de plantas medicinais e o ácido gálico, usado para comparação, apresentaram capacidade em seqüestrar o radical DPPH, obtendo-se, assim, atividades antioxidantes que variaram de 10 a 91% para os extratos de plantas medicinais, e o ácido gálico obteve 94,84%.

A concentração de compostos fenólicos totais encontrada neste trabalho foi de 76 mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g). Os resultados obtidos foram similares aos encontrados na literatura. Wang, Chuang e Ku (2007) encontraram teor de compostos fenólicos para limão de 75,9 mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato, enquanto para Li, Smith e Hossain (2006), os resultados para teores de compostos fenólicos extraídos de

cascas de citrus por 6 horas, apresentaram 70,43 mg de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g).

A extração de compostos fenólicos de produtos naturais é fortemente influenciada pelo solvente utilizado na extração. Tem-se observado que quanto maior a polaridade do solvente de extração, maior a quantidade de compostos fenólicos extraídos (GAMÉZ-MEZA et al., 1999).

4. CONCLUSÕES

Entre as concentrações avaliadas neste estudo, 2.400 mg/kg de extrato de sementes de limão galego promoveram maior estabilidade oxidativa ao óleo de soja, medida por meio do Rancimat. O extrato de sementes de limão galego, devido à sua atividade antioxidante, apresenta-se como uma alternativa natural para ser aplicado em óleos industrializados como antioxidante natural.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Crude protein. In: CUNNIFF, P. Ed. **Official and tentative methods of the AOAC International** (ed.) Maryland: AOAC, 1995.

AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 3. ed. Champaign: AOCS, 1993.

AZIZAH, A. H.; RUSLAWATI, N. M. N.; TEE, T. S. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. **Food Chemistry**, London, v. 64, n. 2, p. 199-202, 1999.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237 p.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel – Wissenschaft Technologie**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolics antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, Guildford, v. 17, n. 9, p. 505-512, 2006.

ECONOMOS, C.; CLAY, W. D. Nutritional and health benefits of citrus fruits. **Food**,

Nutrition and Agriculture, Roma, v. 24, n. 1, p. 8-11, 1999.

ELMASTAS, M. et al. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3, p. 337-345, 2007.

GÁMEZ-MEZA, N. et al. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompson grape bagasse. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 76, n. 12, p. 1445-1447, 1999.

GONDIM, J. M. et al. Composição centesimal e de minerais em cascas de frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 825-827, 2005.

LEE, Y. B.; KIM, Y. S.; ASHMORE, C. R. Antioxidant properties in ginger rhizome and its application to meat products. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 51, n. 1, p. 20-23, 1986.

LI, B. B.; SMITH, B.; HOSSAIN, M. M. Extraction of phenolics from citrus peels: solvent extraction method. **Separation and Purification Technology**, Tokyo, v. 48, n. 2, p. 182-188, 2006.

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-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Literature data may underestimate the actual activity of cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 13, p. 5036-5040, 2005.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

REDA, S. Y. et al. Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus limonia* Osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 672-676, 2005.

REHMAN, Z. Citrus peel extract – a natural source of antioxidant. **Food Chemistry**, London, v. 99, n. 3, p. 450-454, 2006.

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

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

UNESP. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. **ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas**. Versão 2.0, Jaboticabal, 1999. 1 disquete.

WANG, Y. C.; CHUANG, Y. C; KU, Y. H. Quantitation of bioactive compounds in citrus fruits cultivated in Taiwan. **Food Chemistry**, London, v. 102, n. 4, p. 1163-1171, 2007.

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

6. ANEXOS

Anexo 1 – Análise de variância para a determinação da estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extratos de sementes de limão, variedades, cravo e galego.

Causas de Variação	G.L.	Quadrado Médio
Variedades	1	2,3625**
Concentrações	5	13,4416**
Variedades x Concentrações	5	0,1203 ^{NS}
Resíduo	12	0,0543
Desvio padrão		0,23
Coeficiente de variação (%)		1,66

** Significativo ($p < 0,01$).

^{NS} Não Significativo ($p > 0,05$).

Anexo 2 – Análise de variância da regressão polinomial para a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de extratos de sementes de limão.

Causas de Variação	G.L.	Q.M.	F	R²
Regressão linear	1	24,8824	458,2394**	0,7410
Regressão quadrática	1	6,2857	115,7587**	0,9282
Regressão cúbica	1	1,7475	32,1823**	0,9803
Desvios de regressão	2	0,3312	6,0994**	
Resíduo	12	0,0543		

** Significativo ($p < 0,01$).

Anexo 3 – Análise de variância para os valores da $AA_{máxima}$ e EC_{50} do extrato de sementes de limão galego (ESLG) e ácido gálico (AG).

Causas de Variação	G.L.	Quadrados Médios	
		$AA_{máxima}$	EC_{50}
Tratamentos	1	20,1601**	27,1441**
Resíduo	1	0,02	0,02
Desvio padrão		0,14	0,14
Coeficiente de variação (%)		0,19	0,21

** Significativo ($p < 0,01$).

Capítulo 3

**Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão
(*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de
estocagem acelerada**

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante do extrato de sementes de limão adicionado ao óleo de soja, submetido ao teste acelerado em estufa e o seu efeito sinérgico com o antioxidante sintético TBHQ. Os tratamentos Controle, ESL (2.400 mg/kg Extrato de Sementes de Limão), TBHQ (50 mg/kg), Mistura 1 (ESL + 50 mg/kg TBHQ) e Mistura 2 (ESL + 25 mg/kg TBHQ) foram preparados e submetidos ao teste de estocagem acelerada em estufa, a 60°C durante 12 dias, sendo as amostras recolhidas a cada 3 dias e analisadas quanto ao índice de peróxidos e dienos conjugados. Os resultados mostraram que a atividade antioxidante dos diversos tratamentos testados foi: TBHQ = Mistura 1 = Mistura 2 > ESL > Controle.

Palavras-chave: frutas cítricas, óleos vegetais, oxidação.

1. INTRODUÇÃO

O limão é uma fruta cítrica rica em vitaminas, principalmente vitamina C, fibras e potássio (FERRARI; TORRES, 2002). É extensamente cultivado em pomares e viveiros, pois induz a maturação precoce das frutas, proporcionando melhores preços no início da safra. É utilizado para a fabricação de sucos naturais e concentrado, além de ser tecnologicamente usado como flavorizante em alimentos, devido ao óleo essencial presente em sua casca (REDA et al., 2005).

O Brasil se destaca como o segundo maior produtor de frutas cítricas e o maior exportador de sucos cítricos. A produção brasileira de limão está localizada no Estado de São Paulo, sendo o primeiro produtor destes frutos, representando 81,3% da produção, seguido pelo Rio de Janeiro e Bahia com 3,9 e 2,7%, respectivamente (IBRAF, 2008).

Grande parte do resíduo sólido das sementes de limão é uma fonte inexplorada de óleo que pode alcançar 55% de rendimento (FERNANDES et al., 2002). Este óleo pode ser aproveitado pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética.

As frutas cítricas são conhecidas por conterem antioxidantes naturais no óleo, na polpa, na semente e na casca. Segundo Pereira (1996), os resultados obtidos dos extratos metanólicos de sementes de frutas cítricas, como o limão, indicaram atividade antioxidante inibindo o processo oxidativo em 73,4%.

Com o objetivo de retardar os processos oxidativos, responsáveis por alterações na cor, sabor, textura e valor nutricional, alguns compostos antioxidantes são adicionados aos alimentos. Estas substâncias podem ser naturais ou sintéticas, e atuam de diversas maneiras: interrompendo a cadeia de reações oxidativas, cedendo um hidrogênio a um radical lipídico livre e assumindo a forma de radical estável, diminuindo assim, o número de radicais livres, reduzindo a velocidade da oxidação e prolongando-se o período de indução, que consiste no tempo que o material analisado necessita para começar a apresentar sinais detectáveis de oxidação (AMAROWICZ et al., 2004; ORDÓÑEZ et al., 2005).

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com seu mecanismo de ação como primários ou secundários. Os antioxidantes primários são, por exemplo, compostos fenólicos, que atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os em produtos

termodinamicamente estáveis ou reagem com radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante, que, por sua vez, pode reagir com outro radical livre. O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é seqüestrado pelos radicais livres R^{\bullet} e ROO^{\bullet} 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^{\bullet}) procedente do antioxidante (RAMALHO; JORGE, 2006).

Já os antioxidantes secundários retardam a reação de autooxidação por diferentes mecanismos, que incluem complexação com metais, seqüestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (GORDON, 1990).

Existem diversos métodos utilizados para a avaliação dos parâmetros da oxidação, dentre eles podem ser citados a determinação do índice de peróxidos, os ácidos graxos residuais não oxidados, os dienos conjugados, os compostos aldeídicos, os ácidos oxidados e os compostos voláteis (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

A determinação do índice de peróxidos representa a diferença entre a formação e a decomposição de peróxidos, e exprime-se em miliequivalentes de oxigênio ativo por kg de matéria graxa. No decurso da sua decomposição produzem-se compostos de natureza muito diversa (aldeídos, cetonas, hidroxíácidos, hidrocarbonetos, polímeros), os quais são genericamente designados produtos secundários (BERSET; CUVELIER, 1996).

Os dienos conjugados absorvem a 232 nm. Os produtos secundários da sua oxidação, em particular as α -dicetonas ou as cetonas insaturadas, apresentam um máximo de absorção a 272 nm. Esta diferença é particularmente interessante, permitindo diferenciar estados de evolução oxidativa com base na relação A_{272nm}/A_{232nm} . Quanto maior o valor da absorbância a 232 nm, mais elevado será o conteúdo em peróxidos, correspondendo, portanto, ao início do processo de oxidação; pelo contrário, quanto maior for o valor da absorbância a 272 nm, maior será o teor de produtos secundários presentes (FRANKEL et al., 1994; HUANG et al., 1994; SRINIVASAN; XIONG; DECKER, 1994).

No entanto, o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade e, devido a isso, pesquisas estão voltadas para a busca de compostos naturais que exibam esta

propriedade funcional, atuando sozinhos ou sinergisticamente com outros aditivos, como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e diminuir o uso dos antioxidantes sintéticos (POKORNÝ, 2007). Dentre as fontes de antioxidantes naturais podem ser citados os cereais, os cogumelos, as ervas e especiarias e as sementes de frutas cítricas (ELMASTAS et al., 2007; PEREIRA, 1996; PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2005; YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNÝ, 2006).

Diante disso, este trabalho objetivou a avaliação da atividade antioxidante do extrato de sementes de limão, adicionado ao óleo de soja submetido ao teste acelerado em estufa, e também o seu efeito sinérgico com o antioxidante sintético terc-butilhidroquinona (TBHQ), utilizado atualmente pelas indústrias de alimentos com a finalidade de retardar as alterações oxidativas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Sementes de limão

As frutas maduras, variedade galego, foram provenientes de uma plantação no município de Itajobi/SP, colhidas em Janeiro de 2007. Os limões foram cortados pela metade e as sementes retiradas manualmente e, em seguida, lavadas ligeiramente com água destilada para remover restos de polpas e açúcares solúveis provenientes das frutas. As sementes foram secas em estufa, com circulação de ar forçada, a 45°C por 24 horas, para redução do teor de umidade abaixo de 10%. Depois, foram armazenadas em recipientes plásticos, vedados com tampas de rosca e devidamente rotulados para análises posteriores.

2.1.2. Óleo de soja

Para a realização do experimento foi utilizado óleo de soja refinado, sem adição de antioxidantes sintéticos (TBHQ e ácido cítrico). Utilizou-se embalagens contendo 900 mL de óleo de soja, processado pela empresa Cargill Agrícola S/A, Uberlândia-MG.

2.1.3. Antioxidantes

O antioxidante sintético utilizado foi o terc-butilhidroquinona (TBHQ), apresentado na forma em pó, fornecido pela empresa Danisco S/A.

O extrato de sementes de limão foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Pereira (1996). As sementes de limão desidratadas e trituradas (10 g) foram mantidas sob agitação permanente com metanol (100 mL) à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 6 horas e, em seguida, a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm, por 10 minutos. Após a transferência do sobrenadante, o precipitado foi novamente submetido ao processo de extração nas mesmas condições anteriormente explicitadas, e os sobrenadantes resultantes da extração foram combinados. Em seguida, procedeu-se à remoção do solvente utilizado para a obtenção do extrato, sob pressão reduzida a 40°C . O extrato seco foi pesado e ressuspenso em metanol, obtendo-se solução-estoque contendo 1 grama de extrato para cada 10 gramas de solvente metanol (1:10), utilizada para aplicação direta no óleo de soja.

2.1.4. Ensaio experimental

Foram submetidos ao teste acelerado em estufa os seguintes tratamentos, conduzidos com duas repetições: i) óleo de soja sem adição de antioxidantes sintéticos e ácido cítrico (Controle), ii) óleo de soja com adição de 2.400 mg/kg de extrato de sementes de limão (ESL), iii) óleo de soja com adição de 50 mg/kg de TBHQ (TBHQ), iv) óleo de soja com adição da mistura de antioxidantes, ou seja, 2.400 mg/kg de extrato de sementes de limão e 50 mg/kg de TBHQ (Mistura 1) e, v) óleo de soja com adição da mistura de antioxidantes, ou seja, 2.400 mg/kg de extrato de sementes de limão e 25 mg/kg de TBHQ (Mistura 2). Definiu-se o valor de 50 mg/kg de antioxidante sintético TBHQ, por ser esta a concentração mais comum deste antioxidante adicionada ao óleo de soja pelas indústrias.

Os tratamentos foram mantidos por 12 dias em estufa aquecida, utilizando-se béqueres de 50 mL contendo 30 mL de amostra com relação superfície/volume 0,4/cm. Esse valor corresponde àquele normalmente usado nas frituras em fritadeira. A temperatura utilizada foi de 60°C , normalmente utilizada em testes de estocagem acelerada (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000; KIM et al.,

2005). Todas as amostras, a diferentes intervalos de tempo (0, 3, 6, 9 e 12 dias) foram recolhidas e analisadas quanto ao índice de peróxidos e dienos conjugados.

2.2. Métodos

Com o objetivo de avaliar as alterações oxidativas primárias, utilizaram-se análises de peróxidos e dienos conjugados para a avaliação das amostras obtidas durante o teste de estocagem acelerada.

2.2.1. Índice de peróxidos

Denomina-se índice de peróxidos a quantidade de oxigênio ativo, calculada em miliequivalentes, contida em um quilograma de óleo, medida a partir do iodo liberado do iodeto de potássio pelos peróxidos presentes no óleo. Esse índice foi determinado segundo a norma da American Oil Chemists' Society (AOCS) Cd 8-53 (AOCS, 1993).

2.2.2. Dienos conjugados

Este método determina dienos conjugados presentes na matéria graxa, expressos como porcentagem de ácidos dienóicos conjugados, após leitura da absorbância a 233 nm. A determinação de dienos conjugados foi efetuada de acordo com o método oficial AOCS Ti 1a-64 (AOCS, 1993).

2.3. Análise estatística

Para as amostras submetidas ao teste acelerado em estufa foram considerados os seguintes fatores: tratamentos (Controle, ESL, TBHQ, Mistura 1 e Mistura 2) e tempos de aquecimento (0, 3, 6, 9 e 12 dias).

Os resultados obtidos para 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 ao teste acelerado em estufa. O experimento foi realizado em esquema fatorial 5 x 5, no delineamento inteiramente casualizado (BANZATTO; KRONKA, 2006). A análise de variância e o

teste de Tukey para as médias a 5% foram obtidos por meio do programa ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0 (UNESP, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. 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. (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

O Anexo 1 apresenta a análise de variância para a determinação do índice de peróxidos, 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 tratamentos x tempos de aquecimento. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Médias de índice de peróxidos (meq/kg) para a interação tratamentos x tempos de aquecimento a 60°C.

Tratamentos	Tempos de aquecimento (dias)				
	0	3	6	9	12
Controle	1,79 ^{eA}	2,89 ^{dA}	30,38 ^{cA}	57,09 ^{bA}	77,91 ^{aA}
ESL	1,60 ^{eA}	2,83 ^{dA}	10,54 ^{cB}	36,97 ^{bB}	57,65 ^{aB}
TBHQ	1,39 ^{eA}	2,84 ^{dA}	4,66 ^{cC}	7,66 ^{bC}	9,54 ^{aC}
Mistura 1	1,64 ^{dA}	2,43 ^{dA}	3,87 ^{cC}	7,16 ^{bC}	9,31 ^{aC}
Mistura 2	1,53 ^{eA}	2,69 ^{dA}	4,13 ^{cC}	7,34 ^{bC}	9,54 ^{aC}

Controle: óleo de soja; ESL: extrato de sementes de limão (2.400 mg/kg); TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg/kg); Mistura 1: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (50 mg/kg); Mistura 2: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (25 mg/kg).

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Na Tabela 1 pode-se verificar que para cada tratamento os valores aumentaram ao longo do período de estocagem, havendo diferença significativa entre os tempos de aquecimento.

Analisando os tratamentos dentro de cada tempo de aquecimento, nota-se que até 3 dias não foi observada diferença significativa entre as médias dos índices de peróxidos. A partir de 6 dias de aquecimento, os teores de peróxidos do óleo de soja com TBHQ, Mistura 1 e Mistura 2 não diferiram significativamente, apresentando-se mais eficientes na proteção do óleo, com relação à formação de peróxidos. O extrato de sementes de limão reduziu em 26%, o TBHQ e as Misturas 1 e 2 reduziram em 88% a formação de peróxidos do óleo após 12 dias de estocagem acelerada a 60°C. Nota-se que a adição do extrato de sementes de limão ao óleo de soja não foi tão eficiente quanto o antioxidante sintético TBHQ e as misturas de antioxidantes, contra a formação de peróxidos.

Com relação à eficiência contra a formação dos compostos primários de oxidação durante o período de estocagem em estufa, pode-se classificar os tratamentos da seguinte maneira: TBHQ = Mistura 1 = Mistura 2 > ESL > Controle.

O TBHQ tem se mostrado mais eficiente que os antioxidantes naturais, quando adicionado na dosagem máxima permitida de 200 mg/kg. Gámez-Meza et al. (1999) verificaram que o TBHQ obteve melhor resultado que o extrato de bagaço de uvas, contra a formação de peróxidos, em óleo de soja, durante estocagem a 60°C.

Almeida-Doria e Regitano-D'Arce (2000) verificaram que o TBHQ aplicado na concentração de 200 mg/kg foi mais eficiente na proteção contra a formação de peróxidos em óleo de soja, do que os extratos etanólicos de alecrim e orégano, a partir de 5 e 7 dias, respectivamente, em teste de estocagem acelerada a 63°C.

Em estudo realizado por Andreo e Jorge (2007), observou-se que o extrato de gengibre, TBHQ e a mistura (antioxidante sintético TBHQ com o extrato etanólico de gengibre) adicionados no óleo de soja reduziram em 57, 90 e 92%, respectivamente, a formação de peróxidos após 12 dias de estocagem acelerada a 60°C.

Rehman (2006) verificou que o extrato de cascas de citros adicionado em óleo de milho, na concentração de 2.000 mg/kg apresentou efeito semelhante ao do antioxidante sintético BHT (200 mg/kg) na proteção contra a formação de peróxidos em teste de estocagem acelerada a 45°C por 6 meses.

3.2. Dienos conjugados

A medida quantitativa dos dienos conjugados tem sido largamente utilizada

para a determinação da oxidação de óleos e gorduras. A peroxidação dos ácidos graxos insaturados acompanha a mudança da dupla ligação na formação dos hidroperóxidos conjugados. Essa estrutura conjugada absorve fortemente a luz ultravioleta no comprimento de onda entre 232 e 234 nm (KULAS; ACKMAN, 2001).

O Anexo 1 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 tratamentos x tempos de aquecimento. Então, tornou-se necessário o desdobramento dessa interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Médias de dienos conjugados (%) para a interação tratamentos x tempos de aquecimento a 60°C.

Tratamentos	Tempos de aquecimento (dias)				
	0	3	6	9	12
Controle	0,25 ^{eA}	0,28 ^{dA}	0,59 ^{cA}	0,92 ^{bA}	1,14 ^{aA}
ESL	0,24 ^{eA}	0,28 ^{dA}	0,53 ^{cB}	0,85 ^{bB}	1,06 ^{aB}
TBHQ	0,24 ^{eA}	0,27 ^{dA}	0,39 ^{cC}	0,49 ^{bC}	0,57 ^{aC}
Mistura 1	0,25 ^{dA}	0,27 ^{dA}	0,39 ^{cC}	0,50 ^{bC}	0,58 ^{aC}
Mistura 2	0,24 ^{eA}	0,26 ^{dA}	0,38 ^{cC}	0,50 ^{bC}	0,58 ^{aC}

Controle: óleo de soja; ESL: extrato de sementes de limão (2.400 mg/kg); TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg/kg); Mistura 1: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (50 mg/kg); Mistura 2: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (25 mg/kg).

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

De acordo com a Tabela 2, houve aumento gradual na formação de dienos conjugados ao longo do teste acelerado em estufa, de forma progressiva, do início ao final do aquecimento tanto para o Controle, quanto para o óleo de soja com adição dos antioxidantes testados.

Portanto, pode-se observar que até o tempo de aquecimento de 3 dias não houve formação significativa de dienos conjugados nos tratamentos utilizados. Esta formação começou a ser detectada estatisticamente apenas a partir do tempo de aquecimento de 6 dias em estufa. A partir daí, observa-se que os tratamentos ESL, TBHQ, Mistura 1 e Mistura 2 foram eficientes contra a formação de dienos

conjugados, pois diferiram do Controle. A maior formação de dienos no óleo indica formação de compostos primários de oxidação lipídica mais acentuada nesse óleo do que nos demais tratamentos.

Ao final do processo, pode-se verificar que o extrato de sementes de limão demonstrou efeito antioxidante durante todo o aquecimento, embora tenha apresentado o menor nível de proteção, com 7% de redução da formação de dienos conjugados após 12 dias de estocagem acelerada. A aplicação do antioxidante sintético TBHQ e das misturas de TBHQ e extrato de sementes de limão foi mais efetiva, a aplicação entre os tratamentos testados, embora as misturas não tenham apresentado diferença significativa entre si na proteção do óleo de soja estocado a 60°C com relação à formação de dienos conjugados. O óleo adicionado de TBHQ apresentou redução de 50%, e as misturas de TBHQ e extratos de sementes de limão apresentaram 49% de redução na formação desses compostos ao final do processo.

Os extratos de frutas cítricas, como o limão, são importantes fontes de ácidos fenólicos, como o ácido hidroxicinâmico e de flavonóides (flavononas e flavonóis) (DIMITRIOS, 2006). Esses compostos podem agir como redutores, interruptores de radicais livres, inibidores ou supressores de oxigênio singlete e como inativadores de metais pró-oxidantes.

Ruth, Shaker e Morrissey (2001) observaram redução de 23% no valor de dienos conjugados em óleo de linhaça, com a adição de 4% de extrato metanólico de semente de soja. O extrato etanólico de manjerição retardou a formação de dienos conjugados durante a estocagem de carne de porco, evidenciando a utilização de extratos naturais com características polares contra a oxidação lipídica (JUNTACHOTE et al., 2007).

A comparação entre antioxidantes sintéticos e naturais, quanto à capacidade antioxidante, depende do tipo de composto analisado e da concentração utilizada. Os valores de dienos conjugados em óleo de milho com adição de 20% de extrato etanólico de germe de trigo torrado foram inferiores ao do óleo contendo 0,02% de BHA, em estudo realizado por Krings et al. (2000).

Iqbal e Bhanger (2007) estudaram a formação de dienos conjugados em óleo de girassol adicionado de extrato metanólico de alho em estocagem acelerada. As concentrações de 250, 500 e 1.000 mg/kg foram comparadas com os antioxidantes sintéticos BHA e BHT (200 mg/kg). Após 80 minutos de aquecimento a 185°C,

concluíram que o óleo de girassol adicionado de 200 mg/kg de BHT foi o mais eficiente na inibição da formação de dienos conjugados seguido da amostra contendo 1.000 mg/kg de extrato metanólico de alho.

Em estudo realizado por Angelo e Jorge (2008), extrato de coentro, palmitato de ascorbila e mistura destes antioxidantes, quando adicionados no óleo de girassol, apresentaram capacidade em retardar a formação de dienos conjugados em 11,2, 56,9 e 60,9%, respectivamente, após 10 dias de estocagem acelerada.

Contudo, ao final do teste acelerado em estufa, ou seja, aos 12 dias de aquecimento, os valores resultantes das determinações de índice de peróxidos e dienos conjugados apresentaram coeficiente de correlação elevado e positivo ($r = 0,9924$) para as médias dos tratamentos utilizados.

4. CONCLUSÕES

Apesar de o antioxidante sintético TBHQ ter apresentado proteção superior ao Controle na concentração utilizada neste estudo, deve-se ressaltar que a Mistura 2 teve comportamento semelhante, sendo capaz de prevenir a oxidação lipídica.

Portanto, recomenda-se às indústrias de óleos vegetais reduzir a concentração do antioxidante sintético, TBHQ, substituindo-o parcialmente pelo antioxidante natural.

A atividade antioxidante dos diversos tratamentos testados neste estudo foi: TBHQ = Mistura 1 = Mistura 2 > ESL > Controle.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. 1-14, 2000.

AMAROWICZ, R. et al. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, London, v. 84, n. 4, p. 551-562, 2004.

ANDREO, D.; JORGE, N. Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de gengibre (*Gengiber officinale*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 2, p. 152-157, 2007.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Avaliação do óleo de girassol adicionado de antioxidantes sob estocagem. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 498-502, 2008.

AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 3 ed. Champaign: AOCS, 1993.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237 p.

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

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolic antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, Guildford, v. 17, n. 2, p. 505-512, 2006.

ELMASTAS, M. et al. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3, p. 337-345, 2007.

FERNANDES, J. B. et al. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbiote. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1091-1095, 2002.

FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 3, p. 375-382, 2002.

FRANKEL, E. N. et al. Interfacial phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 4, p. 1054-1059, 1994.

GÁMEZ-MEZA, N. et al. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompson grape bagasse. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 76, n. 12, p. 1445-1447, 1999.

GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In: HUDSON, B. J. F. (Ed.). **Food antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 1-18.

HUANG, S. W. et al. Antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oils vs oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 2, p. 444 -452, 1994.

IBRAF. INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br>. Acesso em: 16 maio. 2008.

IQBAL, S.; BHANGER, M. I. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 246-254, 2007.

JUNTACHOTE, T. et al. Antioxidative effect of added dried Holy basil and its ethanolic extracts on susceptibility of cooked ground pork to lipid oxidation. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 100-129, 2007.

KIM, S.Y. et al. Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grapes seed extracts. **Food Chemistry**, London, v. 97, n. 3, p. 472-479, 2005.

KRINGS, U. et al. Antioxidant activity of extracts from roasted wheat germ. **Food Chemistry**, London, v. 71, n. 1, p. 91-95, 2000.

KULAS, E.; ACKMAN, R. Different tocopherols and the relationship between two methods for determination of primary oxidation products in fish oil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 4, p. 1724-1729, 2001.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos**: componentes dos alimentos e processos. vol I. Porto Alegre: Artmed, 2005; p. 33-49.

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-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Literature data may underestimate the actual activity of cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 13, p. 5036-5040, 2005.

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

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

REDA, S. Y. et al. Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus limonia* Osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 672-676, 2005.

REHMAN, Z. Citrus peel extract – a natural source of antioxidant. **Food Chemistry**, London, v. 99, n. 3, p. 450-454, 2006.

RUTH, S. M. V.; SHAKER, E. S.; MORRISSEY, P. A. Influence of methanolic extracts of soybean seeds and soybean oil on lipid oxidation in linseed oil. **Food Chemistry**, London, v. 75, n. 2, p. 177-184, 2001.

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.

SRINIVASAN, S.; XIONG, Y. L.; DECKER, E. A. Inhibition of protein and lipid oxidation in beef heart surimi-like material by antioxidants and combinations of pH, NaCl, and buffer type in the washing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 1, p. 119-125, 1994.

UNESP. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. **ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas**. Versão 2.0, Jaboticabal, 1999. 1 disquete.

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

6. ANEXOS

Anexo 1 – Análise de variância para as determinações de índice de peróxidos (IP) e dienos conjugados (DC).

Causas de Variação	G.L.	Quadrados Médios	
		IP	DC
Tratamentos	4	1.824,8534**	0,5582**
Tempos de aquecimento	4	1.758,7304**	0,1463**
Tratamentos x Tempos de aquecimento	16	421,4729**	0,3220**
Resíduo	25	0,0756	0,0001
Desvio padrão		0,27	0,01
Coeficiente de variação (%)		1,93	1,64

** Significativo ($p < 0,01$).

Capítulo 4

Ação antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja sob termoxidação

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação antioxidante do extrato de sementes de limão adicionado ao óleo de soja, submetido à termoxidação e o seu efeito sinérgico com o antioxidante sintético terc-butilhidroquinona (TBHQ). Desta forma, os tratamentos Controle, ESL (2.400 mg/kg Extrato de Sementes de Limão), TBHQ (50 mg/kg), Mistura 1 (ESL + 50 mg/kg TBHQ) e Mistura 2 (ESL + 25 mg/kg TBHQ) foram preparados e submetidos a 180°C durante 20 horas, cujas amostras foram tomadas nos intervalos de tempo 0, 5, 10, 15 e 20 horas e analisadas quanto ao índice de peróxidos e dienos conjugados. Os resultados obtidos das determinações analíticas foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para as médias a 5%, em esquema fatorial, no delineamento inteiramente casualizado. Verificou-se que o ESL e as Misturas 1 e 2 apresentaram capacidade de retardar a oxidação lipídica, quando adicionados no óleo de soja. Entretanto, as Misturas 1 e 2 apresentaram um maior poder antioxidante, comprovando, assim, o efeito sinérgico dos antioxidantes em estudo.

Palavras-chave: índice de peróxidos, dienos conjugados, óleos vegetais.

1. INTRODUÇÃO

A soja é um produto agrícola de grande interesse mundial graças à versatilidade de aplicação de seus produtos na alimentação humana e animal e ao seu valor econômico nos mercados nacional e internacional (MELO FILHO et al., 2004).

O Brasil é responsável por cerca de 28% da produção mundial de soja, com a safra de 2007 ao redor de 57 milhões de toneladas. O país é o segundo maior produtor e exportador mundial de soja em grão, farelo e óleo de soja (ABIOVE, 2008).

O óleo de soja, um dos mais saudáveis em seu segmento, contém em sua composição elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados, sendo mais abundantes os ácidos linoléico e linolênico, que são essenciais ao organismo e, como não são sintetizados pelo corpo humano, devem ser ingeridos através dos alimentos (MALACRIDA; JORGE, 2003).

O retardo ou a prevenção da oxidação lipídica, uma das principais causas de deterioração no processo de aquecimento de óleos vegetais, pode ser realizado pela adição de antioxidantes, que mantêm a qualidade do alimento (RAMALHO; JORGE, 2006a).

No entanto, o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade. Sendo assim, pesquisas são realizadas em busca de compostos naturais que apresentem esta propriedade funcional, podendo atuar como alternativa para prevenir a deterioração oxidativa de alimentos e diminuir o uso dos antioxidantes sintéticos.

O TBHQ é considerado o melhor antioxidante sintético para óleos sob temperaturas elevadas, pois resiste ao aquecimento. Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade desse antioxidante apresentar 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).

O TBHQ não é permitido no Canadá e na Comunidade Econômica Européia (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002). No Brasil, o uso de 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).

Por várias décadas, os pesquisadores têm demonstrado um grande interesse em identificar e isolar antioxidantes naturais, devido à rejeição de aditivos sintéticos em alimentos (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2005). Dentre as inúmeras fontes de antioxidantes naturais estão incluídos: cereais (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2005), sementes e cascas de frutas cítricas (PEREIRA, 1996), cogumelos (ELMASTAS et al., 2007), ervas e especiarias (YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNÝ, 2006) e plantas medicinais (SOUSA et al., 2007).

O limão é uma fruta cítrica rica em vitaminas, principalmente vitamina C, fibras e potássio (FERRARI; TORRES, 2002). É extensamente cultivado em pomares e viveiros, pois induz a maturação precoce das frutas, proporcionando melhores preços no início da safra. É utilizado para a fabricação de sucos naturais e concentrados, além de ser tecnologicamente usado como flavorizante em alimentos devido ao óleo essencial presente em sua casca (REDA et al., 2005).

O Brasil se destaca como o segundo maior produtor de frutas cítricas e o maior exportador de sucos cítricos. A produção brasileira de limão está localizada no Estado de São Paulo, o primeiro produtor destes frutos, representando 81,3% da produção, seguido pelo Rio de Janeiro e Bahia com 3,9 e 2,7%, respectivamente (IBRAF, 2008).

Grande parte do resíduo sólido das sementes de limão é uma fonte inexplorada de óleo que pode alcançar 55% de rendimento (FERNANDES et al., 2002). Este óleo pode ser aproveitado pelas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética. As frutas cítricas são conhecidas por conterem antioxidantes naturais na polpa, nas sementes e na casca (PEREIRA, 1996).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, vários estudos têm sido conduzidos com a finalidade de substituí-los por antioxidantes naturais ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos (WANGENSTEEN; SAMUELSEN; MALTERUD, 2004). Além disso, estudos epidemiológicos sugerem que antioxidantes naturais podem ser benéficos ao organismo humano, prevenindo doenças (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002), porém faz-se necessário submeter estes antioxidantes a testes toxicológicos.

Considerando o elevado consumo de alimentos fritos, o interesse em reduzir as alterações que ocorrem no óleo durante o processo de aquecimento e o estímulo à substituição ou à diminuição do uso de antioxidantes sintéticos, torna-se necessário estudar a ação antioxidante do extrato de sementes de limão adicionado ao óleo de soja sob termoxidação, e também, o seu efeito sinérgico com o antioxidante sintético TBHQ, atualmente utilizado pelas indústrias de alimentos com a finalidade de retardar as alterações oxidativas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Sementes de limão

As frutas maduras, variedade galego, foram provenientes de uma plantação no município de Itajobi/SP, colhidas em Janeiro de 2007. Os limões foram cortados pela metade e as sementes retiradas manualmente e, em seguida, lavadas ligeiramente com água destilada para remover restos de polpas e açúcares solúveis provenientes das frutas. As sementes foram secas em estufa, com circulação de ar forçada, a 45°C por 24 horas, para redução do teor de umidade abaixo de 10%. Depois, foram armazenadas em recipientes plásticos, vedados com tampas de rosca e devidamente rotulados para análises posteriores.

2.1.2. Óleo de soja

Para a realização do experimento foi utilizado óleo de soja refinado, sem adição de antioxidantes sintéticos (TBHQ e ácido cítrico). Utilizou-se embalagens contendo 900 mL de óleo de soja, processado pela empresa Cargill Agrícola S/A, Uberlândia-MG.

2.1.3. Antioxidantes

O antioxidante sintético utilizado foi o terc-butilhidroquinona (TBHQ), apresentado na forma em pó, fornecido pela empresa Danisco S/A.

O extrato de sementes de limão foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Pereira (1996). As sementes de limão desidratadas e trituradas (10 g) foram mantidas sob agitação permanente com metanol (100 mL) à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 6 horas e, em seguida, a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm, por 10 minutos. Após a transferência do sobrenadante, o precipitado foi novamente submetido ao processo de extração nas mesmas condições anteriormente explicitadas, e os sobrenadantes resultantes da extração foram combinados. Em seguida, procedeu-se à remoção do solvente utilizado para a obtenção do extrato, sob pressão reduzida a 40°C . O extrato seco foi pesado e ressuspense em metanol, obtendo-se solução-estoque contendo 1 grama de extrato para cada 10 gramas de solvente metanol (1:10), utilizada para aplicação direta no óleo de soja.

2.1.4. Ensaio experimental

Foram submetidos à termoxidação os seguintes tratamentos, conduzidos com duas repetições: i) óleo de soja sem adição de antioxidantes sintéticos e ácido cítrico (Controle), ii) óleo de soja com adição de 2.400 mg/kg de extrato de sementes de limão (ESL), iii) óleo de soja com adição de 50 mg/kg de TBHQ (TBHQ), iv) óleo de soja com adição da mistura de antioxidantes, ou seja, 2.400 mg/kg de extrato de sementes de limão e 50 mg/kg de TBHQ (Mistura 1) e, v) óleo de soja com adição da mistura de antioxidantes, ou seja, 2.400 mg/kg de extrato de sementes de limão e 25 mg/kg de TBHQ (Mistura 2). Definiu-se o valor de 50 mg/kg de antioxidante sintético TBHQ, por ser esta a concentração mais comum deste antioxidante adicionada ao óleo de soja pelas indústrias.

Os tratamentos foram realizados em chapa aquecida, utilizando-se béqueres de 50 mL contendo 30 mL de amostra com relação superfície/volume 0,4/cm. A temperatura foi monitorada a $180 \pm 5^\circ\text{C}$.

O experimento foi conduzido de modo descontínuo, sendo realizadas 10 horas de aquecimento por dia, cujas amostras foram tomadas nos períodos de tempo 0, 5, 10, 15 e 20 horas. As amostras, nos diferentes intervalos de tempo, foram recolhidas em frasco âmbar, inertizadas com nitrogênio gasoso e armazenadas à temperatura de aproximadamente -18°C até o momento das análises.

2.2. Métodos

Com o objetivo de determinar as alterações oxidativas primárias, utilizaram-se análises de peróxidos e dienos conjugados para a avaliação das amostras obtidas durante a termoxidação.

2.2.1. Índice de peróxidos

Denomina-se índice de peróxidos a quantidade de oxigênio ativo, calculada em miliequivalentes, contida em um quilograma de óleo, medida a partir do iodo liberado do iodeto de potássio pelos peróxidos presentes no óleo. Esse índice foi determinado segundo a norma da AOCS Cd 8-53 (AOCS, 1993).

2.2.2. Dienos conjugados

Este método determina dienos conjugados presentes na matéria graxa, expressos como porcentagem de ácidos dienóicos conjugados, após leitura da absorbância a 233 nm. A determinação de dienos conjugados foi efetuada de acordo com o método oficial AOCS Ti 1a-64 (AOCS, 1993).

2.3. Análise estatística

Para as amostras submetidas à termoxidação foram considerados os seguintes fatores: tratamentos (Controle, ESL, TBHQ, Mistura 1 e Mistura 2) e tempos de aquecimento (0, 5, 10, 15 e 20 horas).

Os resultados obtidos para índice de peróxidos e dienos conjugados, em duas repetições, foram submetidos à análise de variância para determinar a influência dos fatores sobre a alteração das amostras de óleos submetidos à termoxidação. O experimento foi realizado em esquema fatorial 5 x 5, no delineamento inteiramente casualizado (BANZATTO; KRONKA 2006). A análise de variância e o teste de Tukey para as médias a 5% foram obtidos por meio do programa ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0 (UNESP, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Índice de peróxidos

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

O Anexo 1 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 tratamentos x tempos de aquecimento, sendo, então, necessário proceder ao desdobramento dessa interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Médias do índice de peróxidos (meq/kg) para a interação tratamentos x tempos de aquecimento a 180°C.

Tratamentos	Tempos de aquecimento (horas)				
	0	5	10	15	20
Controle	1,95 ^{eA}	5,45 ^{dA}	7,67 ^{cA}	8,87 ^{bA}	10,05 ^{aA}
ESL	1,65 ^{eB}	2,75 ^{dC}	3,67 ^{cC}	4,66 ^{bC}	10,05 ^{aA}
TBHQ	1,85 ^{eAB}	3,92 ^{dB}	4,75 ^{cB}	5,85 ^{bB}	10,08 ^{aA}
Mistura 1	1,90 ^{eA}	2,05 ^{dC}	3,61 ^{cC}	5,69 ^{bC}	10,19 ^{aA}
Mistura 2	1,76 ^{eAB}	2,90 ^{dC}	3,37 ^{cC}	5,66 ^{bC}	10,11 ^{aA}

Controle: óleo de soja; ESL: extrato de sementes de limão (2.400 mg/kg); TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg/kg); Mistura 1: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (50 mg/kg); Mistura 2: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (25 mg/kg).

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Observa-se na Tabela 1 que houve um acréscimo no índice de peróxidos para os tratamentos até 20 horas de termoxidação, havendo diferença significativa entre os tempos de aquecimento.

Nota-se que no tempo inicial o ESL proporcionou maior ação protetora ao óleo, seguido da Mistura 2 e TBHQ. De 5 até 15 horas de aquecimento, os teores de peróxidos dos tratamentos ESL, Mistura 1 e Mistura 2 não diferiram significativamente, apresentando-se mais eficientes na proteção do óleo, com relação à formação de peróxidos.

Os tratamentos ESL, TBHQ, Misturas 1 e 2 reduziram a formação de peróxidos em 47, 34, 36 e 36%, respectivamente, às 15 horas a 180°C. Verifica-se que a adição do extrato de sementes de limão ao óleo de soja foi tão eficiente quanto às misturas de antioxidantes, contra a formação de peróxidos. Porém, no tempo final do processo, os tratamentos estudados não diferiram estatisticamente do Controle.

No final do processo, os teores de índice de peróxidos encontram-se dentro da margem permitida pelas normas que regulamentam a adequação de óleo de soja refinado para consumo no Brasil, conforme Resolução RDC 270/05-ANVISA, que estabelece o limite máximo de 10 meq/kg de óleo (BRASIL, 2005).

Andreo (2007) verificou que o TBHQ apresentou maior ação protetora ao óleo, seguido do extrato natural de gengibre e da mistura de extrato com TBHQ. Porém, estes tratamentos tiveram uma rápida perda da ação antioxidante a 180°C, mas o TBHQ foi o primeiro a perder sua eficiência contra a formação de peróxidos no óleo termoxidado.

Alguns 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).

3.2. Dienos conjugados

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. Por serem instáveis, os peróxidos são rapidamente formados e quebrados em compostos menores, porém, os dienos conjugados que se formam concomitantemente permanecem no óleo aquecido (CELLA; REGITANO-D'ARCE;

SPOTO, 2002).

O Anexo 1 apresenta a análise de variância para a determinação de dienos conjugados, 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 tratamentos x tempos de aquecimento. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Médias do dienos conjugados (%) para a interação tratamentos x tempos de aquecimento a 180°C.

Tratamentos	Tempos de aquecimento (horas)				
	0	5	10	15	20
Controle	0,28 ^{eA}	0,75 ^{dA}	1,67 ^{cA}	2,19 ^{bA}	3,02 ^{aA}
ESL	0,27 ^{eA}	0,61 ^{dAB}	1,52 ^{cA}	1,84 ^{bB}	2,49 ^{aB}
TBHQ	0,24 ^{eA}	0,65 ^{dAB}	1,68 ^{cA}	2,24 ^{bA}	2,93 ^{aA}
Mistura 1	0,26 ^{eA}	0,52 ^{dB}	1,05 ^{cB}	1,54 ^{bC}	2,24 ^{aC}
Mistura 2	0,24 ^{eA}	0,49 ^{dB}	1,11 ^{cB}	1,52 ^{bC}	2,19 ^{aC}

Controle: óleo de soja; ESL: extrato de sementes de limão (2.400 mg/kg); TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg/kg); Mistura 1: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (50 mg/kg); Mistura 2: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (25 mg/kg).

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

De acordo com a Tabela 2, observa-se que houve um acréscimo nos valores de dienos conjugados para todos os tratamentos, com o aumento do tempo de aquecimento.

Verifica-se que no início (0 hora) não houve diferença de dienos conjugados nos tratamentos utilizados. Esta diferença começou a ser detectada estatisticamente apenas a partir de 5 horas. Observa-se, no tempo de aquecimento de 10 horas, que os tratamentos ESL e TBHQ não foram eficientes contra a formação de dienos conjugados, pois não diferiram do Controle.

Os tratamentos ESL, Mistura 1 e Mistura 2 demonstraram um desempenho estatisticamente diferente do Controle e do TBHQ somente a partir de 15 horas de termoxidação. Ao final do processo, a atividade antioxidante das Misturas 1 e 2, destacaram-se, apresentando menores níveis de dienos conjugados que o ESL. O TBHQ não diferiu do Controle em todos os tempos de aquecimento.

Ao final do processo, as Misturas 1 e 2 foram capazes de reduzir em 26 e 27%, respectivamente, a formação de dienos conjugados e o ESL reduziu em apenas 17% a formação destes compostos, não ocorrendo diferença significativa entre as Misturas 1 e 2. Portanto, a Mistura 2 pode ser uma alternativa para reduzir a concentração de TBHQ em óleo de soja utilizada pelas indústrias.

Ramalho e Jorge (2006b) encontraram valores de dienos conjugados semelhantes aos determinados no presente trabalho, para o óleo de soja termoxidado a 180°C. Os valores de dienos conjugados para o óleo de soja no tempo inicial e 10 horas de aquecimento foram, respectivamente, 0,26 e 1,61%.

4. CONCLUSÕES

Das alterações oxidativas primárias as análises de peróxidos não foram conclusivas para a avaliação das amostras obtidas durante a termoxidação. Já para a medida dos dienos conjugados a capacidade antioxidante das Misturas 1 e 2, superou o ESL e o TBHQ, adicionado ao óleo de soja na dosagem de 50 mg/kg. Portanto, o efeito sinérgico foi constatado entre os antioxidantes testados durante a termoxidação.

O tratamento Mistura 2 pode ser sugerido como uma prática tecnologicamente viável para reduzir a degradação oxidativa de óleos e gorduras, pois a ação antioxidante dos tratamentos testados neste estudo foi: Mistura 1 = Mistura 2 > ESL > TBHQ > Controle.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em: <http://www.abiove.com.br>. Acesso em: 11 abr. 2008.

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. 1-14, 2000.

ANDREO, D. **Efeito antioxidante do extrato de gengibre (*Gengiber officinale*) adicionado ao óleo de soja sob aquecimento**. 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2007.

AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and**

recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 3 ed. Champaign: AOCS; 1993.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. Experimentação agrícola. 4. ed. Jaboticabal: Funep; 2006. 237 p.

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, n. 1, p. 599-605, 2000.

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, 326 p.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 set. 2005. Seção I.

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.

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.

ELMASTAS, M. et al. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3, p. 337-345, 2007.

FERNANDES, J. B. et al. Extrações de óleos de sementes de citros e suas atividades sobre a formiga cortadeira *Atta sexdens* e seu fungo simbionte. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6B, p. 1091-1095, 2002.

FERRARI, C. K. B.; TORRES, E. A. F. S. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 48, n. 3, p. 375-382, 2002.

IBRAF. INSTITUTO BRASILEIRO DE FRUTAS. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br>. Acesso em: 16 maio. 2008.

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.

MALACRIDA, C. R.; JORGE, N. Alterações do óleo de soja e da mistura azeite de dendê-óleo de soja em frituras descontínuas de batatas chips. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 6, n. 2, 245-249, 2003.

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 FILHO, O. L. et al. Grain yield and seed quality of soybean selected for high protein content. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 5, p. 445-450, 2004.

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-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Literature data may underestimate the actual activity of cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 13, p. 5036-5040, 2005.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006a.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Atividade antioxidante do α -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 65, n. 1, p. 15-20, 2006b.

REDA, S. Y. et al. Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*Citrus limonia* Osbeck) e limão siciliano (*Citrus limon*), um resíduo agroindustrial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 672-676, 2005.

REISCHE; D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. Antioxidants. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 489-516.

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.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

UNESP. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. **ESTAT – Sistema para**

Análises Estatísticas. Versão 2.0, Jaboticabal, 1999. 1 disquete.

WANGENSTEEN, H.; SAMUELSEN, A. B.; MALTERUD, K. E. Antioxidant activity in extracts from coriander. **Food Chemistry**, London, v. 88, n. 2, p. 293-297, 2004.

YAGHMUR, A. et al. Evaluation of argan oil for deep-fat-frying. **Lebensmittel – Wissenschaft Technologie**, London, v. 34, n. 1, p. 124-130, 2001.

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

6. ANEXOS

Anexo 1 – Análise de variância para as determinações de índice de peróxidos (IP) e dienos conjugados (DC).

Causas de Variação	G.L.	Quadrados Médios	
		IP	DC
Tratamentos	4	99,6222**	8,7544**
Tempos de aquecimento	4	8,5708**	0,4534**
Tratamentos x Tempos de aquecimento	16	1,6138**	0,0704**
Resíduo	25	0,0001	0,0040
Desvio padrão		0,01	0,06
Coeficiente de variação (%)		0,21	4,69

** Significativo ($p < 0,01$).

Capítulo 5

Estabilidade oxidativa e resistência de α -tocoferol em óleo de soja adicionado de extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) sob termoxidação

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o efeito isolado e sinérgico do extrato de sementes de limão com o terc-butilhidroquinona (TBHQ), em óleo de soja, submetido à termoxidação, por meio do Rancimat, e da avaliação da resistência do α -tocoferol naturalmente presente no óleo de soja adicionado de extrato de sementes de limão. Desta forma, os tratamentos Controle, TBHQ (50 mg/kg), ESL (2.400 mg/kg Extrato de Sementes de Limão), Mistura 1 (ESL + 50 mg/kg TBHQ) e Mistura 2 (ESL + 25 mg/kg TBHQ) foram submetidos a 180°C por 20 horas, cujas amostras foram tomadas nos intervalos de tempo de 0, 5, 10, 15 e 20 horas e analisadas quanto à estabilidade oxidativa e ao teor de α -tocoferol. Verificou-se que o ESL e as Misturas 1 e 2 apresentaram capacidade de retardar a oxidação lipídica quando adicionados no óleo, e ainda contribuíram para aumentar a retenção do α -tocoferol no óleo aquecido em altas temperaturas. Entretanto, as Misturas 1 e 2 dos antioxidantes adicionados ao óleo apresentaram maior poder antioxidante comprovando, assim, o efeito sinérgico dos antioxidantes.

Palavras-chave: antioxidantes, tocoferóis, frutas cítricas.

1. INTRODUÇÃO

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.

A maioria dos antioxidantes apresenta pouca estabilidade frente à exposição em altas temperaturas. Por isso, é importante a utilização de antioxidantes mais estáveis, com a finalidade de manter as melhores condições possíveis durante processos de fritura, para se obter produtos fritos de melhor qualidade organoléptica e ao mesmo tempo de maior estabilidade, permitindo um prolongamento da vida útil dos óleos (MONFERRER; VILLALTA, 1993; MUKAI et al., 1993).

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 sementes e cascas de frutas cítricas (PEREIRA, 1996), cogumelos (ELMASTAS et al., 2007), ervas e especiarias (YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNÝ, 2006) e plantas medicinais (SOUSA et al., 2007).

As substâncias presentes nessas fontes naturais, que são capazes de agir como antioxidantes, são minerais (principalmente constituindo enzimas), vitaminas e compostos fenólicos. Dentre os antioxidantes mais importantes sob o ponto de vista tecnológico, podem ser citados os tocoferóis, os carotenóides, alguns ácidos orgânicos como cítrico e ascórbico, e os flavonóides. Os extratos de frutas cítricas como o limão (*Citrus limon*) são importantes fontes de ácidos fenólicos (ácido hidroxicinâmico) e flavonóides (flavononas e flavonóis) (DIMITRIOS, 2006).

Os tocoferóis estão presentes de forma natural na maioria dos óleos vegetais. 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). A atividade antioxidante dos tocoferóis se deve principalmente à sua capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos, inibindo a oxidação. Contudo, tem sido notado que a atividade dos tocoferóis *in vitro* depende também de muitas outras possíveis reações paralelas que são drasticamente afetadas pelas suas concentrações (JUNG; MIN, 1999), pela

temperatura e luz, pelo tipo de substrato e por outras espécies químicas atuando como pró-oxidante e sinergista no sistema.

Segundo Frankel (1996), o α -tocoferol pode atuar como antioxidante ou pró-oxidante, mas sua atividade antioxidante, e dos antioxidantes em geral, depende não só da concentração, mas também do sistema testado, do tempo de oxidação e do método usado para acompanhar a oxidação. De acordo com o autor, em altas concentrações, o α -tocoferol promove a formação dos hidroperóxidos.

Considerando tais aspectos, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito isolado e sinergista dos antioxidantes, extrato de sementes de limão e TBHQ, em óleo de soja, submetido à termoxidação, por meio do Rancimat e verificar a influência destes antioxidantes na resistência do α -tocoferol naturalmente presente no óleo de soja adicionado de extrato de sementes de limão.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Sementes de limão

Para a realização deste trabalho foram adquiridas as frutas maduras, variedade galego, provenientes de uma plantação no município de Itajobi-SP, colhidas em Janeiro de 2007. Os limões foram cortados pela metade e as sementes retiradas manualmente e, em seguida, lavadas ligeiramente com água destilada para remover restos de polpas e açúcares solúveis provenientes das frutas. As sementes foram secas em estufa, com circulação de ar forçada a 45°C por 24 horas, para redução do teor de umidade abaixo de 10%. Depois, foram armazenadas em recipientes plásticos, vedados com tampas de rosca e devidamente rotulados para análises posteriores.

2.1.2. Óleo

Para a realização do ensaio experimental foi utilizado óleo de soja refinado, sem adição de antioxidantes sintéticos (TBHQ e ácido cítrico). Utilizou-se

embalagens contendo 900 mL de óleo de soja, processado pela empresa Cargill Agrícola S/A, Uberlândia-MG.

2.1.3. Antioxidantes

O antioxidante sintético utilizado foi o terc-butilhidroquinona (TBHQ), apresentado na forma em pó, fornecido pela empresa Danisco S/A.

Para a obtenção do extrato, as sementes de limão desidratadas e trituradas (10 g) foram mantidas sob agitação permanente com metanol (100 mL) à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 6 horas e, em seguida, a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm, por 10 minutos. Após a transferência do sobrenadante, o precipitado foi novamente submetido ao processo de extração nas mesmas condições anteriormente explicitadas, e os sobrenadantes resultantes da extração foram combinados. Em seguida, procedeu-se à remoção do solvente utilizado para a obtenção do extrato, sob pressão reduzida a 40°C . O extrato seco foi pesado e ressuspenso em metanol, obtendo-se solução-estoque contendo 1 grama de extrato para cada 10 gramas de solvente metanol (1:10), utilizada para aplicação direta no óleo de soja.

2.1.4. Ensaio experimental

Foram submetidos à termoxidação os seguintes tratamentos, conduzidos com duas repetições: i) óleo de soja sem adição de antioxidantes sintéticos e ácido cítrico (Controle), ii) óleo de soja com adição de 2.400 mg/kg de extrato de sementes de limão (ESL), iii) óleo de soja com adição de 50 mg/kg de TBHQ (TBHQ), iv) óleo de soja com adição da mistura de antioxidantes, ou seja, 2.400 mg/kg de extrato de sementes de limão e 50 mg/kg de TBHQ (Mistura 1) e, v) óleo de soja com adição da mistura de antioxidantes, ou seja, 2.400 mg/kg de extrato de sementes de limão e 25 mg/kg de TBHQ (Mistura 2). Definiu-se o valor de 50 mg/kg de antioxidante sintético TBHQ, por ser esta a concentração mais comum deste antioxidante adicionada ao óleo de soja pelas indústrias.

O ensaio experimental foi realizado em chapa aquecida, utilizando-se béqueres de 50 mL contendo 30 mL de amostra com relação superfície/volume 0,4/cm. A temperatura foi monitorada a $180 \pm 5^\circ\text{C}$.

O experimento foi conduzido de modo descontínuo, sendo realizadas 10 horas de aquecimento por dia, cujas amostras foram tomadas nos períodos de tempo 0, 5, 10, 15 e 20 horas. As amostras, nos diferentes intervalos de tempo, foram recolhidas em frasco âmbar, inertizadas com nitrogênio gasoso e armazenadas à temperatura de aproximadamente -18°C até o momento das análises.

2.2. Métodos

2.2.1. Estabilidade oxidativa

A estabilidade oxidativa foi determinada pelo método proposto pela AOCS Cd 12b-92 (1998) utilizando o equipamento Rancimat, que se baseia 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, com utilização de 3 g de amostra e volume de água destilada de 60 mL nos frascos contendo os eletrodos. Por este método, uma curva de condutividade elétrica x tempo é automaticamente registrada com o decorrer da reação e do teste, sendo o período de indução expresso em horas.

2.2.2. α -tocoferol

Para a análise cromatográfica de α -tocoferol, segundo o método AOCS Ce 8-89 (1997), utilizou-se cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), marca Varian modelo 210, equipado com detector de fluorescência. De acordo com as condições da análise, foi utilizada a coluna de sílica de 250 x 4,6 mm com poro de 5 μm , fluxo de 1,2 mL/min e comprimento de onda de excitação em 290 nm e de emissão em 330 nm e como fase móvel, a mistura de 99,5% de n-hexano e 0,5% 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. O balão volumétrico foi coberto com papel alumínio para evitar degradação dos isômeros pela ação da luz. Em seguida, agitou-se o balão volumétrico, por 1 minuto e depois se procedeu à filtragem em filtro de 0,45 μm . Depois de filtrada, a amostra foi injetada no cromatógrafo.

O teor de α -tocoferol foi identificado por comparação com o tempo de retenção do padrão marca Sigma grau de pureza $\geq 95\%$. Estes foram quantificados por padronização externa e os teores de tocoferóis expressos em termos de mg/100 g.

2.3. Análise estatística

Para as amostras submetidas à termoxidação foram considerados os seguintes fatores: tratamentos (Controle, ESL, TBHQ, Mistura 1 e Mistura 2) e tempos de aquecimento (0, 5, 10, 15 e 20 horas).

Os resultados obtidos para estabilidade oxidativa e α -tocoferol, em duas repetições, foram submetidos à análise de variância para determinar a influência dos fatores sobre a alteração das amostras de óleos submetidos à termoxidação. O experimento foi realizado em esquema fatorial 5 x 5, no delineamento inteiramente casualizado (BANZATTO; KRONKA, 2006). A análise de variância e o teste de Tukey para as médias a 5% foram obtidos por meio do programa ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0 (UNESP, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estabilidade oxidativa

A estabilidade oxidativa é um parâmetro comparativo muito utilizado para se avaliar a eficiência da adição de antioxidantes (FRANKEL, 1993).

O Anexo 1 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 tratamentos x tempos de aquecimento. Procedeu-se, então, ao desdobramento dessa interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 1.

Verifica-se na Tabela 1 que ao longo do aquecimento, houve diminuição significativa no período de indução para todos os tratamentos. Observa-se que a estabilidade oxidativa dos tratamentos adicionados de substâncias antioxidantes diferiram do Controle nos tempos 0 e 5 horas, indicando que apresentaram comportamento antioxidante.

Tabela 1 – Médias de estabilidade oxidativa (horas) para a interação tratamentos x tempos de aquecimento a 180°C.

Tratamentos	Tempos de aquecimento (horas)				
	0	5	10	15	20
Controle	13,08 ^{aC}	9,26 ^{bC}	5,76 ^{cB}	1,85 ^{dB}	0,61 ^{eB}
ESL	16,67 ^{aB}	11,13 ^{bB}	8,66 ^{cA}	5,15 ^{dA}	4,74 ^{eA}
TBHQ	20,03 ^{aA}	16,37 ^{bA}	5,21 ^{cB}	2,31 ^{dB}	0,64 ^{eB}
Mistura 1	20,60 ^{aA}	16,06 ^{bA}	9,67 ^{cA}	6,96 ^{dA}	5,08 ^{eA}
Mistura 2	19,99 ^{aA}	16,05 ^{bA}	9,67 ^{cA}	6,98 ^{dA}	5,08 ^{eA}

Controle: óleo de soja; ESL: extrato de sementes de limão (2.400 mg/kg); TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg/kg); Mistura 1: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (50 mg/kg); Mistura 2: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (25 mg/kg).

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

A partir de 10 horas, o óleo acrescido de TBHQ perdeu sua ação antioxidante, pois sua estabilidade não diferiu significativamente do Controle. Verifica-se ainda que os tratamentos ESL, Misturas 1 e 2 continuaram promovendo a estabilidade ao óleo até 20 horas de termoxidação. No final do processo, as concentrações de 25 e 50 mg/kg não diferiram estatisticamente e, por isso, recomenda-se usar 25 mg/kg, com o intuito de reduzir a concentração do antioxidante sintético em óleo de soja, nas condições estudadas.

Angelo e Jorge (2008) observaram que a capacidade antioxidante do extrato de coentro e do palmitato de ascorbila aumentou o período de indução do óleo de girassol, quando adicionados juntos, em comparação com a aplicação de cada antioxidante isoladamente.

Em estudo realizado por Ramalho e Jorge (2008), a adição do extrato de alecrim em óleo de soja, sob aquecimento a 180°C por 10 horas, apresentou eficiência na proteção do óleo.

No presente estudo, os resultados obtidos em relação à estabilidade oxidativa indicaram que a capacidade antioxidante do ESL e das Misturas 1 e 2 foi maior, quando comparada com a do antioxidante sintético TBHQ, utilizado isoladamente.

3.2. α -tocoferol

Uma maneira de monitorar a qualidade de óleos aquecidos é determinando a concentração de antioxidantes nos óleos, sobretudo, dos tocoferóis, os quais são utilizados para prevenir a oxidação lipídica, melhorando sua estabilidade (KAMAL-ELDIN; APPELQVIST, 1996).

Para avaliar o efeito dos fatores tratamentos e tempos de aquecimento, sobre os teores de α -tocoferol, foram realizados os cálculos da análise de variância (Anexo 1). Como observado, o teste F foi significativo ($p < 0,01$) para os efeitos principais e para a interação tratamentos x tempos de aquecimento sendo, então, necessário proceder ao desdobramento dessa interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Médias de α -tocoferol (mg/100 g) para a interação tratamentos x tempos de aquecimento a 180°C.

Tratamentos	Tempos de aquecimento (horas)				
	0	5	10	15	20
Controle	20,58 ^{aA}	18,60 ^{aA}	10,54 ^{bB}	2,19 ^{cB}	0,15 ^{dC}
ESL	20,37 ^{aA}	20,32 ^{aA}	15,77 ^{bA}	9,33 ^{cA}	4,77 ^{dB}
TBHQ	20,38 ^{aA}	19,22 ^{aA}	10,10 ^{bB}	2,37 ^{cB}	0,84 ^{dC}
Mistura 1	20,40 ^{aA}	20,28 ^{aA}	17,66 ^{aA}	9,80 ^{bA}	9,31 ^{bA}
Mistura 2	20,46 ^{aA}	20,21 ^{aA}	17,74 ^{aA}	9,66 ^{bA}	9,13 ^{bA}

Controle: óleo de soja; ESL: extrato de sementes de limão (2.400 mg/kg); TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg/kg); Mistura 1: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (50 mg/kg); Mistura 2: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (25 mg/kg).

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Observa-se que os teores de α -tocoferol nos tratamentos Controle, ESL e TBHQ diminuíram a partir de 10 horas, enquanto que nas Misturas 1 e 2 foram diminuindo a partir de 15 horas.

Verifica-se que em 0 e 5 horas de aquecimento não houve diferença significativa entre os tratamentos. Porém, a partir de 10 horas, os tratamentos diferiram significativamente entre si, apresentando diferentes níveis na retenção de

α -tocoferol. No final do processo de termoxidação, para o óleo adicionado das Misturas 1 e 2 foram constatados os melhores comportamentos em diminuir a degradação do α -tocoferol.

Para se avaliar antioxidantes alimentícios, Decker et al. (2005) mencionaram que a efetividade de um antioxidante, dentre outras maneiras, pode ser expressa em porcentagem de perda ou de retenção após o tempo e demais condições padronizadas. Para facilitar a análise, os mesmos resultados da Tabela 2 estão apresentados em porcentagem de α -tocoferol residual na Tabela 3.

Tabela 3 – Teor de α -tocoferol residual (%) do óleo de soja adicionado de antioxidantes.

Tratamentos	Tempos de aquecimento (horas)				
	0	5	10	15	20
Controle	100	90,43	51,21	10,64	0,73
ESL	100	99,75	77,42	45,80	23,42
TBHQ	100	94,31	49,56	11,63	4,12
Mistura 1	100	99,41	86,57	48,04	45,64
Mistura 2	100	98,78	86,70	47,21	44,62

Controle: óleo de soja; ESL: extrato de sementes de limão (2.400 mg/kg); TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg/kg); Mistura 1: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (50 mg/kg); Mistura 2: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (25 mg/kg).

Em 10 horas de aquecimento, a degradação do α -tocoferol apresenta-se de forma não significativa, ou seja, menor que 50%. O teor de α -tocoferol residual para o óleo adicionado de ESL durante o aquecimento é maior do que para o Controle. Porém, os tratamentos ESL e Misturas 1 e 2 apresentaram maior eficiência em reter os tocoferóis no óleo de soja.

Observa-se ainda que, ao final do aquecimento, houve uma degradação acentuada de α -tocoferol para os tratamentos Controle e TBHQ. Porém, o ESL obteve uma retenção de α -tocoferol de 23,42%; enquanto que as Misturas 1 e 2 obtiveram valores próximos de 45%. Visto que as Misturas 1 e 2 obtiveram comportamentos iguais entre si, recomenda-se às indústrias de óleos vegetais diminuir a concentração do antioxidante sintético, TBHQ, substituindo-o parcialmente pelo antioxidante natural. O Anexo 2 apresenta os cromatogramas da Mistura 2 para

o α -tocoferol nos tempos inicial e final, respectivamente, da termoxidação.

Sayago et al. (2007) ao estudarem diversos óleos vegetais durante o aumento da temperatura concluíram que a estabilidade oxidativa está diretamente relacionada com o conteúdo inicial de tocoferol.

Contudo, ao final da termoxidação, os valores resultantes das determinações da estabilidade oxidativa e teor de α -tocoferol apresentaram coeficiente de correlação positiva e elevada ($r = 0,9300$) para as médias dos tratamentos utilizados.

4. CONCLUSÕES

Os resultados permitem considerar que o ESL apresentou capacidade de retardar a oxidação lipídica, quando adicionado isolado em óleo de soja submetido à termoxidação. Entretanto, as Misturas 1 e 2 adicionadas ao óleo apresentaram maior poder antioxidante que o antioxidante aplicado isoladamente, comprovando, assim, o efeito sinérgico dos antioxidantes estudados.

O ESL, bem como as Misturas 1 e 2 contribuíram para aumentar a retenção do α -tocoferol no óleo de soja aquecido em alta temperatura, o que os tornam uma alternativa viável para reduzir a degradação de óleos e gorduras.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOCS. AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**. 5 ed. Champaign: AOCS, 1997.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Antioxidant evaluation of coriander extract and ascorbyl palmitate in sunflower oil under thermoxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 85, p. 1045-1049, 2008.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237 p.

DECKER, E. A. et al. Measuring antioxidant effectiveness in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 9, p. 4303-4310, 2005.

DIMITRIOS, B. Sources of natural phenolics antioxidants. **Trends in Food Science & Technology**, Guildford, v. 17, n. 9, p. 505-512, 2006.

ELMASTAS, M. et al. Determination of antioxidant activity and antioxidant

compounds in wild edible mushrooms. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3, p. 337-345, 2007.

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. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 4, n. 7, p. 220-225, 1993.

JUNG, M. Y.; MIN, D. B. Effects of α -, γ -, and δ -tocopherols on oxidative stability of soybean oil. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 55, n. 5, p.1464-1465, 1999.

KAMAL-ELDIN, A.; APPELQVIST, L. A. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. **Lipids**, Champaign, v. 31, n. 7, p. 671-701, 1996.

KARPINSKA, M.; BOROWSKI, J.; DANOWSKA, O. M. The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. **Food Chemistry**, London, v. 72, n. 1, p. 5-9, 2001.

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

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

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.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidant action of rosemary extract in soybean oil submitted to thermoxidation. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 59, n. 2, p. 128-131, 2008.

SAYAGO, A. et al. Vitamina E y aceites vegetales. **Grasas y Aceites**, Sevilla, 58, n. 1, p. 74-86, 2007.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

UNESP. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. **ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas**. Versão 2.0, Jaboticabal, 1999. 1 disquete.

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

6. ANEXOS

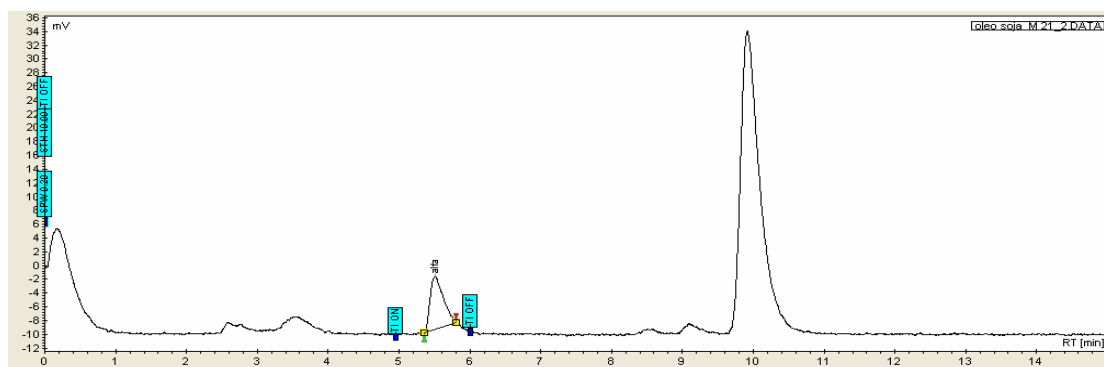
Anexo 1 – Análise de variância para as determinações da estabilidade oxidativa (EO) e α -tocoferol (α -Toc).

Causas de Variação	G.L.	Quadrados Médios	
		EO	α -Toc
Tratamentos	4	370,4036**	52,8588**
Tempos de aquecimento	4	62,4610**	406,6506**
Tratamentos x Tempos de aquecimento	16	8,6245**	5,3041**
Resíduo	25	0,1402	0,3185
Desvio padrão		0,37	0,56
Coeficiente de variação (%)		3,96	5,99

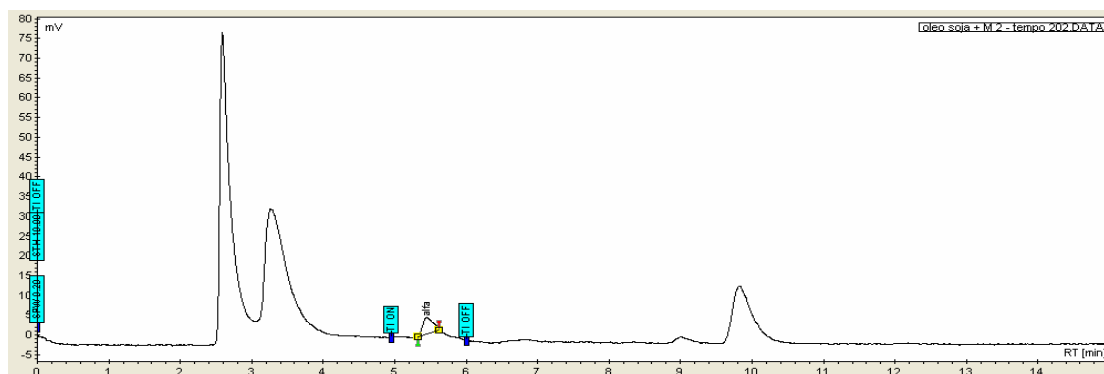
** Significativo ($p < 0,01$).

Anexo 2 – Cromatogramas da Mistura 2 para o α -tocoferol nos tempos inicial (a) e final (b) da termoxidação a 180°C.

(a)



(b)



Capítulo 6

**Perfil de ácidos graxos e avaliação do óleo de soja
termoxidado adicionado de extrato de sementes de limão
(*Citrus limon*)**

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o perfil dos ácidos graxos e medir a alteração do óleo de soja termoxidado adicionado de extrato de sementes de limão, verificando o efeito isolado e sinérgico do extrato de sementes de limão com o TBHQ. Desta forma, os tratamentos Controle, ESL (2.400 mg/kg Extrato de Sementes de Limão), TBHQ (50 mg/kg), Mistura 1 (ESL + 50 mg/kg TBHQ) e Mistura 2 (ESL + 25 mg/kg TBHQ) foram preparados e submetidos a 180°C durante 20 horas, cujas amostras foram tomadas nos intervalos de tempo 0, 5, 10, 15 e 20 horas e analisadas quanto à composição em ácidos graxos e compostos polares totais. Os resultados obtidos das determinações analíticas foram submetidos à análise de variância e teste de Tukey para as médias a 5% de significância. Verificou-se um aumento da porcentagem de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, e diminuição dos ácidos graxos poliinsaturados, independentemente dos tratamentos estudados. Quanto aos compostos polares totais, observou-se que as Misturas 1 e 2 apresentaram teores abaixo de 25% até 20 horas de aquecimento, não ultrapassando os limites recomendados por alguns países para descarte de óleos e/ou gorduras sob elevadas temperaturas, comprovando, assim, o efeito sinérgico entre os antioxidantes.

Palavras-chave: compostos polares totais, cromatografia gasosa, termoxidação.

1. INTRODUÇÃO

Os óleos e gorduras são predominantemente triésteres de ácidos graxos e glicerol, chamados triacilgliceróis. Em geral, os ácidos graxos saturados tendem a elevar o colesterol sanguíneo em todas as frações de lipoproteínas. Por outro lado, o consumo de alimentos, fontes de ácidos graxos poliinsaturados, principalmente ômega-3 e ômega-6, está associado a uma redução do risco de desenvolvimento de várias doenças, como aterosclerose e doenças cardiovasculares.

A composição em ácidos graxos dos alimentos é de grande importância, principalmente os poliinsaturados das famílias ômega-3 e ômega-6, aos quais se atribuem benefícios ao organismo humano. A família ômega-3 compreende o ácido graxo essencial α -linolênico (C18:3, ω -3), do qual, por alongamento e dessaturação, são gerados os ácidos eicosapentaenóico (EPA – C20:5) e docosahexaenóico (DHA – C22:6). A família ômega-6 compreende o ácido graxo essencial linoléico, que pode originar o ácido araquidônico (DARSHAN; RUDOLPH, 2000).

O processo de termoxidação é muito utilizado em vários estudos para simular o processo de fritura e consiste em submeter óleos e gorduras a altas temperaturas, porém sem a presença do alimento, ou seja, sem a umidade e demais componentes que provêm do alimento (SHYAMALA et al., 2005).

A fritura é um processo complexo, no qual o alimento é submerso em óleo quente que, ao agir como meio de transferência de calor, confere ao produto características agradáveis de cor, sabor, textura e palatabilidade. Além dessas alterações positivas, o processo também é responsável pela ocorrência de reações de degradação, que modificam as qualidades funcionais e nutricionais do alimento, podendo chegar a níveis em que o produto se torna impróprio ao consumo e sem a qualidade desejada (MÁRQUEZ-RUIZ; PÉREZ-CAMINO; DOBARGANES, 1990).

Com o aquecimento do óleo, uma série de reações produz numerosos compostos de degradação, sendo que mais de 400 compostos químicos diferentes têm sido identificados em óleos aquecidos deteriorados (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARCE, 2000).

Produtos de degradação não voláteis, que permanecem no óleo, promovem maior degradação do mesmo e são responsáveis pelas mudanças nas propriedades físicas e químicas do óleo. As alterações físicas mais frequentemente observadas são aumento da viscosidade, alteração da cor e formação de espuma. Como

resultado das alterações químicas ocorre o aumento dos ácidos graxos livres, compostos carbonílicos, produtos de alto peso molecular, diminuição das insaturações, entre outras (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002).

O grau de insaturação do óleo tem sido considerado há muito tempo como um dos fatores mais importantes, devido à distinta reatividade dos ácidos graxos insaturados. Segundo Paul e Mittal (1997), os óleos vegetais apresentam alto índice de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados. Assim, são mais susceptíveis às alterações oxidativas que óleos com maior quantidade de ácidos graxos saturados (LOLOS; OREOPOULOU; TZIA, 1999). Em pouco tempo, apresentam-se rançosos à temperatura ambiente e de qualidade inferior para operações de aquecimento com curtos períodos de reposição. Também, tornam-se inadequados para uso em alimentos que necessitam de vida de prateleira mais longa.

Existe uma ampla variedade de métodos analíticos que são utilizados para avaliação dos óleos e gorduras sob elevadas temperaturas (BASTIDA; SÁNCHEZ-MUNIZ, 2001; STEVENSON; VAISEY-GENSER; ESKIN, 1984; WHITE, 1991). Entretanto, a determinação dos compostos polares totais por cromatografia em coluna tem sido relatada por vários autores como um dos melhores métodos para determinação do estado de alteração do óleo aquecido (MARMESAT et al., 2007; PÉREZ-CAMINO et al., 1988).

A determinação da quantidade total dos produtos de alteração, originados como consequência do processo de aquecimento, constitui a base das limitações de uso dos óleos existentes em muitos países, estabelecida em torno de 25% de compostos polares (STEVENSON; VAISEY-GENSER; ESKIN, 1984), pois, quanto maior a fração polar, pior a qualidade do óleo.

Entende-se por compostos polares totais todos aqueles que têm uma polaridade maior que os triacilgliceróis e que correspondem aos não voláteis, resultantes da alteração oxidativa, térmica e hidrolítica (DOBARGANES; MÁRQUEZ-RUIZ, 1998).

Desta maneira, o presente trabalho teve como objetivos avaliar o perfil dos ácidos graxos e medir a alteração do óleo de soja termoxidado, adicionado de extrato de sementes de limão, verificando o efeito isolado e sinérgico dos antioxidantes, natural e sintético.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.1. Sementes de limão

Para a realização da parte experimental foram empregadas frutas maduras, variedade galego, provenientes de uma plantação no município de Itajobi-SP, colhidas em Janeiro de 2007. Os limões foram cortados pela metade e as sementes retiradas manualmente e, em seguida, lavadas ligeiramente com água destilada para remover restos de polpas e açúcares solúveis provenientes das frutas. As sementes foram secas em estufa, com circulação de ar forçada a 45°C por 24 horas, para redução do teor de umidade abaixo de 10%. Depois, foram armazenadas em recipientes plásticos, vedados com tampas de rosca e devidamente rotulados para análises posteriores.

2.1.2. Óleo

Para a realização do experimento foi utilizado óleo de soja refinado, sem adição de antioxidantes sintéticos (TBHQ e ácido cítrico). Utilizou-se embalagens contendo 900 mL de óleo de soja, processado pela empresa Cargill Agrícola S/A, Uberlândia-MG.

2.1.3. Antioxidantes

O antioxidante sintético utilizado foi o terc-butilhidroquinona (TBHQ), apresentado na forma em pó, fornecido pela empresa Danisco S/A.

Para a obtenção do extrato, as sementes de limão desidratadas e trituradas (10 g) foram mantidas sob agitação permanente com metanol (100 mL) à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 6 horas e, em seguida, a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm, por 10 minutos. Após a transferência do sobrenadante, o precipitado foi novamente submetido ao processo de extração nas mesmas condições anteriormente explicitadas, e os sobrenadantes resultantes da extração foram combinados. Em seguida, procedeu-se à remoção do solvente utilizado para a

obtenção do extrato, sob pressão reduzida a 40°C. O extrato seco foi pesado e ressuspenso em metanol, obtendo-se solução-estoque contendo 1 g de extrato para cada 10 g de solvente metanol (1:10), utilizada para aplicação direta no óleo de soja.

2.1.4. Ensaio experimental

Foram submetidos à termoxidação os seguintes tratamentos, conduzidos com duas repetições: i) óleo de soja sem adição de antioxidantes sintéticos e ácido cítrico (Controle), ii) óleo de soja com adição de 2.400 mg/kg de extrato de sementes de limão (ESL), iii) óleo de soja com adição de 50 mg/kg de TBHQ (TBHQ), iv) óleo de soja com adição da mistura de antioxidantes, ou seja, 2.400 mg/kg de extrato de sementes de limão e 50 mg/kg de TBHQ (Mistura 1) e, v) óleo de soja com adição da mistura de antioxidantes, ou seja, 2.400 mg/kg de extrato de sementes de limão e 25 mg/kg de TBHQ (Mistura 2). Definiu-se o valor de 50 mg/kg de antioxidante sintético TBHQ, por ser esta a concentração mais comum deste antioxidante adicionada ao óleo de soja pelas indústrias.

O ensaio experimental foi realizado em chapa aquecida, utilizando-se béqueres de 50 mL contendo 30 mL de amostra com relação superfície/volume 0,4/cm. A temperatura foi monitorada a $180 \pm 5^\circ\text{C}$.

O experimento foi conduzido de modo descontínuo, sendo realizadas 10 horas de aquecimento por dia, cujas amostras foram tomadas nos períodos de tempo 0, 5, 10, 15 e 20 horas. As amostras, nos diferentes intervalos de tempo, foram recolhidas em frasco âmbar, inertizadas com nitrogênio gasoso e armazenadas à temperatura de aproximadamente -18°C até o momento das análises.

2.2. Métodos

2.2.1. Composição em ácidos graxos

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes nos óleos foram obtidos segundo procedimento descrito por Hartman e Lago (1973).

Para a análise cromatográfica de ácidos graxos, utilizou-se um cromatógrafo a gás, marca Varian (Walnut Creek, USA), modelo GC 3900, equipado com detector

de ionização de chama, injetor e amostrador automático. Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 de 50 m de comprimento, com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,20 μm .

A programação de temperatura da coluna foi iniciada em 50°C por 2 minutos, aquecida a 4°C/min até 240°C e mantida em isoterma durante 20,5 minutos. As temperaturas utilizadas no injetor e no detector foram 230 e 250°C, respectivamente. As amostras foram injetadas no volume de 1 μL , adotando-se a razão de divisão de 1:30. O gás de arraste foi o hidrogênio com velocidade linear de 30 mL/min.

Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção de padrões puros de ésteres metílicos de ácidos graxos, com os componentes separados das amostras e a quantificação foi feita por normalização de área (%). Utilizou-se como padrão uma mistura composta de 37 ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco, Bellefonte, USA), de C4:0 a C24:1, com pureza entre 99,1 e 99,9%.

2.2.2. Compostos polares totais

Para a determinação dos compostos polares totais foi aplicado o método cromatográfico, proposto por Dobarganes, Velasco e Dieffenbacher (2000). 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. Os resultados, obtidos mediante cromatografia em coluna, foram expressos em porcentagem.

2.3. Análise estatística

O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado (BANZATTO; KRONKA, 2006), cujas análises de variância e teste de Tukey a 5% foram obtidos por meio do programa ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0 (UNESP, 1999).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição em ácidos graxos

As médias dos resultados da composição percentual em ácidos graxos para os tratamentos podem ser observadas nas Tabelas 1 a 5. Nota-se que as amostras iniciais utilizadas no presente estudo apresentam composição em ácidos graxos de acordo com o que estabelece a legislação brasileira para óleos vegetais refinados (CODEX-STAN 210, 2005.)

Ao avaliar o perfil de ácidos graxos para os tratamentos durante o processo de aquecimento, verificou-se uma diferença significativa ($p < 0,05$) com aumento da porcentagem de ácidos graxos saturados e monoinsaturados e diminuição da quantidade de poliinsaturados, considerados ácidos graxos essenciais.

Desta maneira, observa-se que no final do processo de aquecimento as porcentagens de ácidos graxos saturados aumentaram em 52,31; 45,43; 24,56; 14,17 e 13,75% para o Controle, ESL, TBHQ, Mistura 2 e Mistura 1, respectivamente. O mesmo comportamento foi observado para os ácidos graxos monoinsaturados, obtendo aumento de 31,11% para o Controle, 20,62% para o ESL, 21,02% para o TBHQ, 14,45 e 9,52% para as Misturas 1 e 2, respectivamente. Já para os ácidos graxos essenciais houve uma diminuição dos ácidos linoléico e linolênico em maior porcentagem para o Controle (17,47%), seguidos do ESL (10,46%), TBHQ (13,43%), Mistura 1 (7,56%) e Mistura 2 (5,97%). O Anexo 2 ilustra os cromatogramas da composição em ácidos graxos do óleo de soja adicionado de Mistura 2 nos tempos inicial e final, respectivamente, da termoxidação.

Segundo Pantzaris (1998), a diminuição do conteúdo de ácidos linoléico e linolênico, durante o processo de aquecimento, se deve à sua destruição por oxidação, polimerização, entre outros e deveria, portanto, ser um importante teste de qualidade para óleos.

3.2. Compostos polares totais

O Anexo 1 apresenta a análise de variância para a determinação de compostos polares totais, utilizando os valores obtidos ao longo do período experimental.

Tabela 1 – Médias da composição em ácidos graxos do Controle durante a termoxidação a 180°C.

Ácidos Graxos (%)	Tempos de aquecimento (horas)				
	0	5	10	15	20
C14:0	0,05	0,27	0,29	0,42	0,46
C16:0	10,48	10,85	12,04	13,10	13,27
C16:1	0,13	0,24	0,25	0,32	0,33
C18:0	1,15	2,15	2,40	3,28	3,36
C18:1	18,90	19,95	21,10	22,90	24,53
C18:2	58,66	57,75	56,07	54,36	52,90
C18:3	7,84	5,88	4,67	2,76	1,98
C20:0	–	0,14	0,18	0,26	0,31
C20:1	–	0,03	0,03	0,08	0,09
C22:0	–	0,15	0,22	0,35	0,39
AGS	11,68 ^e	13,56 ^d	15,13 ^c	17,41 ^b	17,79 ^a
AGM	19,03 ^e	20,22 ^d	21,28 ^c	23,30 ^b	24,95 ^a
AGP	66,50 ^a	63,63 ^b	60,74 ^c	57,12 ^d	54,88 ^e
NI	2,79	2,59	2,85	2,17	2,38

a, b ... (linha): médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). C14:0: ácido mirístico, C16:0: ácido palmítico, C16:1: ácido palmitoléico, C18:0: ácido esteárico, C18:1: ácido oléico, C18:2: ácido linoléico, C18:3: ácido α -linolênico, C20:0: ácido araquídico, C20:1: ácido eicosenóico, C22:0: ácido beênico, AGS: ácidos graxos saturados, AGM: ácidos graxos monoinsaturados, AGP: ácidos graxos poliinsaturados, NI: não identificados.

Tabela 2 – Médias da composição em ácidos graxos do óleo de soja adicionado de ESL durante a termoxidação a 180°C.

Ácidos Graxos (%)	Tempos de aquecimento (horas)				
	0	5	10	15	20
C14:0	0,08	0,23	0,39	0,35	0,39
C16:0	10,65	10,73	10,84	10,91	11,95
C16:1	0,14	0,22	0,23	0,31	0,31
C18:0	1,86	2,93	2,90	3,10	3,17
C18:1	20,09	21,41	22,04	23,62	24,08
C18:2	58,32	56,85	56,32	55,03	54,10
C18:3	6,43	5,28	5,23	4,02	3,88
C20:0	0,03	0,09	0,16	0,20	0,22
C20:1	0,13	0,13	0,15	0,17	0,17
C22:0	0,41	0,48	0,49	0,49	0,50
AGS	13,03 ^e	14,46 ^d	14,78 ^c	15,05 ^b	16,23 ^a
AGM	20,36 ^e	21,76 ^d	22,42 ^c	24,10 ^b	24,56 ^a
AGP	64,75 ^a	62,13 ^b	61,55 ^c	59,05 ^d	57,98 ^e
NI	1,86	1,65	1,25	1,80	1,23

a, b ... (linha): médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). C14:0: ácido mirístico, C16:0: ácido palmítico, C16:1: ácido palmitoléico, C18:0: ácido esteárico, C18:1: ácido oléico, C18:2: ácido linoléico, C18:3: ácido α -linolênico, C20:0: ácido araquídico, C20:1: ácido eicosenóico, C22:0: ácido beênico, AGS: ácidos graxos saturados, AGM: ácidos graxos monoinsaturados, AGP: ácidos graxos poliinsaturados, NI: não identificados.

Tabela 3 – Médias da composição em ácidos graxos do óleo de soja adicionado de TBHQ durante a termoxidação a 180°C.

Ácidos Graxos (%)	Tempos de aquecimento (horas)				
	0	5	10	15	20
C14:0	0,08	0,25	0,39	0,45	0,49
C16:0	9,43	9,65	10,34	11,80	12,09
C16:1	0,16	0,25	0,29	0,30	0,32
C18:0	1,54	2,68	2,90	2,99	3,04
C18:1	19,41	21,48	22,34	22,80	23,32
C18:2	59,31	58,50	56,32	54,83	54,07
C18:3	7,94	5,49	5,23	4,85	4,15
C20:0	0,10	0,13	0,28	0,30	0,33
C20:1	0,08	0,10	0,13	0,14	0,14
C22:0	0,12	0,18	0,34	0,43	0,44
AGS	11,27 ^e	12,89 ^d	14,25 ^c	15,97 ^b	16,39 ^a
AGM	19,65 ^e	21,83 ^d	22,76 ^c	23,24 ^b	23,78 ^a
AGP	67,25 ^a	63,99 ^b	61,55 ^c	59,68 ^d	58,22 ^e
NI	1,83	1,29	1,44	1,11	1,61

a, b ... (linha): médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). C14:0: ácido mirístico, C16:0: ácido palmítico, C16:1: ácido palmitoléico, C18:0: ácido esteárico, C18:1: ácido oléico, C18:2: ácido linoléico, C18:3: ácido α -linolênico, C20:0: ácido araquídico, C20:1: ácido eicosenóico, C22:0: ácido beênico, AGS: ácidos graxos saturados, AGM: ácidos graxos monoinsaturados, AGP: ácidos graxos poliinsaturados, NI: não identificados.

Tabela 4 – Médias da composição em ácidos graxos do óleo de soja adicionado de Mistura 1 durante a termoxidação a 180°C.

Ácidos Graxos (%)	Tempos de aquecimento (horas)				
	0	5	10	15	20
C14:0	0,02	0,03	0,05	0,06	0,07
C16:0	10,47	10,49	10,62	11,50	11,95
C16:1	0,04	0,05	0,06	0,09	0,09
C18:0	2,92	2,95	3,10	3,18	3,19
C18:1	21,24	22,23	22,26	23,50	24,21
C18:2	57,49	57,26	57,07	55,93	54,90
C18:3	6,42	6,32	5,89	4,56	4,18
C20:0	0,02	0,04	0,06	0,07	0,08
C20:1	0,10	0,12	0,13	0,17	0,17
C22:0	0,46	0,48	0,48	0,49	0,51
AGS	13,89 ^e	13,99 ^d	14,31 ^c	15,30 ^b	15,80 ^a
AGM	21,38 ^e	22,14 ^d	22,45 ^c	23,76 ^b	24,47 ^a
AGP	63,91 ^a	63,58 ^b	62,96 ^c	60,49 ^d	59,08 ^e
NI	0,82	0,29	0,28	0,45	0,65

a, b ... (linha): médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).
 C14:0: ácido mirístico, C16:0: ácido palmítico, C16:1: ácido palmitoléico, C18:0: ácido esteárico, C18:1: ácido oléico, C18:2: ácido linoléico, C18:3: ácido α -linolênico, C20:0: ácido araquídico, C20:1: ácido eicosenóico, C22:0: ácido beênico, AGS: ácidos graxos saturados, AGM: ácidos graxos monoinsaturados, AGP: ácidos graxos poliinsaturados, NI: não identificados.

Tabela 5 – Médias da composição em ácidos graxos do óleo de soja adicionado de Mistura 2 durante a termoxidação a 180°C.

Ácidos Graxos (%)	Tempos de aquecimento (horas)				
	0	5	10	15	20
C14:0	0,01	0,02	0,02	0,03	0,03
C16:0	10,57	10,59	10,65	11,89	12,31
C16:1	0,02	0,05	0,06	0,06	0,06
C18:0	2,98	2,95	3,11	3,11	3,15
C18:1	21,32	22,25	22,49	22,90	23,27
C18:2	57,75	56,76	56,49	55,90	55,78
C18:3	6,39	6,32	5,80	4,76	4,53
C20:0	0,02	0,02	0,03	0,04	0,04
C20:1	0,08	0,10	0,10	0,12	0,13
C22:0	0,46	0,48	0,48	0,49	0,50
AGS	14,04 ^e	14,06 ^d	14,29 ^c	15,56 ^b	16,03 ^a
AGM	21,42 ^e	22,40 ^d	22,65 ^c	23,08 ^b	23,46 ^a
AGP	64,14 ^a	63,08 ^b	62,29 ^c	60,66 ^d	60,31 ^e
NI	0,40	0,46	0,77	0,70	0,20

a, b ... (linha): médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). C14:0: ácido mirístico, C16:0: ácido palmítico, C16:1: ácido palmitoléico, C18:0: ácido esteárico, C18:1: ácido oléico, C18:2: ácido linoléico, C18:3: ácido α -linolênico, C20:0: ácido araquídico, C20:1: ácido eicosenóico, C22:0: ácido beênico, AGS: ácidos graxos saturados, AGM: ácidos graxos monoinsaturados, AGP: ácidos graxos poliinsaturados, NI: não identificados.

Observa-se que o teste F foi significativo ($p < 0,01$) para os efeitos principais e para a interação tratamentos x tempos de aquecimento. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento da interação, cujos resultados encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6 – Médias de compostos polares totais (%) para a interação tratamentos x tempos de aquecimento a 180°C.

Tratamentos	Tempos de aquecimento (horas)				
	0	5	10	15	20
Controle	4,43 ^{eA}	7,43 ^{dA}	17,94 ^{cA}	35,50 ^{bA}	40,37 ^{aA}
ESL	2,72 ^{eB}	5,83 ^{dB}	15,61 ^{cB}	25,81 ^{bB}	35,51 ^{aB}
TBHQ	3,41 ^{eAB}	5,67 ^{dB}	16,63 ^{cB}	34,93 ^{bA}	40,98 ^{aA}
Mistura 1	3,61 ^{cAB}	3,77 ^{cC}	11,85 ^{bC}	22,11 ^{aC}	22,43 ^{aC}
Mistura 2	3,72 ^{cAB}	3,85 ^{cC}	11,99 ^{bC}	22,24 ^{aC}	22,32 ^{aC}

Controle: óleo de soja; ESL: extrato de sementes de limão (2.400 mg/kg); TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg/kg); Mistura 1: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (50 mg/kg); Mistura 2: ESL (2.400 mg/kg) + TBHQ (25 mg/kg).

a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). A, B... (coluna): médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Nota-se na Tabela 6 que de 5 horas até o final do aquecimento, os tratamentos adicionados de substâncias antioxidantes demonstraram ação protetora ao óleo quanto à formação de compostos polares totais, embora em diferentes níveis de eficiência.

Verifica-se que a partir de 5 horas, o óleo adicionado das Misturas 1 e 2, apresentou menor formação de compostos polares. Em 20 horas de aquecimento os tratamentos ESL, Misturas 1 e 2 retardaram a formação de polares em 12,03; 44,44 e 44,71%, respectivamente, demonstrando eficiência na proteção do óleo. Vale ressaltar que o TBHQ apresentou comportamento semelhante ao Controle, não retardando a formação de compostos polares totais.

No Brasil, não há legislação que estabeleça limite máximo para o valor de compostos polares em óleos de frituras. Após 20 horas a 180°C, o óleo adicionado de ESL ultrapassou o limite de 25% (35,51%), recomendado pela legislação internacional. Porém, o mesmo não ocorreu com os tratamentos em que foram adicionadas as Misturas 1 e 2, os quais atingiram aproximadamente 22% de compostos polares totais. O TBHQ, antioxidante sintético muito utilizado em óleos

sob elevadas temperaturas, ultrapassou este limite, apresentando cerca de 41% de compostos polares, quando adicionado na concentração de 50 mg/kg.

Em geral, os valores obtidos para os compostos polares neste estudo encontram-se próximos aos citados na literatura. Assim, o óleo de soja apresentou 17,94% de compostos polares no tempo de 10 horas de termoxidação a 180°C, enquanto que Barrera-Arellano et al. (2002) obtiveram 18,6%.

4. CONCLUSÕES

Os resultados permitem considerar que, independentemente dos tratamentos estudados, houve um aumento da porcentagem de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, e diminuição dos ácidos graxos poliinsaturados do óleo de soja ao longo do processo de termoxidação.

Quanto aos compostos polares totais, verificou-se que o ESL apresentou eficiência na proteção do óleo quando adicionado isolado em óleo de soja submetido à termoxidação. Entretanto, os tratamentos Misturas 1 e 2 apresentaram poder antioxidante maior que o antioxidante aplicado isoladamente, comprovando, assim, o efeito sinérgico dos antioxidantes estudados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. 1-14, 2000.

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006. 237 p.

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, n. 14, p. 1696-1702, 2002.

BASTIDA, S.; SÁNCHEZ-MUNIZ, J. Thermal oxidation of olive oil, sunflower oil and a mix of both oils during forty discontinuous domestic fryings of different foods. **Food Science and Technology International**, London, v. 7, n. 1, p. 15-21, 2001.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (FAO/WHO). Codex Standards for vegetable oils, CODEX STAN 210 - 2005. Codex Alimentarius, Roma, Itália, rev. 3,

2005.

DARSHAN, S. K.; RUDOLPH, I. L. Effect of fatty acids of ω -6 and ω -3 type on human status and role of eicosanoids. **Nutrition**, New York, v. 16, n. 2, p. 143-145, 2000.

DOBARGANES, M. C.; MÁRQUEZ-RUIZ, G. Regulation of used frying fats and validity of quick tests for discarding the fats. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 49, n. 2, p. 331-335, 1998.

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.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fat acids methyl esters. **Laboratory and Practice**, London, v. 22, n. 475-476, 1973.

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, n. 11, p. 1524-1528, 1999.

MARMESAT, S. et al. Quality of used frying fats and oils: comparison of rapid tests based on chemical and physical oil properties. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 601-608, 2007.

MÁRQUEZ-RUIZ, G.; PÉREZ-CAMINO, M. C.; DOBARGANES, M. C. Evaluación nutricional de grasas termoxidadas y de fritura. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 41, n. 6, p. 432-439, 1990.

PANTZARIS, T. P. Comparison of monounsaturated and polyunsaturated oils in continuous frying. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 49, n. 5, p. 319-325, 1998.

PAUL, S.; MITTAL, G. S. Regulating the use of degraded oil/fat in deep-fat/oil food frying. **Critical Review in Food Science and Nutrition**, Cleveland, v. 37, n. 4, p. 635-662, 1997.

PÉREZ-CAMINO, M. C. et al. Alteración de grasas usadas en fritura. Correlación entre índices analíticos y métodos de evaluación directa de compuestos de degradación. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 39, n. 1, p. 72-76, 1988.

REISCHE; D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. Antioxidants. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 489-516.

SHYAMALA, B. N. et al. Leafy vegetable extracts – antioxidant activity and effect on storage. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, Berlin, v. 6, n. 2, p. 239-245, 2005.

STEVENSON, S. G.; VAISEY-GENSER, M.; ESKIN, N. A. M. Quality control in the use of deep frying oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 61, n. 6, p. 1102-1108, 1984.

UNESP. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. **ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas**. Versão 2.0, Jaboticabal, 1999. 1 disquete.

WHITE, P. J. Métodos para medir los cambios en los aceites de fritura por inmersión en grasas. **Alimentaria**, Madrid, v. 9, n. 1, p. 81-87, 1991.

6. ANEXOS

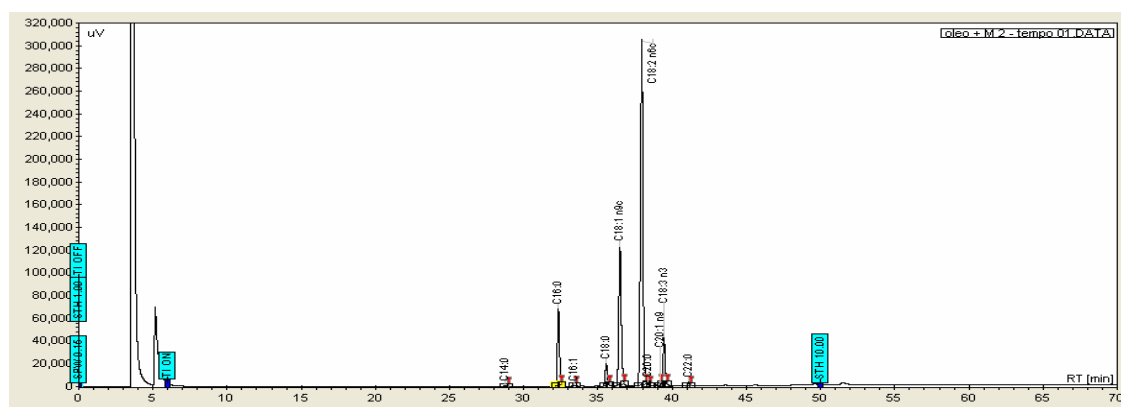
Anexo 1 – Análise de variância para a determinação de compostos polares totais.

Causas de Variação	G.L.	Quadrado Médio
Tratamentos	4	1.698,3785**
Tempos de aquecimento	4	158,6550**
Tratamentos x Tempos de aquecimento	16	31,3663**
Resíduo	25	0,1425
Desvio padrão		0,38
Coefficiente de variação (%)		2,24

** Significativo ($p < 0,01$).

Anexo 2 – Cromatogramas da composição em ácidos graxos do óleo de soja adicionado de Mistura 2 nos tempos inicial (a) e final (b) da termo oxidação a 180°C.

(a)



(b)

