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

PATRÍCIA VIEIRA DEL RÉ

EXTRATOS DE ESPECIARIAS: APLICAÇÕES EM ÓLEO DE SOJA E REPERCUSSÕES SOBRE O PERFIL LIPÍDICO *IN VIVO*

São José do Rio Preto
2010

PATRÍCIA VIEIRA DEL RÉ

EXTRATOS DE ESPECIARIAS: APLICAÇÕES EM ÓLEO DE SOJA E REPERCUSSÕES SOBRE O PERFIL LIPÍDICO *IN VIVO*

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos (Área de concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos).

Orientadora: Profª. Drª. Neuza Jorge

São José do Rio Preto
2010

PATRÍCIA VIEIRA DEL RÉ

EXTRATOS DE ESPECIARIAS: APLICAÇÕES EM ÓLEO DE SOJA E REPERCUSSÕES SOBRE O PERFIL LIPÍDICO *IN VIVO*

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Neuza Jorge
Presidente e Orientadora

Profª. Drª. Sabria Aued-Pimentel
2º Examinador

Profª. Drª. Renata Maria Galvão de Campos Cintra
3º Examinador

Profª. Drª. Teresa Cristina Bolzan Quaioti
4º Examinador

Prof. Dr. Crispin Humberto Garcia
5º Examinador

São José do Rio Preto, 9 de abril de 2010.

À minha mãe, Neusa, e ao meu pai, José, que se doam de corpo e alma aos filhos.

Às minhas irmãs Luciana e Raquel, pelo amor que nos une.

Ao meu amor, Adenilson, pela sua força e palavras carinhosas.

Aos meus sobrinhos, Rafael e Gabriel, que renovam a família e alegria que nos alimenta a vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por minhas conquistas, e à minha família pelo apoio irrestrito.

À Profa. Dra. Neuza Jorge, por toda a paciência, ensinamentos e apoio disponibilizado durante todos estes anos de convivência.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pelo financiamento do projeto de pesquisa, concedido em nome do Profa. Dra. Neuza Jorge, processo n°. 2007/50341-8.

À Granol Ind. Com. e Exp. S/A, Danisco S/A e Kalsec® por cederem materiais para o desenvolvimento deste trabalho.

Às minhas queridas parceiras Simara e Luana, que dividiram muitas horas de trabalho comigo, meu carinho e gratidão.

Às minhas alunas Carol e Larissa, pelo auxílio e dedicação no ensaio biológico e análises *in vivo*.

Aos meus colegas da Pós-Graduação, Cássia, Marcel, Carol, Ângela, Michelle, Tainara, Carolina, Caroline, Larissa e em especial a Débora, por todo apoio e pelo auxilio nas análises cromatográficas.

À minha grande amiga Priscila Milene Angelo Sanches, pela infinita cumplicidade, apoio incondicional e dedicação a nossa amizade.

À minha amiga e companheira de trabalho Profa. Dra. Agdamar Affini Suffredini, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP, pelo apoio técnico dos médicos veterinários Karina Ferreira de Castro e Rodrigo Storti Pereira e do biólogo Crasso Paulo Bosco Breviglieri, do Hospital Veterinário do Centro Universitário de Rio Preto, no desenvolvimento do ensaio biológico.

Ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fluídos Complexos – USP, pelo apoio técnico nas análises de oxidação da LDL-ox.

SUMÁRIO

RESUMO **9**
ABSTRACT **10**
LISTA DE FIGURAS **11**
LISTA DE TABELAS **12**
INTRODUÇÃO **13**

CAPÍTULO 1 – Revisão da literatura
Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde **15**
Resumo 16
1.1. Introdução 17
1.2. Oxidação e produção de radicais livres 18
1.3. Mecanismos de proteção 21
1.4. As especiarias 22
1.5. Considerações finais 30
1.6. Referências bibliográficas 30

CAPÍTULO 2 – Ensaio I
Potencial antioxidante das especiarias: aplicação de oleoresinas de orégano (*Oreganum vulgare* L.), manjericão (*Ocimum basilicum* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) em óleo vegetal **40**
Resumo 41
2.1. Introdução 42
2.2. Material e métodos 43
2.2.1. Material 43
2.2.2. Caracterização das oleoresinas 43
2.2.3. Aplicação das oleoresinas 44
2.2.4. Análise estatística 44
2.3. Resultados e discussão 44
2.4. Conclusões 50
2.5. Referências bibliográficas 51
2.6. Anexos 55

CAPÍTULO 3 – Ensaio II

Extratos de especiarias de orégano (*Oreganum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) em óleo vegetal: efeito antioxidante em condições de termoxidação 57
Resumo 58
3.1. Introdução 59
3.2. Material e métodos 60
3.2.1. Material 60
3.2.2. Procedimento experimental 60
3.2.3. Métodos 61
3.2.4. Análise estatística 61
3.3. Resultados e discussão 62
3.4. Conclusões 66
3.5. Referências bibliográficas 66
3.6. Anexos 68

Extratos de especiarias de orégano (*Oreganum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.): efeito protetor e perfil de ácidos graxos em óleo de soja termoxidado 69
Resumo 70
3.7. Introdução 71
3.8. Material e métodos 72
3.8.1. Material 72
3.8.2. Procedimento experimental 72
3.8.3. Métodos 73
3.8.4. Análise estatística 74
3.9. Resultados e discussão 74
3.10. Conclusões 82
3.11. Referências bibliográficas 82
3.12. Anexos 85

CAPÍTULO 4 – Ensaio III

Atividade antioxidante das oleoresinas de orégano (*Origanum vulgar* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) em óleo de soja sob estocagem 87

Resumo 88

4.1. Introdução 89

4.2. Material e métodos 90

4.2.1. Material 90

4.2.2. Procedimento experimental 90

4.2.3. Métodos 91

4.2.4. Análise estatística 91

4.3. Resultados e discussão 92

4.4. Conclusões 95

4.5. Referências bibliográficas 96

4.6. Anexos 98

CAPÍTULO 5 – Ensaio IV

Extratos de especiarias de orégano (*Origanum vulgar* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.): repercussões sobre o perfil lipídico *in vivo* 99

Resumo 100

5.1. Introdução 101

5.2. Material e métodos 102

5.2.1. Ensaio biológico 102

5.2.2. Análises *in vivo* 103

3.2.4. Análise estatística 105

5.3. Resultados e discussão 106

5.4. Conclusões 110

5.5. Referências bibliográficas 110

5.6. Anexos 114

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante de extratos de especiarias, na forma de oleoresinas, aplicados em óleo de soja e sua repercussão sobre o perfil lipídico *in vivo.* O trabalho experimental foi dividido em quatro ensaios. No Ensaio I, a atividade antioxidante das oleoresinas de orégano, manjericão e tomilho, em diferentes concentrações, foi avaliada no óleo de soja por meio da estabilidade oxidativa. As duas oleoresinas mais efetivas, orégano e tomilho, foram selecionadas na concentração de 3.000 $mg.kg^{-1}$ para serem submetidas aos ensaios posteriores. Nos Ensaios II e III, o óleo de soja adicionado das oleoresinas de orégano e tomilho ou da mistura das mesmas foi submetido à termoxidação (180ºC/30 horas) e ao teste acelerado em estufa (60ºC/10 dias), cujas amostras foram tomadas nos intervalos de tempo de 0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 horas e 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias, respectivamente. As amostras termoxidadas foram analisadas quanto à estabilidade oxidativa, índice de peróxidos, dienos conjugados, compostos polares totais e perfil de ácidos graxos, enquanto que as amostras do teste acelerado em estufa foram analisadas quanto ao índice de peróxidos e dienos conjugados. No Ensaio IV a atividade antioxidante e hipolipemiante das oleoresinas foram avaliadas *in vivo*, utilizando ratos *Wistar* alimentados com dieta hipercolesterolêmica e suplementação das oleoresinas por gavagem (16 $mg.kg^{-1}$). No sangue coletado após o experimento foram realizadas análises de perfil lipídico (colesterol total e frações, triglicérides) e oxidação da LDL. A partir dos resultados obtidos, verificou-se que em elevada temperatura, termoxidação, as oleoresinas aplicadas de forma isolada apresentaram um poder antioxidante maior que o antioxidante TBHQ, entretanto, a mistura das concentrações, promoveu maior estabilidade ao óleo e menor formação de compostos polares, assim como menor formação de ácidos graxos saturados em detrimento aos ácidos graxos mono e poliinsaturados. No teste acelerado em estufa, as oleoresinas isoladamente não conseguiram proteger o óleo na mesma proporção que o TBHQ, mas a mistura das oleoresinas e conseqüente aumento da concentração foi tão eficiente quanto o antioxidante sintético. Os resultados *in vivo* indicaram que a suplementação com a oleoresina de orégano foi a mais efetiva na diminuição do colesterol total e aumento da fração HDL. A suplementação de oleoresinas não apresentou efeitos positivos em relação aos índices de triglicérides e auto-anticorpos contra LDL oxidada.

ABSTRACT

This study aims at evaluating the antioxidant activity of spice extracts, in form of oleoresins, applied in soybean oil and its repercussion on the lipid profile in vivo. The experiment was divided into four tests. Test I evaluated the antioxidant activity of oleoresins oregano, basil and thyme, in different concentrations, in soybean oil by means of oxidative stability determination. The most effective oleoresins, oregano and thyme, were selected in a concentration of 3.000 $mg.kg^{-1}$ and subjected to the subsequent tests. In the Tests II and III, the soybean oil containing either oregano and thyme oleoresins or the mixture of both, was subjected to thermal oxidation (180ºC/30 hours) and to the Schaal oven test (60°C/10 days). The samples were taken in time intervals of 0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30 hours and 0, 2, 4, 6, 8 and 10 days, respectively. The thermal oxidated samples were analyzed concerning their oxidative stability, peroxide value, conjugated dienes, total polar compounds and fatty acids profiles, while the samples from the Schaal oven test were analyzed concerning their peroxide value and conjugated dienes. Test IV evaluated the antioxidant and hypolipemiant activities of oleoresins in vivo using Wistar rats that were fed in a hypercholesterolemic diet and oleoresin supplementation by gavage (16 $mg.kg^{-1}$). The blood collected after the experiment had its lipid profile (total cholesterol and fractions, triglycerides) and LDL oxidation analyzed. Considering the results obtained, it was possible to verify that the oleoresins applied isolatedly presented an antioxidant power greater than the TBHQ antioxidant in high temperatures, thermal oxidation. However, the mixture of concentrations gave more stability to the oil and reduced the formation of polar compounds. It also reduced the formation of saturated fatty acids in detriment of mono and polyunsaturated fatty acids. In the Schaal oven test, the oleoresins isoladetly could not protect the oil as the TBHQ could. On the other hand, the mixture of oleoresins and consequent increase of concentration were as effective as the synthetic antioxidant. The results in vivo indicated that the supplementation with oregano oleoresin was the most effective regarding the reduction of total cholesterol and increase of the HDL fraction. The supplementation of oleoresins did not present positive effects regarding the triglycerides values and auto-antibodies against LDL-ox.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Curvas cinéticas do potencial antioxidante das oleoresinas no sistema β-caroteno/ácido linoléico 46

Figura 2 – Estabilidade oxidativa do óleo de soja em diferentes concentrações das oleoresinas de orégano e tomilho 50

Figura 3 – Médias de estabilidade oxidativa para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 180°C 62

Figura 4 – Médias de índice de peróxidos para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 180°C 64

Figura 5 – Médias de dienos conjugados para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 180°C 65

Figura 6 – Médias de compostos polares totais para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 180°C 74

Figura 7 – Cromatogramas da composição em ácidos graxos do óleo de soja adicionado de mistura das oleoresinas no tempo inicial(a) e no tempo final (b) da termoxidação a 180°C 79

Figura 8 – Médias de ácidos graxos saturados para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 180°C 80

Figura 9 – Médias de ácidos graxos monoinsaturados para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 180°C 81

Figura 10 – Médias de ácidos graxos poliinsaturados para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 180°C 82

Figura 11 – Médias de índice de peróxidos para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 60°C 92

Figura 12 – Médias de dienos conjugados para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 60°C 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constituintes das oleoresinas estudadas 43

Tabela 2 – Atividade antioxidante (AA), em porcentagem, das oleoresinas pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico 45

Tabela 3 – Teor de fenólicos totais, expresso em mg de equivalente de ácido gálico por 100 g de oleoresina 46

Tabela 4 – Médias da estabilidade oxidativa para as diferentes concentrações das oleoresinas adicionadas em óleo de soja 48

Tabela 5 – Fatores de proteção para as oleoresinas aplicadas no óleo de soja 49

Tabela 6 – Fatores de proteção para as oleoresinas aplicadas no óleo de soja com base na formação de compostos polares 76

Tabela 7 – Médias do perfil de ácidos graxos para todos os tratamentos nos tempos 0, 15, 30 horas durante a termoxidação 77

Tabela 8 – Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico 103

Tabela 9 – Valores médios de ganho de peso corporal e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) dos animais em função das diferentes dietas e suplementações utilizadas 106

Tabela 10 –Valores médios dos parâmetros bioquímicos séricos dos animais em função das diferentes dietas e suplementações utilizadas 107

Tabela 11 –Valores médios da determinação de auto-anticorpos contra LDL-ox, expressos em Índice de Reatividade (IR), dos grupos em função das diferentes dietas e suplementações utilizadas 109

INTRODUÇÃO

Diante das várias implicações dos lipídios na saúde, o seu comportamento, metabolismo e funções são hoje muito estudados. Os lipídios são substâncias altamente instáveis, sujeitas a drásticas mudanças em suas características organolépticas, propriedades funcionais e valor nutricional.

A deterioração oxidativa dos lipídios é uma das reações mais importantes e freqüentes nos alimentos onde estão presentes. Este fenômeno provoca há algum tempo interesse nos pesquisadores, devido às conseqüências geradas no alimento e pelo intenso uso de óleos e gorduras como matéria-prima alimentar e industrial.

A aplicação de antioxidantes é um dos caminhos mais simples para reduzir ou minimizar estas alterações, entretanto, o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade.

Durante as últimas décadas a preocupação do consumidor em relação à qualidade dos alimentos cresceu consideravelmente, associada à procura por alimentos funcionais ou componentes alimentares ativos fisiologicamente, também designados bioativos. Paralelamente objetiva-se a redução do emprego de produtos sintéticos em alimentos industrializados fortalecendo o apelo de que o alimento deve desempenhar funções terapêuticas e ainda não trazer riscos á saúde.

Na utilização de antioxidantes naturais destacam-se dois aspectos nutricionais importantes, seu efeito positivo tanto na conservação da qualidade do alimento, podendo substituir os antioxidantes sintéticos, quanto na preservação da saúde humana, por minimizar danos oxidativos, principalmente nas doenças cardiovasculares.

Tanto no Brasil como em todo o mundo, as doenças cardiovasculares estão entre os maiores riscos de mortalidade. Uma das ações mais eficazes para a diminuição das estatísticas de mortalidade e morbidade por doença arterial coronariana é o controle do perfil lipídico. A mudança de estilo de vida, incluindo a adoção de novos hábitos nutricionais, é uma das abordagens indicadas para prevenir e tratar a doença. Uma opção seria a introdução de antioxidantes naturais na dieta habitual que, devido à presença de componentes bioativos os caracterizam como alimentos funcionais.

As especiarias, fontes naturais de antioxidantes, são tradicionalmente utilizadas como ingredientes, o que permite que sejam facilmente utilizadas nesse

processo de substituição dos antioxidantes sintéticos e desta forma, apresentar potencialização da estabilidade oxidativa dos produtos alimentícios.

Com esta perspectiva, somando-se a restrição do uso em alimentos de antioxidantes sintéticos, tem aumentado o interesse na pesquisa de substâncias naturais com atividades antioxidantes.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo geral avaliar a atividade antioxidante de extratos de especiarias, na forma de oleoresinas, aplicados em óleo de soja e sua repercussão sobre o perfil lipídico *in vivo.*

Para tanto, os objetivos específicos do presente trabalho foram:

- Determinar a atividade antioxidante em diferentes concentrações das oleoresinas (orégano, manjericão e tomilho) aplicadas no óleo de soja;
- Avaliar o efeito isolado e combinado das oleoresinas, em óleo de soja, sob diferentes condições de oxidação;
- Avaliar o efeito antioxidante e hipolipemiante das oleoresinas sob o perfil lipídico e a oxidação da fração LDL *in vivo.*

CAPÍTULO 1 – Revisão da literatura
Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde

Resumo

O crescente interesse na substituição de antioxidantes sintéticos por naturais em alimentos tem fomentado a pesquisa sobre fontes vegetais, caracterização de matérias-primas e identificação de novos compostos antioxidantes. As reações de oxidação não são uma preocupação exclusiva das indústrias alimentícias, seu estudo é também amplamente necessário para evitar implicações indesejáveis na saúde humana. O objetivo desta revisão, depois de apresentar aspectos gerais sobre a oxidação, é concentrar-se nos benefícios da utilização das especiarias como antioxidantes naturais, em especial as da família Labiatae, amplamente utilizadas na culinária brasileira.

Palavras-chave: oxidação, antioxidantes naturais, especiarias.

1.1. Introdução

A oxidação lipídica que ocorre nos produtos alimentares é uma das principais preocupações em Tecnologia de Alimentos. É responsável por odores e sabores desagradáveis nos produtos, com conseqüente diminuição da segurança e qualidade nutricional, causados pela formação de compostos potencialmente tóxicos. Sua prevenção é economicamente importante e fundamental para a proteção da saúde humana (TSAI; TSAI; SU, 2005).

Os antioxidantes apresentam-se como uma alternativa para prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos e minimizar os danos oxidativos nos seres vivos. Como o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade, demonstrando a possibilidade desses antioxidantes apresentarem alguma toxidez (BAUER et al., 2001), pesquisas encontram-se voltadas para a busca de compostos naturais que exibam esta propriedade funcional (MELO; GUERRA, 2002).

A própria exigência do consumidor reforça o mercado potencial dos antioxidantes naturais, uma vez que existe grande desconforto de uma parcela da população em manter a aquisição e consumo de alimentos industrializados, cuja produção reconhecidamente envolva o emprego de substanciais quantidades de aditivos sintéticos (AMAROWICZ et al., 2004; VALENTÃO et al., 2002).

O início do novo milênio, com o aumento da expectativa de vida e as crescentes informações divulgadas sobre saúde, levam o consumidor a procurar cada vez mais uma alimentação saudável para a prevenção das doenças. Paralelamente, os avanços da ciência permitem um melhor conhecimento sobre as propriedades dos alimentos.

Diversas ervas e especiarias culinárias já foram relatadas por possuírem atividades antioxidantes, sugerindo, inclusive, potencial benéfico à saúde humana (YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNY, 2006).

Apesar das evidências bioquímicas, clínicas e epidemiológicas crescentes para muitos dos compostos funcionais, não existe ainda um consenso científico estabelecido que suporte decisões no âmbito de políticas mais globais de saúde pública referente a seu uso. Há necessidade, então, de aprofundar o campo de pesquisa relativo à identificação destes compostos e seus mecanismos de ação biológica e à elaboração de alimentos dirigidos às finalidades especiais de saúde.

Essas considerações apontam a importância do estudo das especiarias

como antioxidantes naturais, de modo a minimizar os processos oxidativos e prevenir alterações metabólicas no organismo humano, tema que será objeto desta revisão.

1.2. Oxidação e produção de radicais livres

Oxidação lipídica é um fenômeno complexo induzido por oxigênio na presença de catalisadores, tais como calor, radicais livres, luz, pigmentos e íons metálicos (LAGUERRE; LECOMTE; VILLENEUVE, 2007). O mecanismo de oxidação pode ocorrer nos tecidos animais e vegetais e em produtos obtidos dos mesmos como óleos e gorduras.

Existem três formas nos quais os óleos podem sofrer oxidação, a saber: autoxidação, fotoxidação e termoxidação (BERGER; HAMILTON, 1995). Todas estas rotas contribuem para diminuir sua qualidade e modificar sua estrutura, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, além de afetar a integridade e segurança dos alimentos, através da formação de compostos potencialmente tóxicos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

A autoxidação, reação complexa catalisada por fatores extrínsecos, se inicia com a formação de radicais livres e, ocorre principalmente nos ácidos graxos insaturados, devido à instabilidade eletrônica que as duplas ligações apresentam, tornando os hidrogênios ligados aos carbonos, onde as insaturações estão localizadas, mais fáceis de serem retirados da cadeia carbônica (NAWAR, 1996; SALEM JR., 1999).

De acordo com Gordon (2001), a autoxidação de um óleo ocorre por meio de um processo em cadeia, que envolve uma seqüência de reações: formação do radical livre em condições favorecidas por luz e calor (fase de iniciação), formação de peróxidos e hidroperóxidos (fase de propagação) e formação de produtos estáveis de oxidação, tipo aldeídos e cetonas (fase de terminação).

A fotoxidação é outro mecanismo proposto para a degradação oxidativa dos óleos, tendo em vista que a reação direta dos substratos lipídicos com o oxigênio atmosférico é termodinamicamente improvável de acontecer (GORDON, 1990). A reação é promovida essencialmente pela radiação UV em presença de sensibilizadores, envolvendo a participação do oxigênio singlete como intermediário reativo (NAWAR, 1996).

Os hidroperóxidos formados durante o processo de oxidação lipídica são

essencialmente inodoros, contudo eles se decompõem em uma grande variedade de compostos secundários voláteis e não-voláteis (WARNER, 2002), Os compostos voláteis são parcialmente eliminados em processos de aquecimento do óleo e sua importância está relacionada com as características sensoriais (JORGE, 2004). Já os produtos de degradação não voláteis são de grande interesse sob o ponto de vista nutricional, já que fazem parte da dieta ao permanecerem dissolvidos no óleo e serem, portanto, incorporados aos alimentos (WARNER, 2002).

Estudos revelam que alimentos alta ou moderadamente oxidados são bastante aterogênicos e que o colesterol oxidado parece ser particularmente, perigoso. Seus produtos de oxidação, denominados óxidos de colesterol, que compreendem um vasto número de compostos, promovem a aterosclerose, além de danos mutagênicos, citogênicos e arteriais (ADEGOKE et al., 1998).

Araújo (2004) afirma que os peróxidos afetam a atividade de diversas enzimas, alteram as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que estão envolvidas no desenvolvimento de lesões arterioscleróticas. Acredita-se que a oxidação das LDL seja a principal causa de doenças cardiovasculares e a decomposição de peróxidos formados pela ação da lipoxigenase pode ser o mecanismo inicial da oxidação da LDL.

Os hidroperóxidos e seus produtos também podem reagir com proteínas, alterando o valor nutritivo, as propriedades reológicas e as características sensoriais dos alimentos. Os aminoácidos livres, principalmente a metionina, cistina, histidina, lisina e resíduos de outros aminoácidos sofrem substancial oxidação na presença de radicais livres (JADHAV et al., 1995). Como conseqüência, tem-se uma diminuição da digestibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais, redução da solubilidade das proteínas e alteração na textura e cor dos alimentos (FERRARI, 1998; JADHAV et al., 1995; KIRK, 1984).

No organismo humano a oxidação de biomoléculas e produção de radicais livres são partes integrais do metabolismo. Os radicais livres são moléculas instáveis, pelo fato de possuírem um número ímpar de elétrons. Para atingir a estabilidade, estas moléculas necessitam adquirir elétrons e, portanto, reagem com a maioria dos compostos vizinhos, oxidando-os (SANCHEZ-MORENO, 2002).

As espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN) são continuamente produzidas no organismo e, em concentrações fisiológicas, desempenham funções essenciais relacionadas à sinalização do ciclo celular, à

defesa imunológica (RIBEIRO et al., 2005) e à biologia reprodutiva (SANOCKA; KURPISZ, 2004). Entretanto, em concentrações supra-fisiológicas e deficiência no sistema protetor, ocorre um desequilíbrio entre agentes agressores e defensores, caracterizando o estresse oxidativo.

A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) é inevitável no metabolismo aeróbico do organismo. Este termo é freqüentemente utilizado para descrever não somente radicais livres como: radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), ânion radical superóxido ($O2^{\bullet -}$), óxido nítrico ($NO^{\bullet}$) e radical peroxila ($ROO^{\bullet}$), mas também os que não são radicais livres como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozônio (O_3), oxigênio singlete ($^1O_2$) e ácido hipocloro (HOCl), os quais podem induzir reações no organismo. Além dessas espécies serem geradas no processo endógeno fisiológico, também são geradas no patológico, e por fontes exógenas (ARUOMA, 1994; HALLIWELL, 1994).

As fontes exógenas geradoras de radicais livres incluem tabaco, poluição do ar, solventes orgânicos, anestésicos, pesticidas e radiações (KAUR, KAPOOR, 2001; SOARES, 2002). O excesso de exercícios, condições de vida e trabalho desgastantes também podem causar estresse oxidativo fisiológico (FERRARI, 1998).

Em sistemas biológicos, os ácidos graxos poliinsaturados das membranas são muito vulneráveis ao ataque de radicais livres, os quais desencadearão reações de oxidação nos ácidos graxos da membrana lipoprotéica, denominada peroxidação lipídica, que afetará a integridade estrutural e funcional da membrana celular, alterando sua fluidez e permeabilidade (HALLIWELL; ARUOMA, 1997).

Como resultado da peroxidação lipídica há destruição das membranas celulares, com alteração das bombas de Na^+/K^+ (sódio/potássio) e Ca_2^+/Mg_2^+ (cálcio/magnésio), havendo perda da homeostase interna da célula por intenso desequilíbrio iônico, alteração do equilíbrio osmótico e conseqüente ruptura da membrana e morte celular (OLSZEWER; FLAM; ELLOVICH, 1997).

Esse processo pode influenciar no aumento da viscosidade do sangue promovido por triglicérides e colesterol que interferem na transferência de oxigênio, nutrientes e substâncias essenciais para qualquer órgão do corpo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990). Os hidroperóxidos e os radicais lipídicos (alquila e peroxila) podem se decompor em uma série de produtos intermediários como o malonadialdeído e vários tipos de hidroxialquenais biologicamente ativos, tóxicos ou mutagênicos. Nesse caso, podem reagir com grupos funcionais de proteínas ou

DNA, modificando estas macromoléculas (BURCHAM, 1998; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Esse quadro de desequilíbrio pode provocar modificações na função e na estrutura celular, causando, lenta e progressivamente, alterações nos tecidos e no código genético, e o desenvolvimento de vários problemas de saúde, dentre os quais destacam-se vários tipos de neoplasias, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, artrite, diabetes, danos à estrutura do DNA, processos inflamatórios com a redução do poder das células de defesa; e ainda existe uma relação com o processo de envelhecimento (CHOW, 2002; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; HSU; GUO, 2002; PIETTA; SIMONETTI; MAURI, 1998; YEN; CHEN, 1995).

1.3. Mecanismos de proteção

Estruturalmente, os antioxidantes são compostos aromáticos que possuem pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos, largamente utilizados pela indústria de alimentos, ou naturais, como organosulfurados, fenólicos e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos alimentos (RAMALHO; JORGE, 2006a).

Os antioxidantes podem ser classificados, segundo seu mecanismo de ação, em primários ou secundários. Os antioxidantes primários atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres (ADEGOKE et al., 1998), enquanto os antioxidantes secundários atuam na complexação com metais, seqüestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete (DECKER, 2002).

Bioquimicamente, o organismo humano possui sistemas de defesa para lidar com o estresse oxidativo, que incluem os sistemas enzimáticos, especialmente superóxido dismutase, glutationa peroxidase, catalase e glutationa (LAGUERRE; LECOMTEA; VILLENEUVE, 2007). Auxiliando este sistema existe ainda a ação dos antioxidantes não enzimáticos, compostos principalmente pelas vitaminas, polifenóis, flavonóides, carotenóides e licopeno (AMAROWICZ et al., 2004; POLYAKOV et al., 2001; VELIOGLU et al. 1998). As ações destes compostos são de neutralizar radicais livres, quelar metais e bloquear a ação de espécies reativas, principalmente a de oxigênio.

Neste contexto, uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância

que, presente em baixas concentrações, quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz" (RIBEIRO et al., 2008).

Os mecanismos endógenos de defesa podem ser auxiliados favoravelmente com a introdução de antioxidantes por meio da dieta (BRENNA; PAGLIARINI, 2001; YILDRIM; MAVI; KARA, 2001).

A dieta brasileira, característica de um país tropical, pode ser uma importante fonte de antioxidantes, pois é composta por vegetais e frutos que são ricos em vitaminas, compostos fenólicos e diversas substâncias que auxiliam a manter a saúde celular inibindo a instalação de patogenias ligadas ao estresse oxidativo.

A utilização de antioxidantes por meio da promoção de uma dieta adequada, ou seja, aquela que segue padrões estabelecidos de ingestão diária recomendada de nutrientes é preconizada por diversos especialistas. A ingestão de alimentos contendo antioxidantes, considerando-se a recomendação de consumo diário de 4 a 5 porções de hortaliças e 3 a 5 porções de frutas (PHILIPPI et al., 1999), pode contribuir para que os indivíduos reduzam o risco de doenças crônico não-transmissíveis.

Evidências epidemiológicas mostram associação inversa entre o consumo freqüente de frutas e hortaliças e o risco de doenças crônicas não-transmissíveis, como as cardiovasculares e diversos tipos de câncer (HIGDON; FREI, 2003; KIM et al., 2006; YANISHLIEVA; MARINOVA, 2001) e também a diabetes (McCUNE; JOHNS, 2002).

Embora possam ou não contribuir com o valor nutricional de uma dieta, as especiarias podem ser fontes de antioxidante natural relevante, visto que são utilizadas tradicionalmente como ingredientes, o que permite que sejam facil e diretamente empregadas por suas propriedades antioxidantes em alimentos e possivelmente em outros sistemas (LEE; AHN, 2003).

1.4. As especiarias

O termo especiaria é definido como material seco da planta que normalmente é acrescentado ao alimento para melhorar o *flavor* (MADSEN; BERTELSEN, 1995). Podem ser acrescentadas nos alimentos de várias formas: inteiras, frescas, secas, como extratos isolados e/ou óleo essencial.

Os componentes provedores de sabores existentes nas especiarias consistem de compostos como alcoóis, ésteres, aldeídos, terpenos, fenóis, ácidos orgânicos e muitos outros elementos, que não têm sido totalmente identificados (SAGDIÇ, 2003).

A atividade antioxidante das especiarias está relacionada, principalmente, com a presença de compostos fenólicos. Compostos como os flavonóides e terpenóides (como timol, carvacrol e eugenol) também apresentam atividade antioxidante.

Quantitativamente, os compostos fenólicos são os antioxidantes mais representativos do reino vegetal, e podem ser quimicamente definidos como substâncias que possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas; podem também apresentar outros grupos substituintes em sua estrutura, como ésteres, metil-ésteres e glicosídios (MARTÍNEZ-VALVERDE; PERIAGO; ROS, 2000).

Os compostos fenólicos exibem grande quantidade de propriedades fisiológicas como antialérgica, antiarteriogênica, antiinflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora, mas o principal efeito dos compostos fenólicos têm sido atribuído à sua ação antioxidante em alimentos (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Em geral os compostos fenólicos são multifuncionais como antioxidantes, pois atuam de várias formas: combatendo os radicais livres, quelando metais de transição, interrompendo a reação de propagação dos radicais livres na oxidação lipídica, modificando o potencial redox do meio, reparando a lesão das moléculas atacadas por radicais livres (KYUNGMI; EBELER, 2008; PODSEDEK, 2007). Também bloqueiam a ação de enzimas específicas que causam inflamação; modificam as rotas metabólicas das prostaglandinas (VALKO et al., 2007); protegem a aglomeração plaquetária; e inibem a ativação de carcinógenos (LIU, 2005).

Além da ação preventiva de substâncias fenólicas, presentes nas especiarias, sobre a oxidação lipídica em alimentos, sugere-se também, um provável efeito antiinflamatório, devido à ação inibitória sobre enzimas da biossíntese dos eicosanóides (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

Outro fator de destaque das especiarias é no processo digestivo. A presença de enzimas é fundamental para a digestão de nutrientes, acredita-se que alguns extratos vegetais possam estimular a produção de saliva e dos sucos gástrico e pancreático, favorecendo a secreção enzimática e melhorando a digestibilidade dos

nutrientes (MELLOR, 2000).

Entretanto, para uma especiaria atuar como moduladora da promoção da saúde, não depende só dos teores de fitoquímicos, mas também da forma de preparo e da quantidade consumida.

Similarmente ao que ocorre com outras plantas, a composição e concentração de princípios ativos dos extratos de especiarias podem apresentar grandes diferenças segundo sua origem, espécie, variedade, controle genético, fase de desenvolvimento durante a colheita, estímulos proporcionados pelo meio como, por exemplo, fatores climáticos, exposição a microrganismos, insetos e outros herbívoros, poluentes e tipo de processamento pós-colheita. Todas estas características fornecem propriedades sensoriais específicas, de maneira particular a cada planta aromática, podendo determinar em algumas espécies a concentração de determinado princípio ativo, o que dificulta generalizar os resultados referentes à composição destes tipos de materiais (TRONCOSO et al., 2005).

Observa-se um interesse crescente da população e de pesquisadores da área da saúde em buscar estratégias alimentares preventivas e conhecimentos sobre os efeitos funcionais dos antioxidantes naturais, com destaque para as plantas aromáticas. As ervas e especiarias são uma das principais fontes de antioxidantes naturais na dieta humana, principalmente as especiarias da família Labiatae (POKORNY, 2007).

A família Labiatae compreende 150 gêneros com aproximadamente 3.500 espécies, nativas principalmente do Mediterrâneo, embora algumas tenham origem na Austrália, Sudoeste da Ásia e América do Sul (JUSTO et al., 2008). As principais espécies consumidas no Brasil desta família são o alecrim, o manjericão, o orégano, a sálvia e o tomilho.

- **Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)**

O nome *Rosmarinus* vem do latim e significa "orvalho que vem do mar", isso por causa das flores azuladas, pertencentes à planta, que inundam as praias do Mediterrâneo, lembrando o orvalho. Originário da Europa, o alecrim é adaptável a solos secos, pobres e bem drenados; em relação ao clima, adapta-se melhor ao subtropical (ALONSO, 1998).

Dentre as ervas da família Labiatae, o alecrim é o mais extensivamente estudado e seus extratos são os mais conhecidos como antioxidantes naturais. A

atividade antioxidante dos extratos de alecrim é atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos, voláteis e não voláteis, como os flavonóides, os ácidos fenólicos e os diterpenos fenólicos, tais como o ácido carnósico e o carnosol (hidrofóbicos) e o ácido rosmarínico e o rosmanol (hidrofílicos), sendo que mais de 90% desta atividade é atribuída aos compostos hidrofóbicos, principalmente ao ácido carnósico. Contudo, este ácido é bastante instável e sua degradação leva à formação de carnosol (metil éster do ácido carnósico), que se degrada, por sua vez, em rosmanol, epirosmanol e 7-metilrosmanol (JUSTO et al., 2008).

Os extratos de antioxidantes comerciais do alecrim estão disponíveis como um pó fino. Dependendo da quantidade de atividade dos antioxidantes, eles são recomendados para o uso nas concentrações entre 200 e 1.000 $mg.kg^{-1}$ do produto processado (SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

O alecrim tem demonstrado um ótimo potencial antioxidante em diversos estudos que visam a aplicação desta especiaria em diversos produtos que são susceptíveis à oxidação, tais como maioneses, salsichas e diferentes tipos de carnes (CARVALHO-JUNIOR et al., 2005; ESTÉVEZ; CAVA, 2006; LEE et al., 2005a).

Ramalho e Jorge (2006b) avaliaram a atividade antioxidante do extrato de alecrim em comparação com o α-tocoferol, utilizando óleo de soja purificado como substrato lipídico e, apesar do α-tocoferol ser mais eficiente, a concentração de 1.000 $mg.kg^{-1}$ de extrato de alecrim mostrou efeito positivo sobre a estabilidade oxidativa, medida por Racimat, e poderia ser indicado como antioxidante alternativo na conservação de óleos.

Genena et al. (2008) confirmaram a ação antioxidante, antibacteriana e antifúngica de extratos de alecrim obtidos com dióxido de carbono supercrítico, demonstrando ser um produto promissor no que diz respeito à sua incorporação em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos.

- **Manjericão (*Ocimum basilicum* L.)**

O manjericão pode ser considerado cultura anual ou perene, conforme o local de cultivo. De acordo com o aroma pode ser classificado em doce, limão, cinamato ou canela, cânfora, anis e cravo. Existem diversas finalidades para seu uso na culinária, como planta ornamental, medicinal e aromática, sendo o seu óleo essencial valorizado no mercado internacional pelo teor de linalol (BLANK et al.,

2004).

Tem sido amplamente estudado por seu uso histórico e presença de compostos fenólicos (MAKRI; KINTZIOS, 2008). É também uma fonte de aromas e óleos essenciais que contém compostos biologicamente ativos com propriedades antimicrobianas (GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; HUSSAIN et al., 2008; WANNISSORN et al., 2005).

Lee e Scagel (2009) caracterizaram o conteúdo de compostos fenólicos do manjericão e identificaram a presença de ácido chicórico e ácido caftárico, conhecidos por seus efeitos imunoestimulantes, assim como pelas propriedades antioxidantes.

Segundo Lee et al. (2005b), compostos presentes nos extratos de manjericão e tomilho, em particular eugenol, timol e carvacrol são capazes de inibir a oxidação, comparável aos antioxidantes conhecidos, BHT e α-tocoferol. Além disso, a ingestão desses compostos aromáticos pode ajudar a prevenir danos oxidativos *in vivo*, como a peroxidação lipídica, que é associada ao câncer, envelhecimento precoce, aterosclerose e diabetes.

Politeo, Jukic e Milos (2007) analisaram a composição química e a capacidade antioxidante de agliconas do manjericão comparadas ao seu óleo essencial. A comparação da composição química de agliconas voláteis com a composição química do óleo essencial revelou quatro compostos comuns: eugenol, chavicol, linalol e α-terpineol, com grande potencial antioxidante.

Berić et al. (2008) avaliaram o efeito protetor do manjericão contra danos oxidativos do DNA e mutagêneses. Em todos os testes, o efeito antimutagênico dos derivados de manjericão foi comparável com o modelo antioxidante da vitamina E, fator atribuído principalmente às suas propriedades antioxidantes.

Foi demonstrado que os extratos de manjericão retardam a oxidação de óleo de girassol. A efetividade dos extratos foi estimada com base no período de indução, determinado por curva cinética durante a oxidação do óleo de girassol a 100°C (MARINOVA; YANISHLIEVA, 1997).

Gülçin, Elmastas e Aboul-Enein (2007) determinaram a atividade antioxidante e a capacidade de seqüestrar radicais livres dos extratos etanólico e aquoso de manjericão por diferentes métodos *in vitro*, dentre eles o método do tiocianato férrico. Os extratos etanólico e aquoso, na concentração de 50 $mg.mL^{-1}$ apresentaram 94,8 e 97,5% de inibição da oxidação lipídica, respectivamente.

Juntachote e Berghofer (2005) ao estudarem os extratos etanólicos de duas espécies diferentes de manjericão, verificaram que o do tipo *Ocimum sanctum* L. apresentou maiores propriedades antioxidantes do que do tipo *Alpinia galanga*, presumivelmente devido às diferenças na estrutura dos componentes antioxidantes. Entretanto, ambos os extratos etanólicos podem ser usados como antioxidantes de alimentos naturais em uma possível substituição aos antioxidantes sintéticos, pois além de suas propriedades naturais, eles têm a vantagem de serem de fácil obtenção e baixo custo.

- **Orégano (*Origanum vulgare* L.)**

O gênero *origanum* é uma erva perene na forma de arbusto e nativa das regiões Euro-Siberiana e Irano-Siberiana, sendo atualmente reconhecidas 38 espécies deste gênero difundidas no mundo (ALIGIANNIS et al., 2001). Devido sua ampla variedade de características químicas e de aroma, diferentes espécies e tipos de *origanum* são amplamente utilizados como erva culinária, flavorizante de alimentos, em bebidas alcoólicas e em perfumaria na obtenção e fragrâncias picantes (ALIGIANNIS et al., 2001; NOVAK et al., 2000).

O orégano tem ganhado o interesse de muitos grupos de pesquisa como um potente antioxidante para sistemas lipídicos. A espécie se destaca pela sua ação antioxidante. As folhas secas bem como o óleo essencial do orégano têm sido usados medicinalmente por vários séculos em diferentes partes do mundo e, seu efeito positivo sobre a saúde humana tem sido atribuído tanto ao óleo essencial como frações solúveis de fenólicos (CERVATO et al., 2000).

Kikuzaki e Nakatani (1989) isolaram cinco diferentes compostos fenólicos do extrato metanólico de folhas de orégano e entre estes o ácido rosmarínico foi encontrado em concentrações mais elevadas. O ácido rosmarínico além de possuir propriedades antioxidantes como bloqueio de espécies reativas e inibidor da peroxidação lipídica (KOSAR; GÖGER; BASER, 2008), tem sido atribuída uma série de atividades biológicas, como antidepressivos (TAKEDA et al., 2002), hepatoprotetor (OSAKABE et al., 2002), anti-inflamatório (OSAKABE et al., 2004) e antitumorais (McKAY; BLUMBERG, 2006).

Segundo Cervato et al. (2000), extratos de orégano (aquoso e metanólico) provaram ser eficazes em quantidades mínimas (0,1 a 1 mg de folhas secas), quantidade menor do que normalmente utilizados na dieta. A pesquisa demonstrou

que extratos de orégano são eficazes na prevenção de todas as fases do processo oxidativo: primeiro através da neutralização dos radicais livres, depois pelo bloqueio de peroxidação catalisada pelo ferro (e presumivelmente por outros metais de transição) e, finalmente, pela interrupção do radical lipídico na cadeia de reações. De igual importância foi o seu efeito anti-glicosilação, essencial para a preservação e eficácia das proteínas do plasma. O fato de que existem vários mecanismos antioxidantes torna o orégano bloqueador particularmente eficaz de uma série de eventos pró-oxidante.

Chum et al. (2005) correlacionaram a alta efetividade antimicrobiana de extrato de orégano contra a úlcera associada ao *Helicobacter pylori* à sua alta atividade antioxidante, correspondente as grandes quantidades de compostos fenólicos.

Entre as alternativas de aditivos fitogênicos, o extrato de orégano se destaca, visto que possui dois dos principais fenóis com propriedades antimicrobianas: o carvacrol e o timol, que agem sobre a membrana celular bacteriana, impedindo sua divisão mitótica, causando desidratação nas células e impedindo a sobrevivência de bactérias patogênicas (FUKAYAMA et al., 2005).

- **Sálvia (*Salvia officinalis* L.)**

É originária do sul da Europa. A planta é um arbusto pequeno, lenhoso de 30 a 50 cm de altura, aromático; folhas alongadas e arredondadas nos caules, que são recobertos por películas finas e macias; flores azul-violáceas, formando cachos. Possui sabor amargo e odor forte, seu óleo essencial contém cineol, cânfora, borneol, tuiona e outros terpenos. Contém ainda ácido ursólico e taninos (MARTINS et al., 2002).

Existem cerca de 1.000 espécies de sálvia que têm sido utilizadas de muitas formas, dentre elas destacas-se a *Salvia officinalis* pela ação antioxidante. O principal composto responsável pela atividade antioxidante na sálvia é o ácido caféico, os outros componentes ativos, especialmente na variedade *S. officinalis*, são os diterpenos, o ácido carnósico e derivados carnosol (KOSAR; GÖGER; BASER, 2008).

Segundo Ulubelen (2003), uma série de diterpenos já foi obtida de espécies de sálvia e suas estruturas e atividades biológicas testadas, com destaque para atividades cardiovasculares e antibacterianas.

Há também pesquisas que têm demonstrado que o óleo essencial de sálvia pode melhorar a memória e tem se mostrado promissor no tratamento da doença de Alzheimer (PERRY et al., 1999; 2003).

Jung et al. (2009) avaliaram o extrato etanólico de sálvia e confirmaram, além de atividade antioxidante, eficácia terapêutica por ação anti-inflamatória confirmada tanto *in vitro* como *in vivo*, podendo proporcionar uma base farmacológica para o tratamento de doenças inflamatórias e tumores.

- **Tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**

Tomilho, planta originária da Europa, das regiões em torno do Mediterrâneo, tem haste lenhosa na base e herbácea na ponta, cujos ramos são eretos, aveludados e de cor branca, folhas verde-acinzentadas e pontilhadas na face superior e flores róseas ou brancas (MARTINS et al., 2002). Originalmente é muito empregado como erva medicinal, mas tem sido comumente utilizado como uma especiaria culinária para adicionar sabor (YANISHLIEVA, MARINOVA; POKORNY, 2006).

Assim como no orégano, os compostos fenólicos, timol e carvacrol, são os principais compostos dos extratos de tomilho. A extremidade hidrofóbica destes componentes interage com a membrana celular das bactérias, alterando sua permeabilidade para cátions como hidrogênio (H^+) e potássio (K^+). O descontrole no gradiente de íons leva as células bacterianas à morte (LAMBERT et al., 2001).

Além de propriedades antimicrobianas, o tomilho é também conhecido com anti-séptico e expectorante (BARANAUSKIENE et al. 2003) e atua na inibição da peroxidação lipídica (NGUYEN et al., 2000).

Segundo Teissedre e Waterhouse (2000), o óleo essencial de tomilho, abundante em timol, carvacrol, cuminol e eugenol, apresentou inibição moderada de oxidação da LDL (20-27%).

Os extratos de tomilho apresentam potente atividade antioxidante, seu efeito inibitório foi avaliado por Lee e Shibamoto (2002) em concentrações de 10 $mg.mL^{-1}$, a qual foi comparável a ação do BHT e α-tocoferol em concentrações variando de 10 a 500 $\mu g.mL^{-1}$.

1.5. Considerações finais

Considerando a preocupação atual com efeitos adversos que os antioxidantes sintéticos podem causar ao organismo, observa-se que os extratos de especiarias podem apresentar-se como uma fonte acessível de antioxidantes naturais. A adição de especiarias, de diferentes tipos e formas, pode evitar a deterioração oxidativa em vários sistemas, além de possível suplemento alimentício e farmacêutico.

Evidências demonstram que novos antioxidantes podem ser incorporados dentro do arsenal terapêutico, indicando que as pesquisas envolvendo agentes antioxidantes naturais devem continuar, pois as mesmas se mostram de suma importância para a saúde humana.

1.6. Referencias bibliográficas

ADEGOKE, G. O. et al. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **Journal of Food Science & Technology**, Mysore, v. 35, n. 4, p. 283-298, 1998.

ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two Origanum species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina**: bases clínicas y farmacológicas. Buenos Aires: Isis Ediciones SRL, 1998, 987 p.

AMAROWICZ, R. A. 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.

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

ARUOMA, O. I. Nutrition and healt aspects of free radicals and antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 32, n. 7, p. 671-683, 1994.

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.

BARANAUSKIENE, P. R. et al. Influence of nitrogen fertilizers on the yield and composition of thyme (*Thymus vulgaris*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 26, p. 7751-7758, 2003.

BAUER, A. K. et al. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. **Toxicology**, Limerick, v. 169, n. 1, p.1-15, 2001.

BERIĆ, T. et al. Protective effect of basil (*Ocimum basilicum* L.) against oxidative DNA damage and mutagenesis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 724-732, 2008.

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

BLANK, A. F. et al. Caracterização morfológica e agronômica de acessos de manjericão e alfavaca. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, n. 1, p. 113-116, 2004.

BRENNA, O. V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 10, p. 4841-4844, 2001.

BURCHAM, P. C. Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging proporties and role in the formation of endogenous DNA addutcts. **Mutagenesis**, Oxford, v. 13, n. 3, p. 287-305, 1998.

CARVALHO-JUNIOR, R. N. et al. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, New York, v. 35, n. 3, p. 197-204, 2005.

CERVATO, C. et al. Antioxidant properties of oregano [*Origanum vulgare*] leaf extracts. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 24, n. 6, p. 453-65, 2000.

CHOW, C. K. Antioxidant nutrients and environmental healh: introduction. **Toxicology**, Limerick, v. 180, n. 1, p. 1-3, 2002.

CHUN, S. S. et al. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*)

with antimicrobial activity against Helicobacter pylori. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005.

DECKER, E. A. Antioxidant mechanisms. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids**: chemistry, nutrition and biotechnology. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 517-542.

ESTÉVEZ, M.; CAVA, R. Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: contradictory effects in different types of frankfurters. **Meat Science**, Barking, v. 72, n. 2, p. 348-355, 2006.

FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 11, n. 1, p. 3-14, 1998.

FUKAYAMA, E. H. et al. Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 34, n. 6 (supl.), p. 2316-2326, 2005.

GENENA, A. K. et al. Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) – a study of the composition, antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained with supercritical carbon dioxide. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 463-469, 2008.

GORDON, M. H. The development of oxidative rancidity in foods. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. (Ed.). **Antioxidants in food:** practical applications. Cambridge: Woodhead Publishing, 2001. p. 7-21.

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.

GÜLÇIN, I.; ELMASTAS, M.; ABOUL-ENEIN, H. Y. Determination of antioxidant and radical scavenging activity of basil (*Ocimum basilicum* L. family *Lamiaceae*) assayed by different methodologies. **Phytotherapy Research**, London, v. 21, n. 4, p. 354-361, 2007.

GUTIERREZ, J., BARRY-RYAN, C., BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. Free radicals and antioxidants: the need for in vivo markers of oxidative stress. In: ARUOMA, O. I.; CUPPETT, S. L (Ed.) **Antioxidant methodology in vivo and in vitro concepts**. Illinois: AOCS Press; 1997. p. 1-22.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, New York, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine.** Oxford: Clarendon Press, 1990. 543 p.

HIGDON, J. V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 43, n. 1, p. 89-143, 2003.

HSU, P. C.; GUO, Y. L. Antioxidant nutrients and lead toxicity. **Toxicology**, Limerick, v. 180, n. 1, p. 33-44, 2002.

HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 3, p. 986-995, 2008.

JADHAV, S. J. et al. Lipid oxidation in biological and foods systems. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. (Ed.). **Food antioxidants:** technological, toxicological and health perspectives. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 5-62.

JORGE, N. Alterações químicas em óleos e gorduras de fritura. **Nutrição Brasil**, Rio de Janeiro, v. 3, n. 4, p. 247-253, 2004.

JUNG, H. J. et al. Anti-inflammatory, anti-angiogenic and anti-nociceptive activities of an ethanol extract of *Salvia plebeia* R. Brown. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 126, n. 2, p. 355-360, 2009.

JUNTACHOTE, T.; BERGHOFER, E. Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of Holy basil and Galangal. **Food Chemistry**, London, v. 92, n. 2, p. 193-202, 2005.

JUSTO, O. R. et al. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, 1699-1705, 2008.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 36, n. 8, p. 703-725, 2001.

KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Oreganum vulgare* L.*).* **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 53, n. 2, p. 519-524, 1989.

KIM, K. N. et al. Retinoic acid and ascorbic acid act synergistically in inhibiting human breast cancer cell proliferation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 17, n. 7, p. 454-462, 2006.

KIRK, J. R. Biological availability of nutrients in processed food. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 61, n. 4, p. 364-367, 1984.

KOSAR, M.; GÖGER, F.; BASER, K. H. C. *In vitro* antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 7, p. 2369-2374, 2008.

KYUNGMI, M.; EBELER, S. E. Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 96-104, 2008.

LAGUERRE, M.; LECOMTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. **Progress in Lipid Research**, Oxford, v. 46, n. 5, p. 244-282, 2007.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LEE, E. J.; AHN, D. U. Production of volatiles from fatty acids and oils by irradiation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 1, p. 70-75, 2003.

LEE, J. W. et al. Combined effects of gamma irradiation and rosemary extract on the shelf-life of a ready-to-eat hamburger steak. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 72, n. 1, p. 49-56, 2005a.

LEE, J.; SCAGEL, C. F. Chicoric acid found in basil (*Ocimum basilicum* L.) leaves. **Food Chemistry**, London, v. 115, n. 2, p. 650-656, 2009.

LEE, K. G.; SHIBAMOTO, T. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 17, p. 4947-4952, 2002.

LEE, S. J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005b.

LIU, F. Antioxidant activity of garlic acid from rose flowers in senescence accelerated mice. **Life Sciences**, Elmsford, v. 77, n. 3, p. 230-240, 2005.

MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 6, n. 8, p. 271-277, 1995.

MAKRI, O., KINTZIOS, S. *Ocimum sp*. (basil): botany, cultivation, pharmaceutical properties, and biotechnology. **Journal of Herbs Spices and Medicinal Plants**, Birmingham, v. 13, n. 3, p. 123-150, 2008.

MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. Antioxidative activity of extracts from selected species of the family *Lamiaceae* in sunflower oil. **Food Chemistry**, London, v. 58, n. 3, p. 245-248, 1997.

MARTÍNEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion,** Caracas, v. 50, n. 1, p. 5-18, 2000.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. 4 ed. Viçosa: Editora UFV, 2002. 220 p.

McCUNE, L. M.; JOHNS, T. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the indigenous peoples of the North American boreal forest. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 82, n. 2-3, p. 197-205, 2002.

McKAY, D. L.; BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.), **Phytotherapy Research**, London, v. 20, n. 8, p. 619-633, 2006.

MELLOR, S. Alternatives to antibiotic. **Pig Progress**, Doetinchen, v. 16, n. 1, p.18-21, 2000.

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

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n. 4, p. 411-424, 2004.

NGUYEN, D. V. et al. Antioxidative effect of thyme in rapeseed oil. **Biologia,** Bratislava, v. 55, n. 3, p. 277-281, 2000.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry.** 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 225-319.

NOVAK, J. et al. Ratios of cis- and trans- sabinene hydrate in *Origanum marjorana* L. and *Origanum midrophyllum* (Bentham) vogel. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 28, n. 7, p. 697-704, 2000.

OLSZEWER, E.; FLAM, S.; ELLOVICH, S. **Radicais livres em cardiologia** – isquemia e reperfusão. São Paulo: Tecnopress, 1997. 156 p.

OSAKABE, N. et al. Rosmarinic acid inhibits epidermal inflammatory responses: anticarcinogenic effect of *Perilla frutescens* extract in the murine two-stage skin model, **Carcinogenesis**, Oxford, n. 4, v. 25, p. 549-557, 2004.

OSAKABE, N. et al. Rosmarinic acid, a major polyphenolic component of *Perilla frutescens*, reduces lipopolysaccharide (LPS)-induced liver injury in d-galactosamine (d-GalN)-sensitized mice. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 33, n. 6, p. 798-806, 2002.

PERRY, E. K. et al. Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 51, n. 5, p. 527-534, 1999.

PERRY, N. S. L. et al. Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, Fayetteville, v. 75, n. 3, p. 651-659, 2003.

PHILIPPI, S. T. et al. Pirâmide alimentar adaptada: guia para escolha dos alimentos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 1, p. 65-80, 1999.

PIETTA, P.; SIMONETTI, P. MAURI, P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 11, p. 4487-4490, 1998.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants capacity of brassica vegetables: a review. **Food Science and Technology**, San Diego, v. 40, n. 1. p. 1-11, 2007.

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

POLITEO, O.; JUKIC, M.; MILOS, M. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. **Food Chemistry**, London, v. 101, n. 1, p. 379-385, 2007.

POLYAKOV, N. E. et al. Carotenoids as scavengers of free radicals in a fenton reaction: antioxidants or pro-oxidants? **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 31, n. 3, p. 398-404, 2001.

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.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.

RIBEIRO, S. M. R. et al. Efeitos pró e antioxidantes dose-dependente de compostos bioativos. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. (Org.) **Alimentos funcionais: benéficos para a saúde**. Viçosa: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. Ed., 2008, p. 235-260.

SAGDIÇ, O. Sensitivity of four pathogenic bacteria to Turkish thyme and oregano hydrosols. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, London, v. 36, n. 5, p. 467-473, 2003.

SALEM JR, N. Introduction to polyunsaturated fatty acids. **Back-grounder**, New Jersey, v. 3, n.1, p. 1-8, 1999.

SANCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, London, v. 8, n. 3, p. 121-137, 2002.

SANOCKA, D.; KURPISZ, M. Reactive oxygen species and sperm cells. **Reproductive Biology and Endocrinology**, London, v. 2, n. 1, p. 12-18, 2004.

SHAHIDI, 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.

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.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição,** Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

TAKEDA, H. et al. Rosmarinic acid and caffeic acid produce antidepressive-like effect in the forced swimming test in mice. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 449, n. 3, p. 261-267, 2002.

TEISSEDRE, P. L.; WATERHOUSE, A. L. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 9, p. 3801-3805, 2000.

TRONCOSO, N. et al. Fast high performance liquid chromatography and ultraviolet–visible quantification of principal phenolic antioxidants in fresh rosemary. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1100, n. 1, p. 20-25, 2005.

TSAI, T. H.; TSAI, P. J.; SU, S. C. Antioxidant and anti-flammatory activities of several commonly used spices. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 93-97, 2005.

ULUBELEN, A. Cardioactive and antibacterial terpenoids from some salvia species. **Phytochemistry**, New York, v. 64, n. 2, p. 395-399, 2003.

VALENTÃO, P. et al. Antioxidative properties of cardoon (*Cynara cardunculus* L.) infusion against superoxide radical, hydroxyl radical, and hypochlorous acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 17, p. 4989-4993, 2002.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VELIOGLU, Y. S. et al. Antioxidant activity and total pheolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

WANNISSORN, B. et al. Antibacterial properties of essential oils from Thailandia medicinal plants. **Fitoterapia**, Milano, v. 76, n. 3, p. 233-236, 2005.

WARNER, K. Chemistry of frying oils. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids:** chemistry, nutrition and biotechnology. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2002. p. 205-221.

YANISHLIEVA, N. V.; MARINOVA, E. M. Stabilisation of edible oils with natural antioxidants. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 103, n. 11, p. 752-767, 2001.

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

YEN, G.; CHEN, H. Antioxidant activity of variuos tea extracts in relation to their antimutagenicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 43, n. 1, p. 27-32, 1995.

YILDRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001.

CAPÍTULO 2 – Ensaio I

Potencial antioxidante de especiarias: aplicação de oleoresinas de orégano (*Oreganum vulgare* L.), manjericão (*Ocimum basilicum* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) em óleo vegetal

Resumo

Por razões econômicas e de proteção à saúde pesquisas têm sido dirigidas para ampliar a estabilidade dos óleos vegetais. Existe uma tendência para a adição de antioxidantes naturais, em particular, um crescente interesse em ervas e especiarias. Desta forma, os objetivos deste trabalho foram avaliar o potencial antioxidante das oleoresinas de orégano, manjericão e tomilho e seu comportamento ao serem aplicadas ao óleo de soja em diferentes concentrações. Numa primeira etapa foi determinada a atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico e a quantificação de compostos fenólicos totais. Posteriormente, foram adicionadas ao óleo de soja diferentes concentrações das oleoresinas (500 a 3.000 $mg.kg^{-1}$) e analisado seu potencial antioxidante por meio da estabilidade oxidativa utilizando o Rancimat. A concentração de 3.000 $mg.kg^{-1}$ das oleoresinas de orégano e tomilho foi a que conferiu melhor estabilidade oxidativa ao óleo de soja, o que as tornam alternativa natural na conservação de óleos vegetais.

Palavras-chave: antioxidantes naturais, estabilidade oxidativa, *oreganum vulgare* L., *ocimum basilicum* L., *thymus vulgaris* L..

2.1. Introdução

No processamento de alimentos, várias operações favorecem as reações de oxidação, entre elas a possibilidade dos radicais livres formados reagirem ou interagirem com outros constituintes dos alimentos, o que provoca queda da qualidade nutricional dos mesmos. A oxidação é um fenômeno espontâneo e inevitável e tem implicação direta no valor comercial dos compostos graxos e produtos formulados a partir deles (NAWAR, 1996; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

A adição de compostos antioxidantes é, sem dúvida, uma prática corrente para retardar alterações indesejáveis em óleos, evitando ou pelo menos retardando a rancificação. No Brasil, o uso de antioxidantes sintéticos é controlado pelo Ministério da Saúde que limita as concentrações máximas para butil-hidroxianisol (BHA) e terc-butilhidroquinona (TBHQ) em 200 $mg.kg^{-1}$ e para butil-hidroxitolueno (BHT) e galato de propila (GP) em 100 $mg.kg^{-1}$, sendo obrigatória a declaração do uso no rótulo (BRASIL, 2001).

Na atualidade, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de substituir parcialmente esses antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais, haja vista a associação dos antioxidantes sintéticos com processos carcinogênicos em animais experimentais (GUNDUC; EL, 2003; SVILAAS et al., 2004).

Estudos revelaram que os antioxidantes BHA e BHT poderiam apresentar certa toxicidade e eficácia mais baixa que alguns antioxidantes naturais (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1998). Por estes motivos, têm sido dadas ênfases à pesquisa de possíveis antioxidantes presentes em produtos naturais, com destaque para as ervas e especiarias, mundialmente utilizadas para fins culinários. Suas propriedades antioxidantes são indicadas como efetivas para retardar o processo de peroxidação lipídica em óleos e alimentos lipídicos e isso tem despertado o interesse de muitos grupos de pesquisa (MILOS; MASTELIC; JERKOVIC, 2000).

Inúmeros trabalhos com diferentes fontes destacam a inibição da oxidação de óleos vegetais ou gordura animal, dentre elas o orégano (KIKUZAKI; NAKATANI, 1989; VEKIAKI et al., 1993), alecrim (RAMALHO, JORGE, 2006), gengibre (ANDREO; JORGE, 2007), coentro (ANGELO; JORGE, 2008, MELO et al., 2003), manjericão e tomilho (LEE et al., 2005), entre outros, sendo atribuído o poder antioxidante aos compostos fenólicos, tocoferóis, carotenóides e vitamina C.

Murcia, Jiménez e Martínez-Tomé (2001) observaram que os extratos das

especiarias cominho, orégano, páprica, alecrim e açafrão, a uma concentração de 5%, apresentaram atividade de proteção contra a oxidação de óleos comestíveis semelhante aos antioxidantes sintéticos BHT, BHA e galato de propila a 100 $\mu g.g^{-1}$.

Assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar o potencial antioxidante dos extratos de especiarias (orégano, manjericão e tomilho) e sua estabilidade oxidativa quando aplicadas ao óleo de soja em diferentes concentrações.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Material

Foram utilizados extratos das especiarias orégano (*Oreganum vulgare* L.), manjericão (*Ocimum basilicum* L.*)* e tomilho (*Thymus vulgaris* L.), na forma de oleoresinas; fornecidas pela Kalsec®, cujos constituintes encontram-se na Tabela 1 e óleo de soja refinado, isento de antioxidantes sintéticos e ácido cítrico, fornecido pela empresa Granol Ind. Com. e Exp S/A, Bebedouro-SP.

Tabela 1 – Constituintes das oleoresinas estudadas.

Componentes	**Oleoresinas (%)**		
	Orégano	**Manjericão**	**Tomilho**
Extrato natural	60 - 70	56 - 66	55 – 65
Óleo de canola	30 - 40	34 - 44	35 – 45
Mono e diglicerídeos	-	-	0 – 10

Fonte: Kalsec®

2.2.2. Caracterização das oleoresinas

As amostras de oleoresinas foram analisadas quanto à atividade antioxidante (AA) e quantificação de compostos fenólicos totais, em duplicata. Para estas análises, a porção lipídica das oleoresinas foi separada aplicando procedimento descrito por Parry et al. (2005).

A avaliação da AA foi realizada por meio de medida espectrofométrica baseada na oxidação do β-caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa de um ácido graxo (ácido linoléico), segundo procedimento descrito por Marco (1968) e modificado por Miller (1971). Nesta análise, as oleoresinas foram padronizadas em 0,5 $mg.mL^{-1}$ de metanol. O BHT (100 $mg.mL^{-1}$) foi utilizado como padrão e a leitura foi realizada a 470 nm. As amostras foram analisadas por duas

horas, realizando-se leituras a cada 20 minutos, para avaliar não só a atividade antioxidante total ao término da reação como também seu comportamento ao longo do tempo de reação. A partir dos dados obtidos pôde-se traçar a curva cinética de degradação do β-caroteno e, assim, avaliar a eficácia do antioxidante adicionado em diferentes intervalos de tempo.

Os compostos fenólicos totais foram quantificados por espectrofotometria, utilizando reagente Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). Para quantificação foi utilizado ácido gálico como padrão, em concentrações de 0 a 500 $mg.mL^{-1}$. A equação da curva de calibração obtida foi y = 0,0016x + 0,00057 com coeficiente de correlação de 0,9995. Os teores de compostos fenólicos totais foram expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de oleoresina.

2.2.3. Aplicação das oleoresinas

No óleo de soja foram adicionadas as oleoresinas nas concentrações de 500, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500 e 3.000 $mg.kg^{-1}$ e foi utilizado como controle o óleo de soja isento de antioxidantes. O ensaio foi conduzido em três repetições.

O potencial antioxidante das oleoresinas aplicadas no óleo de soja foi avaliado através da determinação da estabilidade oxidativa utilizando o Rancimat, modelo 743 Metrohm, método proposto pela AOCS Cd 12b-92 (1993). A determinação foi realizada a 100ºC, com fluxo de ar de 20 $L.h^{-1}$, com utilização de 3 g de amostra e volume de água destilada de 60 mL nos frascos contendo os eletrodos.

2.2.4. Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância, no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 7, e a determinação das concentrações mais eficazes foram definidas por regressão polinomial (BANZATTO; KRONKA, 2006). Análises de variância, regressões polinomiais e testes de Tukey para as médias a 5% foram obtidas através do programa ESTAT - Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0, 1999, Brasil.

2.3. Resultados e discussão

Na primeira etapa do trabalho, com vistas à caracterização das oleoresinas de orégano, manjericão e tomilho, foi determinada a atividade antioxidante pelo

sistema β-caroteno/ácido linoléico, cujos resultados encontram-se dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade antioxidante (AA), em porcentagem, das oleoresinas pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico.

Tratamentos	**AA**
Orégano	54,78 [b]
Manjericão	41,32 [c]
Tomilho	52,32 [bc]
BHT (padrão)*	89,33 [a]

* Concentração de BHT, 100 $mg.kg^{-1}$, utilizada para efeito de comparação.
a, b...: médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05).

Pode-se observar na Tabela 2, que a oleoresina de orégano apresentou atividade similar a do tomilho, sendo esta similar a de manjericão. O antioxidante sintético BHT, padrão comercial, apresentou uma atividade superior em relação às oleoresinas no combate aos peróxidos formados.

Vários autores têm encontrado em diferentes variedades de especiarias altos níveis de atividade antioxidante (CALUCCI et al., 2003; EXARCHOU et al., 2002; MARTÍNEZ-TOMÉ et al., 2001), em especial para o óleo essencial (DORMAN, SURAI, DEANS, 2000 ; RUBERTO et al., 2002). Em alguns trabalhos, o extrato de orégano tem se mostrado mais eficaz do que aqueles exibidos pelo galato de propila, BHT e BHA (MARTÍNEZ-TOMÉ et al. 2001).

As curvas cinéticas das oleoresinas de orégano, manjericão e tomilho estão apresentadas na Figura 1.

A presença de antioxidantes no sistema protege o ácido linoléico, prolongando o período de formação dos radicais livres (HUANG; WANG, 2004). Quanto menor a queda na densidade óptica da amostra, mais potente é o antioxidante em impedir a degradação do β-caroteno.

Pode-se observar, de forma geral, que nas curvas das oleoresinas a degradação ocorre de forma similar, sendo que no início da reação (20 minutos) a oleoresina de orégano tem uma queda mais acentuada, mas no final da reação (120 minutos) protege melhor o sistema, seguida pela oleoresina de tomilho. Observa-se uma queda mais acentuada na oleoresina de manjericão após os 100 minutos de

reação, diferenciando-a das demais oleoresinas.

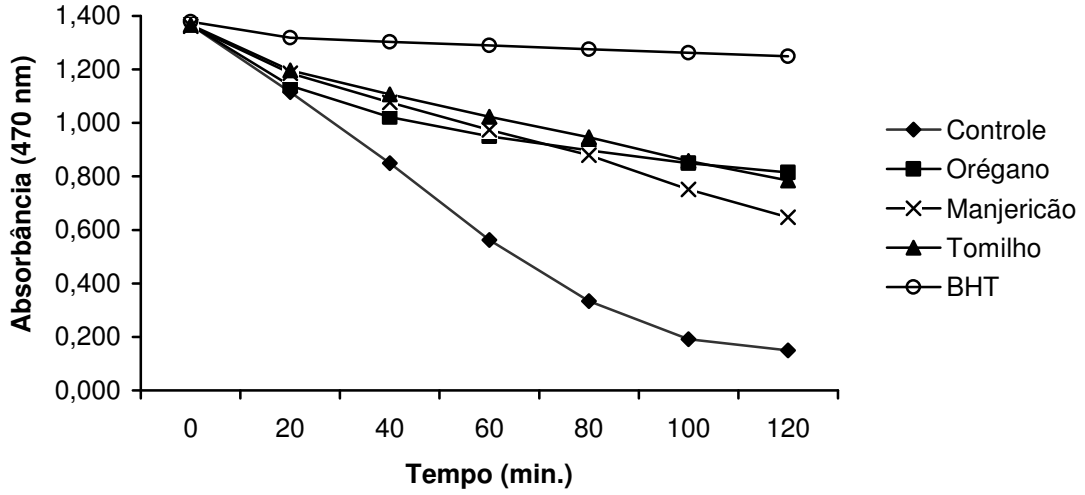


Figura 1 – Curvas cinéticas do potencial antioxidante das oleoresinas no sistema β-caroteno/ácido linoléico.

Na Tabela 3 encontram-se os teores de fenólicos totais das oleoresinas de orégano, manjericão e tomilho. Pode-se verificar que houve grande variação no teor de compostos fenólicos totais nas oleoresinas. As oleoresinas de tomilho e orégano são as melhores fontes de compostos fenólicos.

Tabela 3 – Teor de fenólicos totais, expresso em mg de equivalente de ácido gálico por 100 gramas de oleoresina.

Tratamentos	**Teor de fenólicos totais (mg.100g^{-1})**
Orégano	25,93^{b}
Manjericão	6,18^{c}
Tomilho	64,77^{a}

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

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

O total de compostos fenólicos em extratos etanólicos e aquosos de tomilho também foram avaliados por Mata et al. (2007) utilizando o método Folin-Ciocalteu.

Os valores encontrados para os extratos etanólico e aquoso foram de 113 e 74,9 mg de ácido gálico por grama de amostra, respectivamente.

A extração de compostos fenólicos de produtos naturais é fortemente influenciada pelo solvente utilizado. Tem-se observado que quanto maior a polaridade do solvente de extração, maior a quantidade de compostos fenólicos extraídos (GAMÉZ-MEZA et al., 1999). Neste estudo não são conhecidos os solventes utilizados na obtenção da oleoresina.

Esses resultados apontam as oleoresinas de tomilho e orégano como especiarias de elevada capacidade antioxidante, pois inúmeros autores têm encontrado correlação positiva entre a quantidade de fenólicos totais e a capacidade antioxidante de alimentos (FALLARERO et al., 2003; KUSKOSKI et al., 2005).

Entretanto, é sabido que além dos compostos fenólicos, os vegetais contêm outros inibidores de oxidação, como ácido ascórbico, ácidos hidroxicarboxílicos e carotenóides, que também podem ser extraídos de acordo com a polaridade do solvente aplicado (POKORNY, 2007) e, desta forma, empregados em óleos vegetais.

Como segunda etapa, este trabalho foi voltado para indicar entre as três especiarias estudadas as mais efetivas quando aplicadas em óleo de soja, assim como a melhor concentração e possível ação pró-oxidante.

As concentrações aplicadas das oleoresinas, de 500 a 3.000 $mg.kg^{-1}$, foram definidas em testes preliminares, sendo o limite máximo estipulado de 3.000 $mg.kg^{-1}$, devido às alterações sensoriais. É válido ressaltar que as oleoresinas estudadas apresentavam em sua composição de 30 a 45% de óleo de canola (Tabela 1), o que implica diretamente no aumento da concentração a ser aplicada.

O Anexo A apresenta a análise de variância para a determinação da estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado das diferentes concentrações das oleoresinas estudadas. Como observado, o teste foi significativo ($P < 0,01$) para os efeitos principais e a interação.

A Tabela 4 apresenta os resultados das médias da estabilidade oxidativa para os tratamentos estudados.

De acordo com a Tabela 4, observa-se que dentre as oleoresinas estudadas, a que apresentou maior estabilidade oxidativa, foi a oleoresina de orégano, seguida pela de tomilho e manjericão, sendo as médias gerais de $13,65^{a}$, $12,25^{b}$ e $10,96^{c}$, respectivamente, diferença evidenciada estatisticamente, conforme teste de Tukey

($P < 0,05$).

Tabela 4 – Médias da estabilidade oxidativa (horas), para as diferentes concentrações das oleoresinas adicionadas em óleo de soja.

Tratamentos	Concentrações (mg.kg^{-1})						
	0	500	1.000	1.500	2.000	2.500	3.000
OS + OO	10,44 ^{eA}	12,08 ^{dA}	12,82 ^{dA}	13,89 ^{cA}	14,95 ^{bA}	15,20 ^{abA}	16,16 ^{aA}
OS + OM	10,44 ^{bA}	11,32 ^{abB}	11,21 ^{abB}	10,50 ^{bC}	11,14 ^{abC}	10,52 ^{bC}	11,56 ^{aC}
OS + OT	10,44 ^{eA}	11,38 ^{deAB}	11,63 ^{cdB}	12,46 ^{bcB}	12,80 ^{bB}	13,01 ^{bB}	14,01 ^{aB}

OS: óleo de soja; OO: oleoresina de orégano; OM: oleoresina de manjericão; OT: oleoresina de tomilho.
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 ($P > 0,05$).

Ao avaliar as concentrações estudadas, verifica-se que as oleoresinas apresentaram efeito protetor contra a oxidação lipídica quando comparadas com o controle, sendo que, nas oleoresinas de orégano e tomilho a estabilidade oxidativa foi diretamente proporcional ao aumento da concentração. Ao se calcular a porcentagem de aumento do período de indução em relação ao controle (óleo de soja isento de antioxidantes), na concentração final de 3.000 mg.kg^{-1}, o orégano apresentou porcentagem de inibição da oxidação de 55%, seguido pelo tomilho com 34% e o manjericão com apenas 11%.

Moreira e Mancini-Filho (2003), avaliando os extratos das especiarias mostarda, canela e erva-doce, quantificaram uma proteção de 20% para o extrato aquoso da semente de mostarda, que apresentou a maior proteção da oxidação no óleo de soja sem antioxidante entre as amostras testadas.

O aumento do período de indução por meio da adição de um antioxidante tem sido relacionado à eficiência do antioxidante, e pode ser expresso como fator de proteção ou índice antioxidante, isto é, a razão entre o período de indução de um óleo na presença do antioxidante e o período de indução do mesmo óleo na ausência do antioxidante (HOLASOVA et al., 2006; MEZOUARI; EICHNER, 2007). Quanto maior o valor do fator de proteção, melhor a atividade antioxidante (ELIZABLE; BRESSA; ROSA, 1992).

Na Tabela 5 estão apresentados os fatores de proteção para todas as concentrações das oleoresinas estudadas.

Tabela 5 – Fatores de proteção para as oleoresinas aplicadas no óleo de soja.

Tratamentos	Concentrações (mg.kg^{-1})					
	500	1.000	1.500	2.000	2.500	3.000
OS + OO	1,16	1,23	1,33	1,43	1,46	1,55
OS + OM	1,08	1,07	1,01	1,07	1,01	1,11
OS + OT	1,09	1,11	1,11	1,19	1,25	1,34

OS: óleo de soja; OO: oleoresina de orégano; OM: oleoresina de manjericão; OT: oleoresina de tomilho.

Todas as oleoresinas apresentaram um fator de proteção maior que 1, fator de proteção do controle, com destaque para a oleoresina de orégano que foi mais eficiente em retardar a oxidação em todas as concentrações aplicadas.

Para definir a melhor concentração para as duas oleoresinas mais efetivas, orégano e tomilho, foram aplicadas análises de variância por regressão polinomial, com os dados da estabilidade oxidativa, Anexos B e C, respectivamente. Como observado, o teste foi significativo ($P < 0,01$) para o efeito "Concentrações", tanto para a oleoresina de orégano como a de tomilho e os graus de liberdade foram desdobrados para estudar a regressão polinomial.

Por meio da regressão polinomial (Figura 2), observa-se que os valores da estabilidade oxidativa aumentaram com o aumento das concentrações, para ambas oleoresinas, não demonstrando, em nenhum momento, efeito pró-oxidante. Para a oleoresina de orégano obteve-se a seguinte equação de 1º grau: $Y = 0,0018X + 10,913$, e para a oleoresina de tomilho: $Y = 0,011X + 10,625$, onde Y é a Estabilidade oxidativa (horas) e X são as Concentrações (mg.kg^{-1}).

Para a oleoresina de orégano, Anexo B, pode-se observar que as regressões, linear e quadrática, foram significativas ($P < 0,01$), porém o coeficiente de determinação da regressão linear ($R^2 = 0,9739$) foi maior que 0,9, podendo, portanto, ser utilizada para explicar o comportamento desta oleoresina (Figura 2).

Para a oleoresina de tomilho, Anexo C, observa-se que apenas a regressão linear foi significativa ($P < 0,01$), apresentando também coeficiente ($R^2 = 0,9708$) maior que 0,9 (Figura 2). Verifica-se que é possível estabelecer uma relação entre a estabilidade oxidativa e as concentrações das oleoresinas no óleo de soja. Observa-se que as retas indicam uma ação antioxidante crescente com as concentrações, ou seja, à medida que se aumenta a concentração da oleoresina no óleo, a tendência é o aumento da estabilidade oxidativa.

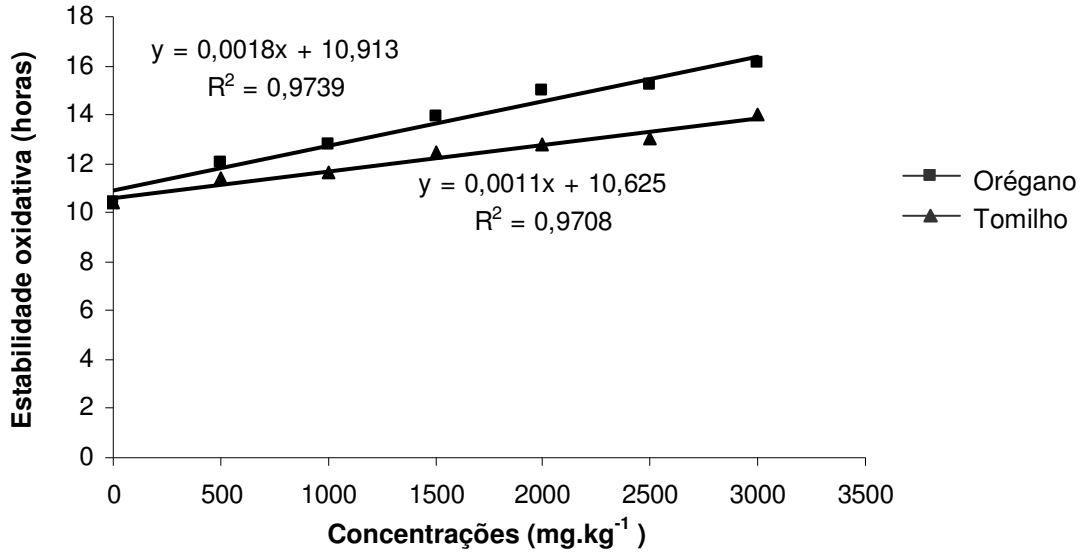


Figura 2 – Estabilidade oxidativa do óleo de soja em diferentes concentrações das oleoresinas de orégano e tomilho.

Em geral, as mesmas características são encontradas na literatura para a ação antioxidante dos 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).

Com base na estabilidade oxidativa e no fator de proteção encontrados, as oleoresinas mais efetivas foram a de orégano seguida pela de tomilho. Por meio da regressão polinomial, a concentração mais efetiva para retardar a oxidação lipídica foi de 3.000 $mg.kg^{-1}$, para ambas oleoresinas.

2.4. Conclusões

As oleoresinas estudadas apresentaram potencial antioxidante, sendo que o teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoléico apresentaram-se maiores nas oleoresinas de tomilho e orégano, as quais proporcionaram maior estabilidade oxidativa quando aplicadas ao óleo de soja. Recomenda-se a aplicação das oleoresinas de orégano e tomilho, na concentração de 3.000 $mg.kg^{-1}$ em substituição ao antioxidante sintético.

2.5. Referências bibliográficas

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. Antioxidant evaluation of coriander extract and ascorbyl palmitate in sunflower oil under thermoxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 85, n. 11, p. 1045-1049, 2008.

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

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.

CALUCCI, L. et al. Effects of γ-irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 4, p. 927-934, 2003.

DORMAN, H. J. D.; SURAI, P.; DEANS, S. G. *In vitro* antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. **The Journal of Essential Oil Research**, Illinois, v. 12, n. 2, p. 241-248, 2000.

ELIZABLE, B. E.; BRESSA, F.; ROSA, M. D. Antioxidative action of maillard reactions volatiles: influence of maillard solution level. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 69, n. 3, p. 331-334, 1992.

EXARCHOU, V. et al. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from

greek oregano, greek sage, and summer savory. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 19, p 5294-5299, 2002.

FALLARERO, A. et al. Effects of aqueous extracts of *Halimeda incrassata* (Ellis) Lamouroux and *Bryothamnion trquetrum* (S.G. Gmelim) howe on hydrogen peroxide and methyl mercury-induced oxidative stress in GT1-7 mouse hypothalamic immortalized cells. **Phytomedicine**, Jena, v. 10, n. 1, p. 39-47, 2003.

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

GUNDUC, N. ; EL, S. N. Assessing antioxidant activities of phenolic compounds of common Turkisch food and drinks on *in* vitro low-density lipoprotein oxidation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 8, p. 2591-2595, 2003.

HOLASOVA, M. et al. Buckwheat – the source of antioxidant activity in functional foods. **Food Research International**, Barking, v. 35, n. 2, p. 207-211, 2006.

HUANG, L. H.; WANG, B. G. Antioxidant capacity and lipophilic content of seaweeds collected from the qingdao coastline. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 16, p. 4993-4997, 2004.

KATALINIC, V. et al. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. **Food Chemistry**, London, v. 94, n. 4, p. 550-557, 2006.

KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Oreganum vulgare L).* **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 53, n. 6, p. 519-524, 1989.

KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.

LEE, S. J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 1, p. 131-137, 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.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 45, n. 6, p. 594-598, 1968.

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

MATA, A.T. et al. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, London, v. 103, n. 3, p. 778-786, 2007.

MELO, E. A. et al. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 1, p. 195-199, 2003.

MEZOUARI, S.; EICHNER, K. Evaluation of the stability of blends of sunflower and rice bran oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 109, n. 5, p. 531-535, 2007.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 48, n. 2, p. 91, 1971.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant e.ect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. hirtum). **Food Chemistry**, London, v. 71, n. 1, p. 79-83, 2000.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce, em sistemas aquoso e lipídico. **Nutrire**, São Paulo, v. 25, n.1, p. 31-46, 2003.

MURCIA, M. A.; JIMÉNEZ, A. M.; MANTÍNEZ-TOMÉ, M. Evaluation of the antioxidant properties of Mediterranean and tropical fruits compared with common food additives. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 64, n.12, p. 2037-2046, 2001.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 3. ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p. 225-319.

PARRY, J. et al. Fatty acid composition and antioxidant properties of cold-pressed marionberry, boysenberry, red raspberry, and blueberry seed oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 3, p. 566-573, 2005.

POKORNY, J. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 108, n. 6, p. 629-642, 2007.

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, 2006.

RUBERTO, G. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 17, n. 4, p. 251-254, 2002.

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.

SINGLETON, V. L.; ROSSI JR, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 2, p. 144-158, 1965.

SVILAAS, A. et al. Intakes of antioxidants in coffee, and vegetables are correlated with plasma carotenoid in humans. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 134, n. 3, p. 562-567, 2004.

VEKIAKI, S. A. et al. Oregano flavonoids as lipid antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 70, n. 5, p. 483-487,1993.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry**, London, v. 63, n. 3, p. 335-342, 1998.

2.6. Anexos

Anexo A – Análise de variância para a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado das oleoresinas.

Causas de Variação	G.L.	Quadrado Médio
Tratamentos	2	38,1582**
Concentrações	6	11,3009**
Tratamentos x Concentrações	12	2,7517**
Resíduo	42	0,1453
Desvio Padrão		0,3812
Coef. de Variação (%)		3,10

** Significativo (P < 0,01).

Anexo B – Análise de variância para a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado da oleoresina de orégano.

Causas de Variação	G.L.	Q.M.	F	R^2
Regressão linear	1	69,8519	371,5715**	0,9739
Regressão quadrática	1	1,2208	6,4942**	0,9909
Regressão cúbica	1	0,1104	0,5875NS	0,9924
Desvios de regressão	3	0,1805	0,9604NS	-
(Concentrações)	(6)	11,9541	63,5891**	-
Resíduo	14	0,1880	-	-
Total	20	-	-	-

Desvio Padrão = 0,4336, Coeficiente de Variação (%) = 3,18
** Significativo (P < 0,01).
NS Não Significativo (P > 0,05).

Anexo C – Análise de variância para a estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado da oleoresina de tomilho.

Causas de Variação	**G.L.**	**Q.M.**	**F**	**R^2**
Regressão linear	1	24,6025	190,8581**	0,9708
Regressão quadrática	1	0,0260	$0,2017^{NS}$	0,9718
Regressão cúbica	1	0,2913	$2,2601^{NS}$	0,9833
Desvios de regressão	3	0,1413	$1,0962^{NS}$	-
(Concentrações)	(6)	11,2240	32,7681**	-
Resíduo	14	0,1289	-	-
Total	20	-	-	-

Desvio Padrão = 0,3590, Coeficiente de Variação (%) = 2,93
** Significativo (P < 0,01).
^{NS} Não Significativo (P > 0,05).

CAPÍTULO 3 – Ensaio II

Extratos de especiarias de orégano (*Oreganum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) em óleo vegetal: efeito antioxidante em condições de termoxidação

Resumo

A avaliação de óleos vegetais quanto à sua resistência ao estresse térmico é fundamental, visto que na população em geral, é comum o consumo de óleos submetidos a altas temperaturas. A oxidação de óleos na ausência de alimento, também é utilizada para estudar a eficiência dos antioxidantes. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito isolado e combinado dos extratos de orégano e tomilho, aplicados em óleo de soja, sob termoxidação. Foram submetidos à termoxidação (180ºC/30 horas), o óleo de soja adicionado de 3.000 $mg.kg^{-1}$ das oleoresinas de orégano, tomilho e da mistura das mesmas, além de óleo de soja adicionado de TBHQ (50 $mg.kg^{-1}$) e óleo de soja sem adição de antioxidantes utilizado como controle. As amostras termoxidadas foram analisadas quanto à estabilidade oxidativa, índice de peróxidos e dienos conjugados. As oleoresinas de orégano e tomilho aplicadas de forma isolada apresentaram um poder antioxidante maior que o antioxidante TBHQ. Entretanto, o aumento da concentração das oleoresinas provocado pela mistura das mesmas e possível sinergismo, promoveu uma maior estabilidade térmica ao óleo de soja.

Palavras-chave: antioxidantes naturais, *oreganum vulgare* L., *thymus vulgaris* L., termoxidação.

3.1. Introdução

Na última década, a produção mundial de óleos e gorduras vegetais aumentou em mais de 50%. Segundo estimativas da FAO – Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação, a produção mundial de óleos e gorduras (safra 2008/09) pode chegar a 163 milhões de toneladas, sendo a metade destinada à alimentação humana (FAO, 2010).

O óleo de soja é o segundo mais utilizado depois do de palma, o consumo mundial foi previsto em 38,0 milhões de toneladas (safra 2007/08), 6,6% maior, enquanto a oferta deve totalizar 41,0 milhões de toneladas, 4% a mais que a da safra anterior (BARBOSA; NOGUEIRA JR; FREITAS, 2008).

No Brasil, o óleo de soja é o principal óleo produzido, estando previsto 6,10 milhões de toneladas para a safra 2010/11 (fev./jan.), segundo dados da ABIOVE – Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. A evolução do consumo aparente (alimentícia e industrial) nos últimos 10 anos, isto é entre as safras de 1998/99 a 2008/09, cresceu 45%, atingindo em 2008/09 um consumo interno de 4,1 milhões de toneladas (ABIOVE, 2010).

O uso de óleos vegetais na culinária vem aumentando entre a população que busca, nos tempos atuais, hábitos alimentares mais saudáveis como o consumo de óleos comestíveis ricos em triacilgliceróis insaturados. O uso cotidiano destes óleos vegetais leva a necessidade de se avaliar melhor o seu grau de resistência, principalmente a sua estabilidade ao estresse térmico. Na população em geral, é um procedimento comum o consumo de óleos e gorduras, mesmo após terem sido submetidos a elevadas temperaturas (REDA; CARNEIRO, 2007).

Para simular o processo em que os óleos são submetidos a altas temperaturas e estudar os compostos originados durante o estresse térmico de óleos é muito comum a utilização da termoxidação. Método que consiste em submeter óleos e gorduras a elevadas temperaturas, 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 principais variáveis que devem ser levadas em consideração.

A oxidação de óleos na ausência de alimento, também é utilizada para estudar a eficiência de antioxidantes contra a formação dos compostos degradativos, prejudiciais à saúde humana.

O antioxidante, para ser empregado em alimentos, deve ser efetivo em

baixas concentrações (0,01% ou menos), compatível com o substrato, estável durante o aquecimento e período de estocagem do produto alimentício. Neste caso, os compostos mais utilizados na indústria alimentícia são: butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butilhidroquinona (TBHQ) e galato de propila (GP) (ORDÓÑEZ et al., 2005; RAMALHO; JORGE, 2006). Contudo, estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade desses antioxidantes apresentarem toxicidade (BAUER et al., 2001), abrindo caminho para o interesse nos antioxidantes naturalmente presentes nos alimentos.

Dentro desse cenário, tem sido dada ênfase à pesquisa de possíveis antioxidantes presentes em produtos naturais, com destaque para as especiarias, geralmente empregadas nos alimentos. Certas especiarias e extratos de especiarias, usados em diferentes preparações culinárias para intensificar o sabor, são excelentes fontes de compostos fenólicos que têm sido reportados por mostrarem boa atividade antioxidante (HINNEBURG; DORMAN; HILTUNEN, 2006) e, portando, podem servir como conservantes naturais.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antioxidante isolado e combinado dos extratos de orégano e tomilho, aplicados em óleo de soja, sob termoxidação.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Material

Foram utilizados extratos das especiarias orégano (*Oreganum vulgare L.*) e tomilho (*Thymus vulgaris L.*), na forma de oleoresinas, fornecidas pela Kalsec®; antioxidante sintético terc-butilhidroquinona (TBHQ), cedidos pela empresa Danisco S/A e óleo de soja refinado, isento de antioxidantes sintéticos e ácido cítrico, fornecido pela empresa Granol Ind. Com. e Exp. S/A, Bebedouro-SP.

3.2.2. Procedimento experimental

Foram submetidos à termoxidação os tratamentos, conduzidos em duas repetições:

- Óleo de soja sem adição de antioxidantes sintéticos;
- Óleo de soja com adição de 50 $mg.kg^{-1}$ de TBHQ;
- Óleo de soja com adição de 3.000 $mg.kg^{-1}$ da oleoresina de orégano;
- Óleo de soja com adição de 3.000 $mg.kg^{-1}$ da oleoresina de tomilho;

- Óleo de soja, com adição da mistura das oleoresinas (3.000 $mg.kg^{-1}$ de cada).

Os tratamentos foram conduzidos em chapa aquecida, utilizando-se béqueres de 50 mL contendo 40 mL de amostra com relação superfície/volume 0,4 cm^{-1}. A temperatura utilizada foi de 180 ± 5ºC, a qual é normalmente empregada em frituras por imersão, monitorada com auxílio de termômetro.

O processo foi conduzido de modo descontínuo, sendo realizadas 10 horas de aquecimento por dia, cujas amostras foram tomadas em diferentes períodos de tempo (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 horas). Todas as amostras foram recolhidas em frasco âmbar, inertizadas com nitrogênio gasoso e armazenadas à temperatura de aproximadamente -18ºC até o momento das análises.

3.2.3. Métodos

As amostras dos diferentes intervalos de tempo foram analisadas quanto à estabilidade oxidativa, índice de peróxidos e dienos conjugados.

A estabilidade oxidativa foi determinada pelo método proposto pela AOCS Cd 12b-92 (1993) utilizando-se o equipamento Rancimat, modelo 743, Metrohm. O teste é baseado na determinação da condutividade elétrica dos produtos voláteis de degradação. A determinação foi realizada a 100ºC, com fluxo de ar de 20 $L.h^{-1}$, com utilização de 3 g de amostra e volume de água destilada de 60 mL nos frascos contendo os eletrodos.

O índice de peróxidos foi determinado segundo a norma da AOCS Cd 8-53 (1993), em Titulador Potenciométrico, modelo 794 Basic Titrino, Metrohm. A determinação do índice de peróxidos representa a diferença entre a formação e a decomposição de peróxidos, expresso em miliequivalentes de oxigênio ativo por kg de matéria graxa.

Para determinação de dienos conjugados foi utilizado o método AOCS Ti 1a-64 (1993), em Especfotômetro, modelo UV mini 1240, Shimadzu. Este método determina dienos conjugados, presentes na matéria graxa, expressos como porcentagem de ácidos dienóicos conjugados, após a leitura da absorbância a 233 nm. O óleo foi diluído em iso-octano (2,2,4-trimetilpentano), de forma que a leitura de absorbância estivesse entre 0,2 e 0,8.

3.2.4. Análise estatística

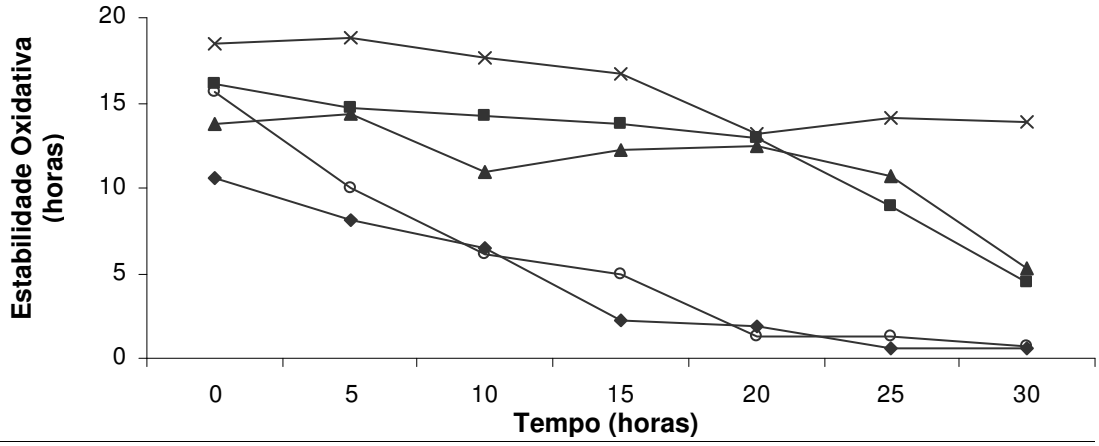
Os resultados obtidos das medidas analíticas, em duplicata, foram

submetidos às análises de variância, no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 7 (BANZATTO; KRONKA, 2006). As análises de variância e testes de Tukey para as médias a 5% foram obtidas através do programa ESTAT - Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0, 1999, Brasil.

3.3. Resultados e discussão

O Anexo D apresenta as análises de variância para a estabilidade oxidativa, índice de peróxidos e dienos conjugados das amostras analisadas. Como observado, o teste F foi significativo ($P < 0,01$) para a interação Tratamentos x Tempos de aquecimento em todas as análises. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento dessa interação, cujos resultados encontram-se nas Figuras 3, 4 e 5, respectivamente.

A estabilidade oxidativa é definida como o tempo para se atingir nível de rancidez detectável ou mudança na taxa de oxidação, sendo diretamente influenciada pela presença de antioxidante que, por sua vez sofre a ação de elevadas temperaturas (ANTONIASSI, 2001).



	0	5	10	15	20	25	30
Controle	10,57 ^{aD}	8,15 ^{bD}	6,42 ^{cD}	2,20 ^{dE}	1,87 ^{deB}	0,61 ^{eD}	0,61 ^{eC}
TBHQ	15,65 ^{aB}	9,99 ^{bC}	6,10 ^{cD}	4,94 ^{cD}	1,28 ^{dB}	1,25 ^{dD}	0,71 ^{dC}
Orégano	16,14 ^{aB}	14,73 ^{bB}	14,19 ^{bcB}	13,78 ^{bcB}	12,92 ^{cA}	8,96 ^{dC}	4,45 ^{eB}
Tomilho	13,81 ^{aC}	14,36 ^{aB}	10,95 ^{cC}	12,27 ^{bC}	12,42 ^{bA}	10,76 ^{cB}	5,34 ^{dB}
Mistura	18,48 ^{aA}	18,86 ^{abA}	17,66 ^{abA}	16,66 ^{bA}	13,20 ^{cA}	14,11 ^{cA}	13,84 ^{cA}

Controle: óleo de soja; TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg.kg^{-1}); Orégano (3.000 mg.kg^{-1} de oleoresina); Tomilho (3.000 mg.kg^{-1} de oleoresina); Mistura (3.000 mg.kg^{-1} de cada oleoresina).
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 ($P > 0,05$).

Figura 3 – Médias de estabilidade oxidativa para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 180°C.

A determinação da eficácia de um antioxidante corresponde, freqüentemente, à medida do aumento do período de indução resultante da sua adição (GRAMZA; KORCZAK, 2005).

Observa-se, na Figura 3, que ao longo do aquecimento o óleo de soja (controle) teve uma diminuição drástica no período de indução, o que era esperado, por estar isento de antioxidantes sintéticos e possuir apenas os antioxidantes presentes naturalmente, como por exemplo, os tocoferóis. Entretanto, o óleo de soja adicionado de TBHQ também apresentou perda acentuada da estabilidade oxidativa, e a partir de 20 horas de aquecimento sua estabilidade não diferiu significativamente do controle.

Verifica-se ainda que, os tratamentos com as oleoresinas foram mais eficientes na proteção do óleo contra a oxidação desde o início do aquecimento (5 horas) até 25 horas, sendo que a mistura das oleoresinas promoveu maior estabilidade ao óleo, mantendo-a alta até o tempo final de aquecimento.

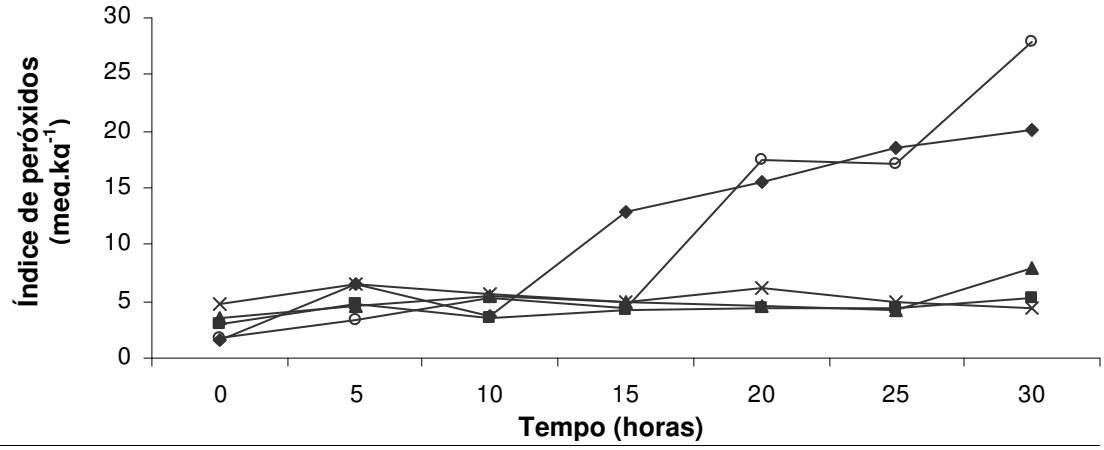
Lalas e Dourtoglou (2003) ao estudarem o uso de extratos de especiarias na prevenção da oxidação durante a fritura de batatas fritas, também observaram um aumento da estabilidade oxidativa do óleo de soja sobre a adição de 400 $mg.kg^{-1}$ de extrato de alecrim, usando Rancimat a 90°C.

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 combinados, em comparação com a aplicação de cada antioxidante isoladamente. Da mesma forma, em estudo realizado por Luzia e Jorge (2009), a adição do extrato de sementes de limão (2.400 $mg.kg^{-1}$) em conjunto com o TBHQ (25 $mg.kg^{-1}$) em óleo de soja, apresentou maior eficiência na proteção do óleo do que a utilização do TBHQ isoladamente e em concentrações maiores (50 $mg.kg^{-1}$).

O índice de peróxidos em óleos está relacionado com sua degradação oxidativa. É um indicador muito sensível do estágio inicial da oxidação, e sua presença é indício de que a deterioração do sabor e odor, em função de sua instabilidade, está por acontecer. A avaliação deste parâmetro de oxidação representa a diferença entre a formação e a decomposição de peróxidos, pois quando sua concentração atinge certo nível, mudanças complexas ocorrem, formando compostos de baixo peso molecular, oriundos de sua degradação (REGITANO-D'ARCE, 2006; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Neste estudo, vale ressaltar que os tratamentos foram conduzidos em chapa

aquecida (180ºC), e a variação de temperatura, mesmo que pequena (± 5ºC), pode ter influenciado a formação dos peróxidos, que, ao longo do tempo podem ter se degradado e formado outros compostos.



Controle	1,61 ^{dB}	6,52 ^{cA}	3,75 ^{dA}	12,84 ^{bA}	15,52 ^{bA}	18,52 ^{aA}	20,10 ^{aB}
TBHQ	1,76 ^{dB}	3,34 ^{cdB}	5,38 ^{cA}	4,37 ^{cdB}	17,45 ^{bA}	17,12 ^{bA}	27,86 ^{aA}
Orégano	2,95 ^{aAB}	4,72 ^{aAB}	3,52 ^{aA}	4,18 ^{aB}	4,40 ^{aB}	4,34 ^{aB}	5,25 ^{aD}
Tomilho	3,56 ^{bAB}	4,63 ^{bAB}	5,45 ^{abA}	4,97 ^{bB}	4,61 ^{bB}	4,18 ^{bB}	7,95 ^{aC}
Mistura	4,76 ^{aA}	6,48 ^{aA}	5,62 ^{aA}	4,92 ^{aB}	6,23 ^{aB}	4,89 ^{aB}	4,34 ^{aD}

Controle: óleo de soja; TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg.kg^{-1}); Orégano (3.000 mg.kg^{-1} de oleoresina); Tomilho (3.000 mg.kg^{-1} de oleoresina); Mistura (3.000 mg.kg^{-1} de cada oleoresina).
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).

Figura 4 – Médias de índice de peróxidos para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 180°C.

De acordo com a Figura 4, o índice de peróxidos para o tempo inicial de todos os tratamentos, está dentro da margem permitida pelas normas que regulamentam a adequação de um óleo novo para consumo no Brasil, Resolução 270/2005, que estabelece o limite máximo de 10 meq.kg^{-1} para óleo de soja refinado (BRASIL, 2005). Embora esta norma não seja específica para óleos sob aquecimento, observa-se que nos tratamentos com oleoresinas o índice de peróxidos permaneceu abaixo dos valores de referência, enquanto que no tratamento com o antioxidante sintético TBHQ esse valor foi ultrapassado a partir de 20 horas de aquecimento.

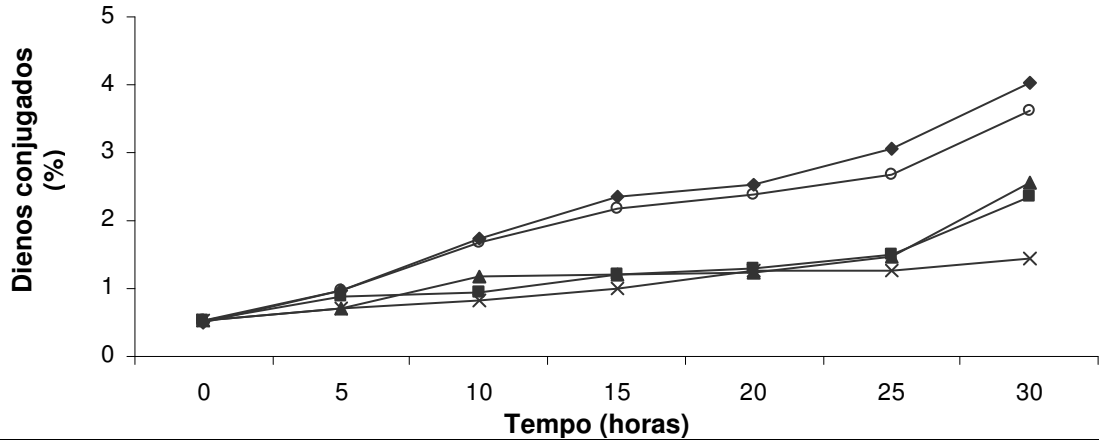
Pode-se observar ao longo do aquecimento um maior aumento nos teores de peróxidos para o controle, sendo mais evidente após 10 horas de aquecimento. Já o TBHQ perde seu efeito protetor a partir de 20 horas, levando inclusive a um

efeito pró-oxidante, visto que no final do aquecimento obteve-se valores maiores que o controle. Nas oleoresinas de orégano e tomilho, observa-se um comportamento estável ao longo do aquecimento, assim como na mistura das oleoresinas.

As oleoresinas de orégano e tomilho foram altamente eficientes na proteção do óleo de soja com relação à formação de compostos primários de oxidação. A de orégano reduziu em 74%, a tomilho em 60% e a mistura em 78% a formação de peróxidos no óleo soja após 30 horas de aquecimento a 180ºC, indicando boa capacidade em inibir o processo oxidativo.

O acompanhamento dos espectros de absorção na faixa do ultravioleta das amostras de óleo, formação de dienos conjugados, fornece uma boa indicação das alterações que ocorrem durante o processo oxidativo, visto que, se apresentam mais estáveis, permanecendo no óleo aquecido (CELLA; REGITANO-D'ARCE; SPOTO, 2002).

De acordo com a Figura 5, verifica-se que os teores de dienos conjugados aumentaram de forma gradual, no decorrer do processo de termoxidação, em todos os tratamentos.



	0	5	10	15	20	25	30
Controle	0,51 ^{fA}	0,96 ^{eA}	1,74 ^{dA}	2,35 ^{cA}	2,54 ^{cA}	3,07 ^{bA}	4,04 ^{aA}
TBHQ	0,52 ^{fA}	0,97 ^{eA}	1,68 ^{dA}	2,17 ^{cA}	2,38 ^{cA}	2,69 ^{bB}	3,62 ^{aB}
Orégano	0,54 ^{eA}	0,88 ^{dAB}	0,95 ^{dC}	1,21 ^{cB}	1,28 ^{bcB}	1,49 ^{bC}	2,36 ^{aC}
Tomilho	0,52 ^{dA}	0,71 ^{dB}	1,19 ^{cB}	1,21 ^{cB}	1,24 ^{bcB}	1,46 ^{bC}	2,55 ^{aC}
Mistura	0,54 ^{dA}	0,71 ^{cdB}	0,83 ^{bcC}	0,99 ^{bB}	1,26 ^{aB}	1,27 ^{aC}	1,45 ^{aD}

Controle: óleo de soja; TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg.kg^{-1}); Orégano (3.000 mg.kg^{-1} de oleoresina); Tomilho (3.000 mg.kg^{-1} de oleoresina); Mistura (3.000 mg.kg^{-1} de cada oleoresina).
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).

Figura 5 – Médias de dienos conjugados para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 180°C.

Quando se avalia os diferentes tratamentos em cada tempo, observa-se que somente no final do experimento, após 25 horas de aquecimento, o antioxidante sintético foi eficaz na proteção contra a formação de dienos conjugados, diferindo-se do controle. Nos tratamentos com oleoresinas, a ação antioxidante foi maior, diferindo significativamente dos demais tratamentos desde as 10 horas de aquecimento. A mistura das oleoresinas promoveu maior proteção apenas no tempo final de aquecimento (30 horas).

No final do processo de aquecimento os melhores percentuais de proteção do óleo de soja contra a formação de dienos conjugados foi para o tratamento com a mistura das oleoresinas (64%), seguido da oleoresina de orégano (42%).

Ramalho e Jorge (2008) ao aplicarem extrato de alecrim em óleo de soja refinado submetido à termoxidação observaram uma redução de 50% na formação de dienos conjugados após 10 horas de aquecimento a 180ºC.

3.4. Conclusões

Em elevada temperatura, termoxidação, as oleoresinas de orégano e tomilho aplicadas de forma isolada apresentaram um poder antioxidante maior que o antioxidante TBHQ, através da redução na formação de compostos oxidativos, indicando que a adição de 3.000 $mg.kg^{-1}$ garante proteção oxidativa melhor que o antioxidante sintético (50 $mg.kg^{-1}$). Entretanto, o aumento da concentração das oleoresinas, provocado pela mistura das concentrações das mesmas e possível sinergismo, promoveu maior estabilidade ao óleo.

3.5. Referências bibliográficas

ABIOVE – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS. Disponível em: http://www.abiove.com.br/estatistica_br_0708.html. Acesso em: 2 mar. 2010.

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**, Chicago, v. 85, n. 11, p. 1045-1049, 2008.

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

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

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

BARBOSA, M. Z.; NOGUEIRA JR, S.; FREITAS, S. M. Agricultura de alimentos x de energia: impacto nas cotações internacionais. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, São Paulo, v. 3, n. 1, p. 1-5, 2008.

BAUER, A. K. et al. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. **Toxicology**, Limerick, v. 169, n. 1, p.1-15, 2001.

BRASIL. Resolução nº 270, de 22 de setembro de 2005. **Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal.** Diário Oficial da União, Brasília-DF, v. 184. 23 set. 2005. Seção I, p. 372-373.

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.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. Statistical Databases. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em: 2 mar. 2010.

GRAMZA, A.; KORCZAK, J. Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 16, n. 8, p. 351-358, 2005.

HINNEBURG, I.; DORMAN, H. J. D.; HILTUNEN, R. Antioxidant activities of extracts from selected culinary herbs and spices. **Food Chemistry**, London, v. 97, n. 1, p. 122-129, 2006.

LALAS, S.; DOURTOGLOU, V. Use of rosemary extract in preventing oxidation during deep-fat frying of potato chips. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 80, n. 6, p. 579-583, 2003.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Ação antioxidante do extrato de sementes de limão

adicionado ao óleo de soja sob termoxidação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 27-32, 2009.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos:** componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 1. 294 p.

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. 36-39, 2008.

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.; CARNEIRO, P. I. B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 27, p. 60-67, fev./mar., 2007.

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

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.

3.6. Anexos

Anexo D – Análise de variância para estabilidade oxidativa (EO), índice de peróxidos (IP) e dienos conjugados (DC).

Causas de Variação	G.L.	Quadrado Médio		
		EO	IP	DC
Tratamentos	4	330,8193**	167,9436**	3,7152**
Tempos de aquecimento	6	119,7226**	127,5365**	5,7094**
Tratamentos x Tempos	24	8,8347**	45,0424**	0,3020**
Resíduo	35	0,1744	0,6969	0,0059
Desvio Padrão		0,4176	0,8348	0,0767
Coef. de Variação (%)		4,20	11,34	5,00

** Significativo (P < 0,01).

Extratos de especiarias de orégano (*Oreganum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.): efeito protetor e perfil de ácidos graxos em óleo de soja termoxidado

Resumo

Devido à tendência atual pela procura cada vez maior de produtos naturais pelos consumidores, causada pela crescente preocupação com a saúde, ênfase tem sido dada ao estudo de condimentos e ervas aromáticas com potencial para uso como antioxidantes em alimentos. No presente estudo, o objetivo foi avaliar o efeito protetor dos extratos de especiarias, orégano e tomilho, na formação de compostos polares totais e no perfil de ácidos graxos do óleo de soja sob condição de termoxidação. Foram submetidos à termoxidação (180ºC/30 horas), o óleo de soja adicionado de 3.000 $mg.kg^{-1}$ das oleoresinas de orégano e tomilho e da mistura das mesmas (3.000 $mg.kg^{-1}$ de cada oleoresina) além de óleo de soja adicionado de TBHQ (50 $mg.kg^{-1}$) e óleo de soja sem adição de antioxidantes utilizado como controle. As amostras termoxidadas foram analisadas por cromatografia quanto à formação de compostos polares totais e perfil de ácidos graxos. As oleoresinas de orégano e tomilho aplicadas de forma isolada apresentaram maior efeito protetor impedindo a formação de compostos polares maior que o antioxidante TBHQ, indicando que a adição de 3.000 $mg.kg^{-1}$ garantiu melhor proteção oxidativa que o antioxidante sintético. Entretanto, o aumento da concentração das oleoresinas, provocado pela mistura das mesmas e possível sinergismo, promoveu menor formação de compostos polares, assim como menor formação proporcional de ácidos graxos saturados.

Palavras-chave: *oreganum vulgare* L., *thymus vulgaris* L., compostos polares, ácidos graxos, cromatografia.

3.7. Introdução

Os óleos e gorduras estão sujeitos a diversas reações que resultam em modificações das características originais. Estas envolvem alterações biológicas, físicas e químicas, dentro das quais se enquadra o processo de oxidação.

A oxidação lipídica é uma reação que pode provocar a perda do valor nutritivo pela decomposição dos ácidos graxos e a formação de compostos que podem reagir com outros componentes dos alimentos, além de serem prejudiciais para o organismo humano (MARINOVA, YANISHILIEVA, 2003; MATHEW, ABRAHAM, 2006).

Por conseguinte, a inibição da oxidação é de grande importância prática na preservação de lipídios, em especial os ácidos graxos poliinsaturados. Os compostos sintéticos, como o butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), galato de propila (GP) e o terc-butilhidroquinona (TBHQ) são antioxidantes amplamente utilizados para este fim, devido ao seu baixo custo, alta estabilidade e eficácia (BANDONIENÉ et al., 2002).

Como conseqüência do maior consumo de produtos industrializados, com altos teores de óleos e gorduras, evidenciados principalmente a partir da década de 1980, a ingestão dos antioxidantes sintéticos também foi aumentada (SHIBATA et al., 1993). Esta condição trouxe uma preocupação quanto à segurança destes compostos e motivou a partir desta época estudos com a finalidade de observar as conseqüências que uma exposição aguda e prolongada de antioxidantes sintéticos promove ao organismo (POKORNY, 2007).

Devido à tendência atual pela procura cada vez maior de produtos naturais pelos consumidores, causada pela crescente preocupação com a saúde, ênfase tem sido dada ao estudo de condimentos e ervas aromáticas com potencial para uso como antioxidantes em alimentos. Trabalhos encontrados na literatura demonstraram que os condimentos da família Lamiaceae, bem como os extratos e óleos essenciais destes condimentos, são eficientes como antioxidantes (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005; DORMAN et al., 2004; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007; YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNY, 2006).

O orégano, membro desta família, é uma especiaria com sabor altamente favorável aos consumidores de todo o mundo. Esta especiaria é também utilizada pelas suas propriedades antimicrobianas (YANISHLIEVA, MARINOVA; POKORNY, 2006). Diversos compostos fenólicos já foram identificados em suas folhas e extratos

(KIKUZAKI; NAKATANI, 1989; NAKATANI; KIKUZAKI, 1987).

O extrato etéreo de orégano mostrou-se efetivo na prevenção da oxidação lipídica da banha de porco e de óleos vegetais (milho, soja e oliva); nele foram identificados diversos flavonóides, tais como apigenina, di-hidrocampferol e di-hidroquercetina (VEKIAKI et al., 1993). No orégano, as agliconas também foram associadas à prevenção da oxidação (MILOS; MASTELIC; JERKOVIC, 2000).

O tomilho, original das regiões em torno do Mediterrâneo, também é da família Lamiaceae e tem sido comumente utilizado como especiaria culinária para adicionar sabor (YANISHLIEVA, MARINOVA; POKORNY, 2006). Os fenólicos monoterpeno, timol e carvacrol são os principais compostos que foram identificados (NAKATANI, 1992).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito protetor dos extratos de especiarias, orégano e tomilho, na formação de compostos polares totais e no perfil dos ácidos graxos do óleo de soja, sob condição de termoxidação.

3.8. Material e métodos

3.8.1. Material

Foram utilizados extratos das especiarias orégano (*Oreganum vulgare L.*) e tomilho (*Thymus vulgaris L.*), na forma de oleoresinas, fornecidas pela Kalsec®; antioxidante sintético terc-butilhidroquinona (TBHQ), cedidos pela empresa Danisco S/A e óleo de soja refinado, isento de antioxidantes sintéticos e ácido cítrico, fornecido pela empresa Granol Ind. Com. e Exp. S/A, Bebedouro-SP.

3.8.2. Procedimento experimental

Foram submetidos à termoxidação os tratamentos, conduzidos em duas repetições:

- Óleo de soja sem adição de antioxidantes sintéticos;
- Óleo de soja com adição de 50 $mg.kg^{-1}$ de TBHQ;
- Óleo de soja com adição de 3.000 $mg.kg^{-1}$ da oleoresina de orégano;
- Óleo de soja com adição de 3.000 $mg.kg^{-1}$ da oleoresina de tomilho;
- Óleo de soja, com adição da mistura das oleoresinas (3.000 $mg.kg^{-1}$ de cada).

Os tratamentos foram conduzidos em chapa aquecida, utilizando-se béqueres de 50 mL contendo 40 mL de amostra com relação superfície/volume 0,4 cm^{-1}. A temperatura utilizada foi de 180 ± 5ºC, a qual é normalmente empregada em

frituras por imersão, monitorada com auxílio de termômetro.

O processo foi conduzido de modo descontínuo, sendo realizadas 10 horas de aquecimento por dia, cujas amostras foram tomadas em diferentes períodos de tempo (0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 horas). Todas as amostras foram recolhidas em frasco âmbar, inertizadas com nitrogênio gasoso e armazenadas à temperatura de aproximadamente -18ºC até o momento das análises.

3.8.3. Métodos

As amostras dos diferentes intervalos de tempo foram analisadas quanto à formação de compostos polares totais e para os tempos 0, 15 e 30 horas de aquecimento foi realizado o perfil de ácidos graxos.

Para compostos polares totais foi aplicado o método cromatográfico proposto por Dobarganes; Velasco; Dieffenbacher (2000). A base do método é a separação da amostra de óleo, por cromatografia de adsorção, em duas frações de diferentes polaridades, determinadas gravimetricamente. O teor de compostos polares, fração polar, foi calculado a partir dos triacilgliceróis não alterados, considerando-se que os compostos polares retidos estivessem na fração polar.

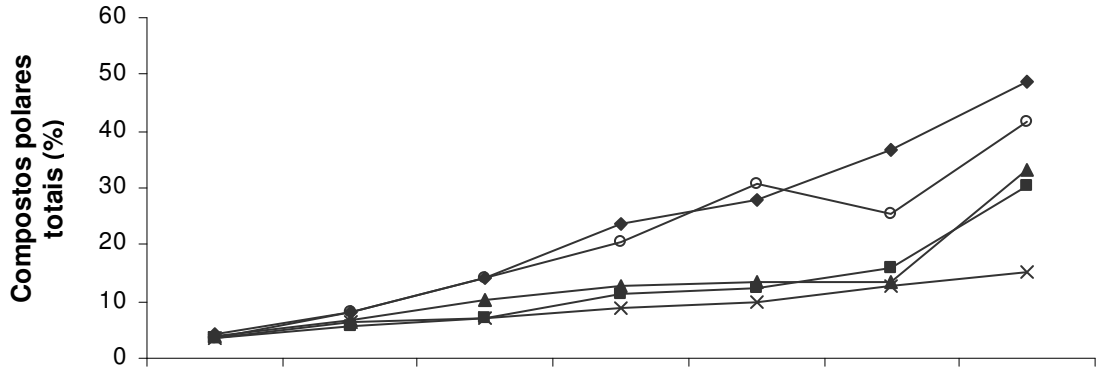
Na análise do perfil de ácidos graxos, os ésteres metílicos dos ácidos graxos presentes nos óleos foram obtidos segundo procedimento descrito por Hartman e Lago (1973). Utilizou-se um cromatógrafo a gás, marca Varian (Walnut Creek, USA), modelo GC 3900, equipado com detector 99 de ionização de chama, injetor e amostrador automático. Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 de 60 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^{-1} 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^{-1}. 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%.

3.8.4. Análise estatística

Os resultados obtidos das medidas analíticas, em duplicata, foram submetidos às análises de variância, no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 7 e 5 x 3, para compostos polares totais e perfil de ácidos graxos, respectivamente (BANZATTO; KRONKA, 2006). As análises de variância e testes de Tukey para as médias a 5% foram obtidas através do programa ESTAT - Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0, 1999, Brasil.

3.9. Resultados e discussão

O Anexo E apresenta a análise de variância para a determinação de compostos polares totais. Como observado, o teste F foi significativo ($P < 0,01$) para a interação Tratamentos x Tempos de aquecimento. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento dessa interação, cujos resultados encontram-se na Figura 6.



	0	5	10	15	20	25	30
Controle	4,12 ^{gA}	8,27 ^{fA}	13,97 ^{eA}	23,52 ^{dA}	28,04 ^{cA}	36,53 ^{bA}	48,61 ^{aA}
TBHQ	3,52 ^{gA}	8,09 ^{fA}	13,99 ^{eA}	20,46 ^{dA}	30,70 ^{bA}	25,26 ^{cB}	41,81 ^{aB}
Orégano	3,54 ^{dA}	5,75 ^{dA}	6,89 ^{dC}	11,24 ^{cBC}	12,44 ^{cBC}	15,93 ^{bC}	30,48 ^{aC}
Tomilho	3,90 ^{dA}	6,86 ^{cdA}	10,28 ^{bcB}	12,66 ^{bB}	13,47 ^{bC}	13,49 ^{bCD}	33,07 ^{aC}
Mistura	3,66 ^{eA}	6,52 ^{deA}	7,21 ^{cdBC}	8,99 ^{cdC}	9,96 ^{bcC}	12,77 ^{abD}	15,17 ^{aD}

Controle: óleo de soja; TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 $mg.kg^{-1}$); Orégano (3.000 $mg.kg^{-1}$ de oleoresina); Tomilho (3.000 $mg.kg^{-1}$ de oleoresina); Mistura (3.000 $mg.kg^{-1}$ de cada oleoresina).
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 ($P > 0,05$).

Figura 6 – Médias de compostos polares totais para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 180°C.

A determinação de compostos polares aparece como o método analítico mais utilizado para o controle de qualidade de óleos e gorduras de fritura. A fração

polar é, de maneira ampla, agrupada em polímeros e produtos de decomposição e, como conseqüência, quanto maior a fração polar, pior a qualidade do óleo (PAUL; MITTAL, 1997; STEEL; DOBARGANES; BARRERA-ARELLANO, 2006).

A Figura 6 demonstra que em todos os tratamentos houve um acréscimo nos valores de compostos polares totais com o decorrer do tempo, sendo este aumento mais intenso para os tratamentos controle e TBHQ. Para os óleos adicionados de orégano, tomilho e mistura, os valores foram bem menores demonstrando a eficiente ação protetora dos antioxidantes nesse período.

Verifica-se nos tempos iniciais, 0 e 5 horas, que não houve diferença significativa entre os teores de compostos polares em todos os tratamentos, mas a partir de 10 horas de aquecimento as oleoresinas foram mais eficientes na proteção do óleo de soja. Observa-se que as oleoresinas de orégano e tomilho tiveram um comportamento similar nos diferentes tempos de aquecimento, com exceção do tempo de 10 horas. A mistura das oleoresinas, e conseqüente aumento da concentração de antioxidantes, promoveu efeito positivo apenas no final do processo de aquecimento (30 horas de aquecimento).

Ao término do processo de aquecimento os melhores percentuais de proteção do óleo de soja contra a formação de compostos polares, foram na mistura das oleoresinas com 69%, seguidas das oleoresinas de orégano 38% e tomilho 32%.

Quando se avalia óleos vegetais sob aquecimento, em especial nos processos de fritura, alguns países limitam o uso dos óleos à sua quantidade total dos produtos de alteração, estabelecida em torno de 24-27% de compostos polares (FIRESTONE, 1993).

Neste estudo, no tempo final de aquecimento (30 horas) apenas a mistura das oleoresinas apresentava-se dentro dos limites estabelecidos. As oleoresinas de orégano e tomilho, analisadas isoladamente, apresentaram valores dentro dos limites estabelecidos até o tempo de 25 horas de aquecimento. Vale ressaltar que o TBHQ apresentou comportamento semelhante ao controle, ultrapassando os limites a partir de 20 horas de aquecimento.

O TBHQ, antioxidante sintético muito utilizado pelas indústrias brasileiras, demonstrou não suportar elevadas temperaturas por períodos longos. Este resultado foi semelhante ao encontrado por Luzia e Jorge (2009), ao estudarem o óleo de soja adicionado de TBHQ (50 $mg.kg^{-1}$) sob termoxidação, onde o antioxidante sintético

perdeu sua ação protetora a partir de 20 horas de aquecimento atingindo valores de 41% de compostos polares. No referido estudo, a mistura de antioxidantes sintéticos (25 $mg.kg^{-1}$ de TBHQ) com naturais (2.400 $mg.kg^{-1}$ de extrato de semente de limão) em 20 horas de aquecimento retardou a formação de polares em 46% quando comparado ao tratamento apenas com TBHQ.

Segundo Romero et al. (2004), a capacidade antioxidante de um composto em diferentes sistemas testados pode também ser avaliada através do Fator de Proteção (FP), que é definido como a razão entre o valor dos compostos polares de um óleo na ausência do antioxidante (controle) descontado o valor de compostos polares da amostra pelo valor dos compostos polares do controle. O FP para cada Tratamento em cada Tempo de aquecimento está demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Fatores de proteção para as oleoresinas aplicadas no óleo de soja com base na formação de compostos polares.

Tratamentos	**Tempo de aquecimento (horas)**						
	0	**5**	**10**	**15**	**20**	**25**	**30**
TBHQ	0,15	0,02	0,00	0,13	-0,09	0,31	0,14
Orégano	0,14	0,30	0,50	0,52	0,56	0,56	0,37
Tomilho	0,05	0,17	0,26	0,46	0,52	0,63	0,32
Mistura	0,11	0,21	0,48	0,61	0,64	0,65	0,69

TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 $mg.kg^{-1}$); Orégano (3.000 $mg.kg^{-1}$ de oleoresina); Tomilho (3.000 $mg.kg^{-1}$ de oleoresina); Mistura (3.000 $mg.kg^{-1}$ de cada oleoresina).

O TBHQ, baseado na formação de compostos polares, apresentou menor efeito protetor que os demais tratamentos e uma sensível redução desse efeito ao longo dos tempos de aquecimento até o tempo de 20 horas.

De forma oposta, as oleoresinas apresentaram um FP crescente ao longo do tempo; para as oleoresinas aplicadas de forma isolada o efeito foi mantido até 25 horas e para a mistura até o tempo final de aquecimento, 30 horas, demonstrando, assim, maior resistência a períodos longos de aquecimento. A mistura das oleoresinas promoveu no tempo final de aquecimento, 86% a mais de FP que o orégano e 116% a mais que o tomilho.

A Tabela 7 apresenta os dados do perfil de ácidos graxos encontrados nas amostras referentes aos tempos 0, 15 e 30 horas de aquecimento para todos os tratamentos durante a termoxidação.

Tabela 7 – Médias do perfil de ácidos graxos para todos os tratamentos nos tempos 0, 15, 30 horas durante a termoxidação.

Ácidos Graxos (%)	OS			OS + TBHQ			OS + OO			OS + OT			OS + M		
	0	15	30	0	15	30	0	15	30	0	15	30	0	15	30
C16:0	11,34	13,49	15,05	11,90	13,48	15,05	11,76	13,41	13,93	11,83	12,66	15,67	11,41	12,57	12,10
C16:1	1,79	-	-	1,47	0,11	0,10	1,90	0,10	0,11	1,19	0,10	0,11	1,65	-	-
C18:0	3,12	3,22	5,09	3,06	2,97	4,37	3,14	3,23	4,21	3,88	3,79	4,67	3,88	3,80	3,72
C18:1n9c	22,34	26,04	28,07	22,89	24,80	26,57	22,68	25,40	27,09	22,65	27,24	28,01	22,67	24,51	25,75
C18:1n9t	-	0,21	0,31	-	0,18	0,25	-	0,16	0,24	-	0,15	0,29	-	0,10	0,15
C18:2n6c	53,98	48,47	42,67	53,74	50,42	44,08	53,22	50,34	45,90	53,73	48,23	43,21	53,98	51,02	45,45
C18:2n6t	-	0,39	0,60	-	0,21	0,55	-	0,24	0,45	-	0,38	0,43	-	0,20	0,50
C18:3n3	4,32	3,43	2,41	4,30	3,42	2,72	4,53	3,40	2,78	4,86	2,97	2,01	4,54	3,54	4,08
C20:0	0,85	0,69	0,20	0,81	0,58	0,62	0,71	0,53	0,64	0,40	0,82	0,65	0,66	0,84	0,86
C20:1	-	0,52	0,10	-	0,59	0,59	-	0,50	0,24	-	0,59	0,40	-	0,74	0,82
C22:0	-	0,54	0,60	-	0,40	0,55	-	0,42	0,31	-	0,49	0,50	-	0,48	0,47
C24:0	-	0,13	0,15	-	0,10	0,13	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15
Outros	2,26	2,87	4,75	1,83	2,74	4,42	2,06	2,27	4,1	1,46	2,58	4,05	1,21	2,20	5,95

OS: óleo de soja; TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 $mg.kg^{-1}$); OO: oleoresina de orégano (3.000 $mg.kg^{-1}$); OT: oleoresina de tomilho (3.000 $mg.kg^{-1}$); M: mistura das oleoresinas (3.000 $mg.kg^{-1}$de cada). C16:0: palmítico, C16:1: palmitoléico, C18:0: esteárico, C18:1n9c: oléico, C18:1n9t: elaídico, C18:2n6c: linoléico, C18:2n6t: trans-linoléico, C18:3n3: α-linolênico, C20:0: araquídico, C20:1: eicosenóico, C22:0: behênico, C24:0: lignocérico, Outros: ácidos graxos < 0,1% e não identificados.

Observa-se que o ácido linoléico (C18:2n6c) apresenta-se em maior concentração quando comparado aos demais ácidos graxos, em todos os tratamentos analisados, com teor médio inicial de 54%. Ao longo do aquecimento seus valores diminuem progressivamente, sendo esta redução de 18%. De forma similar, o ácido α-linolênico (C18:3n3) tem seus valores diminuídos com o decorrer do aquecimento, com redução mais acentuada, com média de 38%. A disponibilidade dos ácidos graxos essenciais, linoléico e α-linolênico, durante o processo de aquecimento, é afetada pela oxidação e/ou polimerização dentre outros fatores, portanto, sua dosagem pode ser uma importante ferramenta de análise de qualidade para os óleos (PANTZARIS, 1998).

Neste estudo, os tratamentos com mistura de oleoresinas e com oleoresina de orégano promoveram as menores reduções do ácido graxo linoléico, 16 e 14% respectivamente. Já para o ácido α-linolênico a menor redução foi para o tratamento da mistura das oleoresinas (10%).

Em segundo lugar em prevalência, encontra-se o ácido oléico (C18:1n9c), o qual teve teor médio inicial de 23% e comportamento inverso aos ácidos linoléico e α-linolênico, ou seja, aumentou de forma expressiva com o tempo de aquecimento, em média 20%, resultado da degradação dos ácidos graxos poliinsaturados.

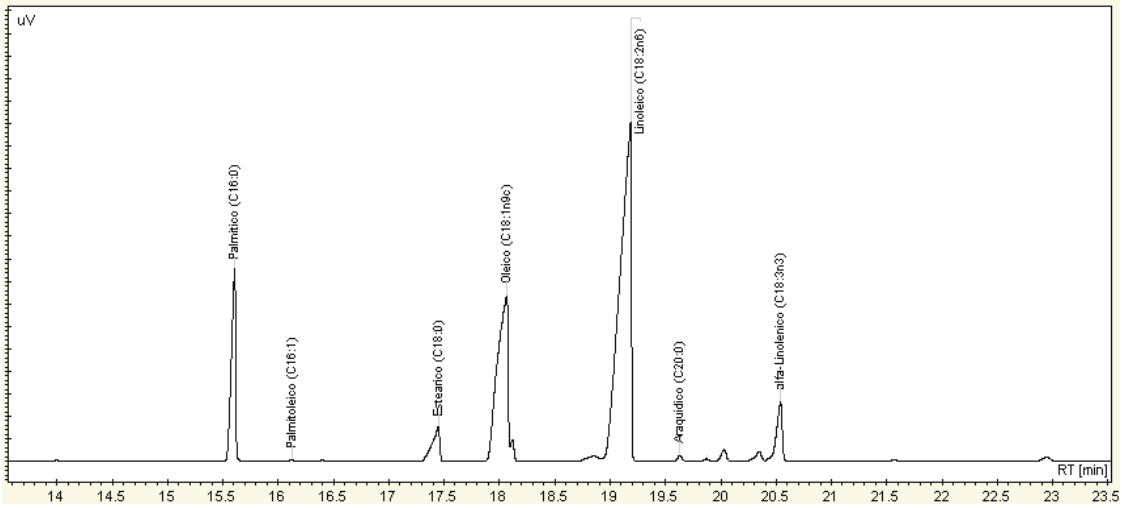
Vale ressaltar ainda a presença dos ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) com valores iniciais médios de 12 e 3%, respectivamente. As concentrações desses ácidos graxos saturados aumentaram com o aumento do tempo de aquecimento, com exceção do esteárico no tratamento com a mistura das oleoresinas. O aumento observado dos ácidos graxos saturados é decorrente da diminuição proporcional dos ácidos graxos poliinsaturados.

Outro aspecto presente em óleos aquecidos por longos períodos é a formação de isômeros geométricos *trans* de ácidos graxos insaturados (SANIBAL; MANCINI, 2004). No presente trabalho, as alterações do perfil de ácidos graxos pela formação de isômeros *trans* em detrimento aos ácidos graxos insaturados foram detectadas a partir de 15 horas de aquecimento, sendo que no final do experimento formou-se menos de 1% (0,51% de isômero poli *trans* e 0,25% de isômero mono *trans*).

A Figura 7 ilustra os cromatogramas da composição em ácidos graxos do óleo de soja adicionado da mistura das oleoresinas nos tempos inicial (0 hora) e final (30 horas) da termoxidação a 180°C, com destaque para a formação dos ácidos

graxos elaídico (C18:1n9t) e trans-linoléico (C18:2n6t).

(a)



(b)

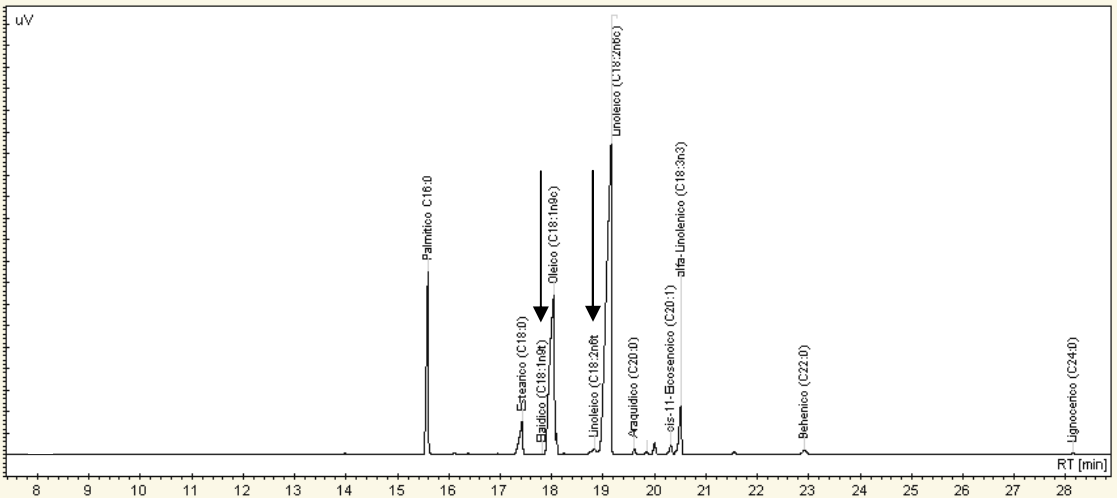
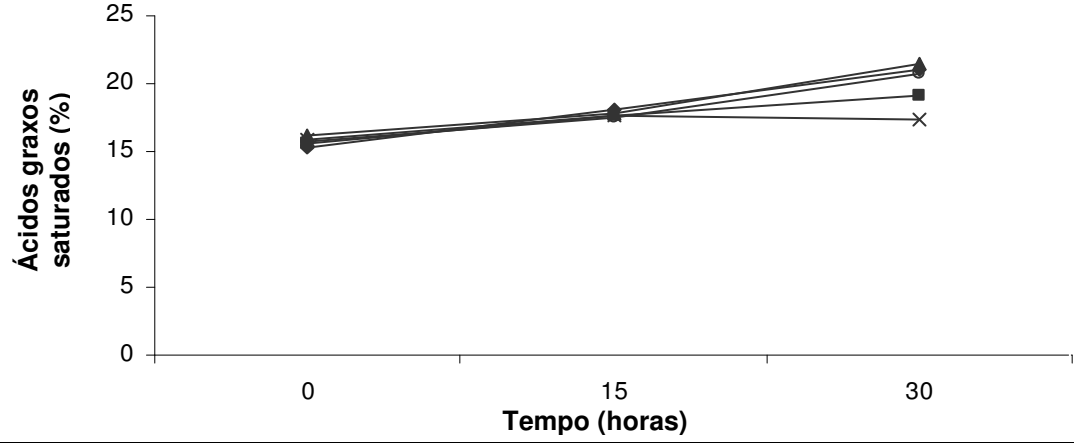


Figura 7 – Cromatogramas da composição em ácidos graxos do óleo de soja adicionado de mistura das oleoresinas no tempo inicial (a) e no tempo final (b) da termoxidação a 180°C. Condições cromatográficas: coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 (60 m x 0,25 mm x 0,20 μm); injetor automático (230°C); razão de divisão da amostra 1:30; programação de temperatura da coluna: 50°C por 2 min, 4°C.min^{-1} até 240°C, 240°C por 20,5 min; detector de ionização de chama (250°C); gás de arraste: hidrogênio (fluxo de 30 mL.min^{-1}).

Para avaliar a interação entre os Tratamentos e Tempos de aquecimento, foi realizada a análise de variância, Anexo F, para a determinação do perfil de ácidos

graxos agrupados em ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poliinsaturados. Como observado, o teste F foi significativo (P < 0,01) para a interação Tratamentos x Tempos de aquecimento. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento dessa interação, cujos resultados encontram-se nas Figuras 8, 9 e 10, respectivamente.



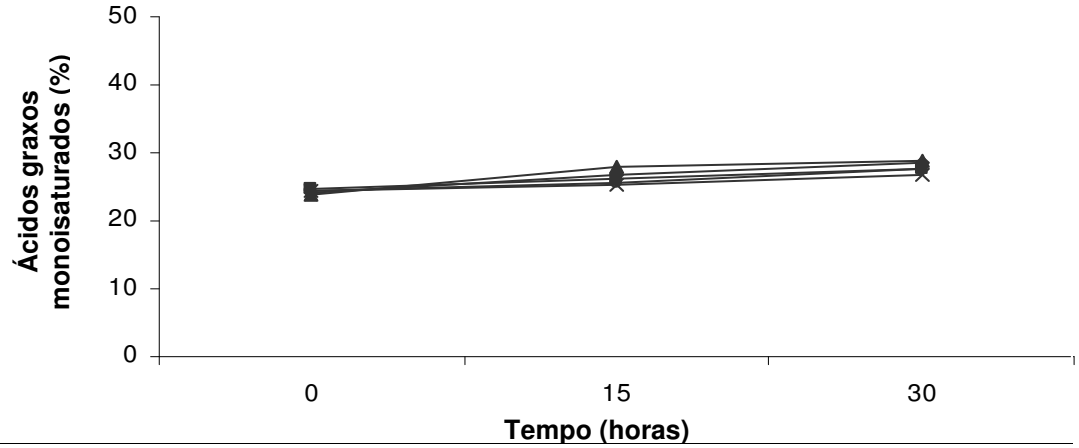
Controle	15,31^{cD}	18,07^{bA}	21,09^{aB}
TBHQ	15,77^{cBC}	17,53^{bC}	20,72^{aC}
Orégano	15,61^{cC}	17,59^{bBC}	19,09^{aD}
Tomilho	16,11^{cA}	17,76^{bB}	21,49^{aA}
Mistura	15,95^{cAB}	17,69^{aBC}	17,30^{bE}

Controle: óleo de soja; TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg.kg^{-1}); Orégano (3.000 mg.kg^{-1} de oleoresina); Tomilho (3.000 mg.kg^{-1} de oleoresina); Mistura (3.000 mg.kg^{-1} de cada oleoresina).
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).

Figura 8 – Médias de ácidos graxos saturados para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 180°C.

Ao avaliar o perfil de ácidos graxos saturados, para os tratamentos durante o processo de aquecimento, Figura 8, observa-se um acréscimo proporcional ao longo do aquecimento em todos os tratamentos, com exceção da mistura das oleoresinas que no final do aquecimento apresentou uma pequena queda na formação de ácidos graxos saturados. No tempo final do aquecimento (30 horas) o aumento proporcional dos ácidos graxos saturados foi de 38% para o controle, 31% para TBHQ; 22% para orégano, 33% para tomilho e apenas 8% para mistura.

Para os ácidos graxos monoinsaturados, Figura 9, o aumento ocorreu em todos os tratamentos de forma gradual. No final do tempo de aquecimento estes valores aumentaram em menor proporção para a mistura (10%) seguida da oleoresina de orégano (13%).



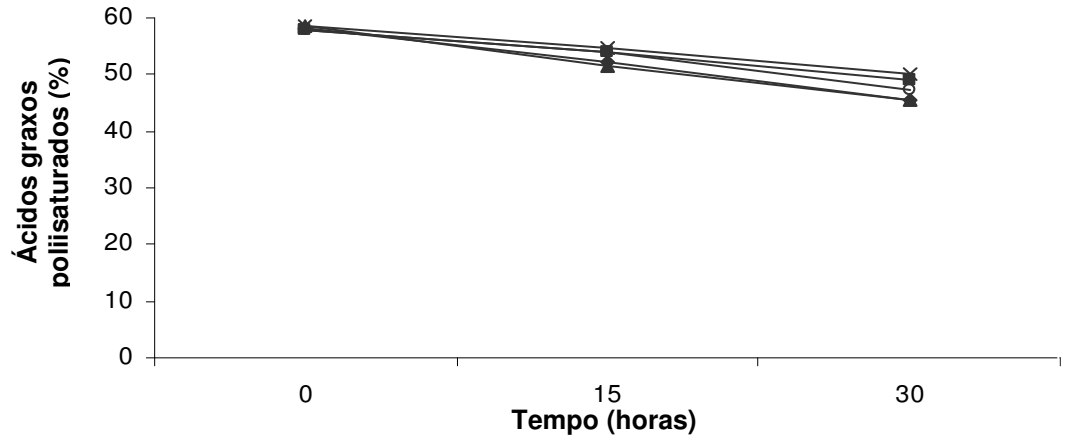
Controle	24,13^{cC}	26,77^{bB}	28,48^{aB}
TBHQ	24,36^{cB}	25,68^{bD}	27,51^{aC}
Orégano	24,58^{cA}	26,16^{bC}	27,68^{aC}
Tomilho	23,84^{cD}	28,08^{bA}	28,81^{aA}
Mistura	24,32^{cBC}	25,35^{bE}	26,72^{aD}

Controle: óleo de soja; TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg.kg^{-1}); Orégano (3.000 mg.kg^{-1} de oleoresina); Tomilho (3.000 mg.kg^{-1} de oleoresina); Mistura (3.000 mg.kg^{-1} de cada oleoresina).
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).

Figura 9 – Médias de ácidos graxos monoinsaturados para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 180°C.

Os valores obtidos para os teores dos ácidos graxos poliinsaturados, Figura 10, nos tratamentos e nas condições estudadas, apresentaram gradual diminuição da concentração com o aumento do tempo de aquecimento. Fato esperado, uma vez que estas substâncias são termoxidadas na presença principalmente de altas temperaturas e oxigênio atmosférico (MACHADO; GARCIA; ABRANTES, 2008). Entretanto, ao analisar cada tempo de aquecimento, observa-se que nos tempos de 15 e 30 horas de aquecimento o tratamento com a mistura das oleoresinas proporcionou uma menor queda dos ácidos graxos poliinsaturados.

A queda dos ácidos graxos poliinsaturados após 30 horas de aquecimento foi inversamente proporcional ao aumento de ácidos graxos saturados. A perda de ácidos graxos poliinsaturados apresenta-se na seguinte ordem: Controle > Tomilho > TBHQ > Orégano > Mistura.



Controle	58,30^{aBC}	52,29^{bC}	45,68^{cD}
TBHQ	58,04^{aC}	54,05^{bB}	47,35^{cC}
Orégano	57,75^{aD}	53,98^{bB}	49,13^{cB}
Tomilho	58,59^{aA}	51,58^{bD}	45,65^{cD}
Mistura	58,52^{aAB}	54,76^{bA}	50,03^{cA}

Controle: óleo de soja; TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg.kg-1); Orégano (3.000 mg.kg-1 de oleoresina); Tomilho (3.000 mg.kg-1 de oleoresina); Mistura (3.000 mg.kg-1 de cada oleoresina).
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).

Figura 10 – Médias de ácidos graxos poliinsaturados para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 180°C.

3.10. Conclusões

Em elevada temperatura, as oleoresinas de orégano e tomilho aplicadas de forma isolada apresentaram um poder antioxidante maior que o antioxidante TBHQ, através da redução na formação de compostos oxidativos, indicando que a adição de 3.000 mg.kg^{-1} garantiu proteção oxidativa melhor que o antioxidante sintético. Entretanto, o aumento da concentração das oleoresinas, provocado pela mistura das mesmas e possível sinergismo, promoveu menor formação de compostos polares, assim como menor formação proporcional de ácidos graxos saturados.

3.11. Referências bibliográficas

BANDONIENÉ, D. et al. Antioxidative activity of sage (*Salvia officinalis* L.), savory (*Satureja hortensis* L.) and borage (*Borago officinalis* L.) extracts in rapeseed oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 104, n. 5, p. 286-292, 2002.

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

CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. **Food Chemistry**, London, v. 93, n. 2, p. 223-226, 2005.

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.

DORMAN, H. J. D. et al. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected *Lamiaceae* species grown in Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 52, n. 4, p. 762-770, 2004.

FIRESTONE, D. Worldwide regulation of frying fats and oils. **Inform**, Boulder, v. 4, n. 12, p. 1366-1371, 1993.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fat acids methil esters. **Laboratory and Practy**, London, v. 22, n. 5, p. 475-476, 1973.

KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Oreganum vulgare* L*).* **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 53, n. 6, p. 519-524, 1989.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Ação antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja sob termoxidação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 1, p. 58-63, 2009.

MACHADO, E. R.; GARCIA, M. D. C.; ABRANTES, S. M. P. Alterações dos óleos de palma e de soja em fritura descontínua de batatas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 786-792, 2008.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: antioxidantes naturais da família *Lamiacea*. Aplicação em produtos alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.

MARINOVA, E. M.; YANISHILIEVA, N. V. Antioxidant activity and mechanisms of action of some phenolic acids at ambient and high temperatures. **Food Chemistry**, London, v. 81, n. 2, p. 189-197, 2003.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various *in vitro* models. **Food Chemistry**, London, v. 94, n. 4, p. 520-528, 2006.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant e.ect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. hirtum). **Food Chemistry**, London, v. 71, n. 1, p. 79-83, 2000.

NAKATANI, N.; KIKUZAKI, H. A new antioxidative glucoside isolated from oregano (*Oreganum vulgare* L*).* **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 51, n. 10, p. 2727-2732, 1987.

NAKATANI, N. Natural antioxidants from spices. In: HUANG, M. T.; HO, C. T; LEE, C. Y. (Eds) **Phenolic compounds in foods and their effect on health.** II. Antioxidants and cancer prevention. ACS PRESS: Washington, 1992, p. 72-86.

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

POKORNY, J. Are natural antioxidants better – and safer – than synthetic antioxidants? **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 108, n. 6, p. 629-642, 2007.

ROMERO, N. et al. Effect of α-tocopherol and α-tocotrienol on the performance of chilean hazelnut oil (*Gevuina avellana* Mol) at high temperature. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 84, n. 9, p. 943-948, 2004.

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

STELL, C. J.; DOBARGANES, M. C.; BARRERA-ARELLANO, D. Formation of polymerization compounds during thermal oxidation of cottonseed oil, partially hydrogenated cottonseed oil and their blends. **Grasas y Aceites**, Sevilla, v. 57, n. 3, p. 284-291, 2006.

SHIBATA, M. A. et al. Enhancing effect of concomitant L-ascorbic acid administration on BHA induced forestomach carcinogenesis in rats. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 275-280, 1993.

VEKIAKI, S. A. et al. Oregano flavonoids as lipid antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 70, n. 5, p. 483-487,1993.

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

3.12. Anexos

Anexo E – Análise de variância para compostos polares totais (CPT).

Causas de Variação	G.L.	Quadrado Médio
		CPT
Tratamentos	4	491,0187**
Tempos de aquecimento	6	1.015,5822**
Tratamentos x Tempos	24	54,3995**
Resíduo	35	1,2003
Desvio Padrão		1,0956
Coef. de Variação (%)		6,96

** Significativo (P < 0,01).

Anexo F – Análise de variância para ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos monoinsaturados (AGM) e ácidos graxos poliinsaturados (AGP).

Causas de Variação	G.L.	Quadrado Médio		
		AGS	AGM	AGP
Tratamentos	4	2,1089**	1,8491**	6,6218**
Tempos de aquecimento	2	43,9138**	32,7170**	285,2357**
Tratamentos x Tempos	8	2,0972**	0,9939**	2,5437**
Resíduo	15	0,0051	0,048	0,0073
Desvio Padrão		0,0711	0,0691	0,0853
Coef. de Variação (%)		0,39	0,26	0,16

** Significativo (P < 0,01).

CAPÍTULO 4 – Ensaio III

Atividade antioxidante das oleoresinas de orégano (*Origanum vulgar* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) em óleo de soja sob estocagem

Resumo

A inibição do processo de oxidação é muito importante na indústria de óleos vegetais, a fim de reduzir perdas e aumentar a vida de prateleira. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antioxidante dos extratos de orégano e tomilho, aplicados de forma isolada e combinada, em óleo de soja, submetido ao teste acelerado em estufa (60ºC/10 dias). Foram submetidos ao teste o óleo de soja adicionado de 3.000 $mg.kg^{-1}$ das oleoresinas de orégano e tomilho e da mistura das mesmas (3.000 $mg.kg^{-1}$ de cada oleoresina), além de óleo de soja adicionado de TBHQ (50 $mg.kg^{-1}$) e óleo de soja sem adição de antioxidantes utilizado como controle. As amostras foram recolhidas a cada 2 dias e analisadas quanto ao índice de peróxidos e dienos conjugados. As oleoresinas isoladamente não conseguiram proteger o óleo na mesma proporção que o antioxidante sintético, mas a mistura das oleoresinas e conseqüente aumento da concentração foi tão eficiente quanto o antioxidante TBHQ.

Palavras-chave: orégano, tomilho, teste acelerado, óleo de soja.

4.1. Introdução

O consumo de alimentos processados aumentou muito nos últimos anos devido às necessidades impostas pela vida moderna. A temperatura e o tempo necessários para a produção de alimentos processados, além das condições de transporte e de armazenamento, são alguns dos fatores que podem contribuir para alterações químicas, muitas delas relacionadas à oxidação lipídica (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

Para atrasar ou inibir o desenvolvimento da reação oxidativa, os antioxidantes são empregados como aditivos alimentares. A inibição do processo de oxidação é muito importante na indústria alimentícia, como um meio de aumentar a vida de prateleira, reduzir o desperdício e as perdas nutricionais (KOSAR; GÖGER; CAN BASER, 2008).

Os antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados na indústria de alimentos para estes fins. No entanto, existem sérias preocupações sobre o potencial carcinogênico destas substâncias, e tem havido uma preocupação geral para a substituição de aditivos sintéticos, com alternativas naturais. Desta forma, investigações estão sendo realizadas na extração, caracterização e utilização de antioxidantes naturais, que podem servir como potentes candidatos na luta contra a oxidação (MATHEW, ABRAHAM, 2006).

Há um crescente interesse por estudos com ervas e especiarias pelas indústrias e grupos científicos devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas provenientes de várias substâncias, incluindo algumas vitaminas, flavonóides, terpenóides, carotenóides, fitoestrógenos e outros (CALUCCI et al., 2003). Experimentos com alimentos em diferentes extratos de plantas vêm contribuindo para o endosso que plantas oxidantes devem ser utilizadas em produtos alimentícios (SCHWARZ et al., 2001).

Um grande número de testes que aceleram a oxidação lipídica tem sido usado para analisar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras predizendo a conservação em condições normais de armazenamento (REGITANO-D'ARCE, 2006). No caso da avaliação da capacidade antioxidante de ervas e especiarias em sistemas lipídicos, os testes acelerados são de grande valia, já que tornam possível a comparação do desempenho de diferentes concentrações e extratos (POKORNY, 2001).

Recorrendo às condições padronizadas de oxidação acelerada (oxigenação

intensiva, tratamento térmico e/ou catálise metálica), os testes acelerados, permitem estimar de forma rápida a estabilidade oxidativa de uma matéria graxa ou a eficácia de um antioxidante, isolado ou em associação. Uma vez que os fenômenos naturais de oxidação são processos lentos, desenrolando-se freqüentemente ao longo de vários meses, os testes de estabilidade em tempo real tornam-se por vezes incompatíveis com o controle de qualidade a nível industrial (FRANKEL, 1993).

No teste acelerado em estufa, também conhecido como *Schaal Oven Test*, o óleo é submetido à temperatura de 60 a 65ºC, na ausência de alimento, por um determinado período de tempo, com a finalidade de se conhecer a sua vida de prateleira (ANTONIASSI, 2001). Os resultados fornecidos por este teste apresentam uma boa correlação com a avaliação efetuada nas condições normais de armazenamento. Estudos relatam que um dia de armazenamento sob as condições do teste acelerado em estufa é equivalente a um mês de armazenamento em temperatura ambiente (FRANKEL, 1993; MALCONSON et al.,1994).

Durante a oxidação lipídica, alterações primárias podem ser detectadas por perda de ácidos graxos insaturados, ganho de peso por incorporação de oxigênio ou pela formação de hidroperóxidos e dienos conjugados (MOURE et al., 2001).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antioxidante dos extratos de orégano e tomilho, aplicados de forma isolada e combinada, em óleo de soja, submetido ao teste acelerado em estufa.

4.2. Material e métodos

4.2.1. Material

Foram utilizados extratos das especiarias orégano (*Oreganum vulgare L.*) e tomilho (*Thymus vulgaris L.*) na forma de oleoresinas, fornecidas pela Kalsec®; antioxidante sintético terc-butilhidroquinona (TBHQ), cedidos pela empresa Danisco S/A e óleo de soja refinado (isento de antioxidantes sintéticos e ácido cítrico), fornecido pela empresa Granol Ind. Com. e Exp S/A, Bebedouro-SP.

4.2.2. Procedimento experimental

Foram submetidos ao teste acelerado em estufa cinco tratamentos, conduzidos em duas repetições:

- Óleo de soja sem adição de antioxidantes sintéticos;
- Óleo de soja com adição de 50 $mg.kg^{-1}$ de TBHQ;

- Óleo de soja com adição de 3.000 $mg.kg^{-1}$ da oleoresina de orégano;
- Óleo de soja com adição de 3.000 $mg.kg^{-1}$ da oleoresina de tomilho;
- Óleo de soja, com adição da mistura das oleoresinas (3.000 $mg.kg^{-1}$ de cada).

Os tratamentos foram conduzidos em estufa aquecida, utilizando-se béqueres de 50 mL contendo 40 mL de amostra com relação superfície/volume 0,4 cm^{-1}. A temperatura utilizada foi de 60 ± 5ºC. O aquecimento foi conduzido de modo contínuo por 10 dias, cujas amostras foram tomadas nos intervalos de tempo 0, 2, 4, 6, 8 e 10 dias.

Todas as amostras dos diferentes intervalos de tempo foram recolhidas em frasco âmbar, inertizadas com nitrogênio gasoso e armazenadas à temperatura de aproximadamente -18ºC até o momento das análises.

4.2.3. Métodos

A evolução da oxidação nas amostras foi analisada por meio de índice de peróxidos e dienos conjugados.

O índice de peróxidos foi determinado segundo a norma da AOCS Cd 8-53 (1993), em titulador potenciométrico, modelo 794 Basic Titrino, Metrohm. 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.

Para determinação de dienos conjugados foi utilizado o método AOCS Ti 1a-64 (1993), em especfotômetro, modelo UV mini 1240, Shimadzu. Este método determina dienos conjugados, presentes na matéria graxa, expressos como porcentagem de ácidos dienóicos conjugados, após a leitura da absorbância a 233 nm. O óleo foi diluído em iso-octano (2,2,4-trimetilpentano), de forma que a leitura de absorbância estivesse entre 0,2 e 0,8.

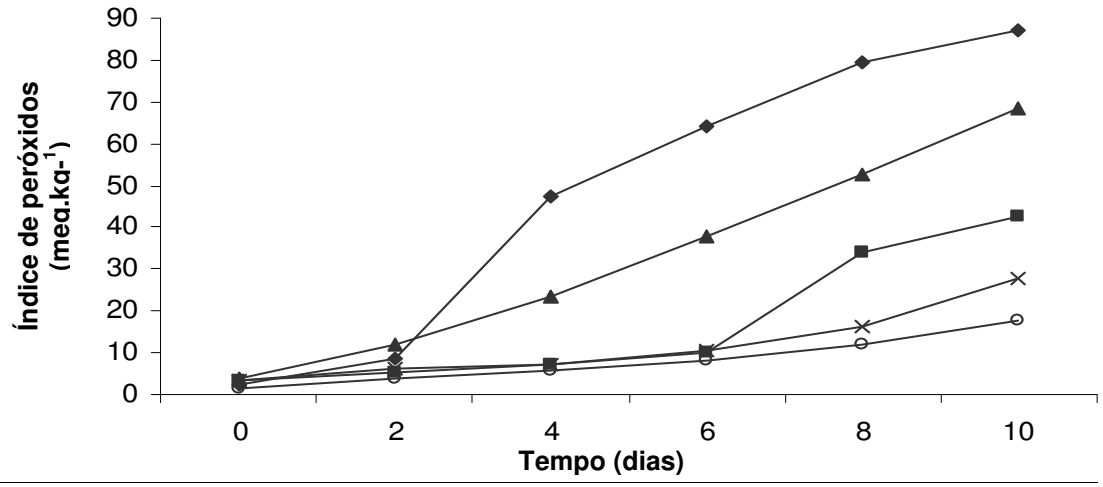
4.2.4. Análise estatística

Os resultados obtidos das medidas analíticas, em duplicata, foram submetidos às análises de variância, no delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 5 x 6 (BANZATTO; KRONKA, 2006). As análises de variância e testes de Tukey para as médias a 5% foram obtidas através do programa ESTAT - Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0, 1999, Brasil.

4.3. Resultados e discussão

Com a quantificação de hidroperóxidos formados durante o período de estocagem, é possível conhecer o efeito dos antioxidantes sobre a estabilidade do óleo. O índice de peróxidos é utilizado para quantificar os hidroperóxidos formados; contudo, vale ressaltar que estes são produtos intermediários na formação de carbonilas e hidrocompostos.

O Anexo G apresenta a análise de variância para a determinação de índice de peróxidos. Como observado, o teste F foi significativo ($P < 0,01$) para a interação Tratamentos x Tempos de estocagem. Dessa forma, procedeu-se ao desdobramento dessa interação, cujos resultados encontram-se na Figura 11.



	0	2	4	6	8	10
Controle	2,36^{eA}	8,67^{eAB}	47,52^{dA}	63,95^{cA}	79,34^{bA}	87,35^{aA}
TBHQ	1,57^{cA}	3,64^{cB}	5,71^{bcC}	8,04^{bcC}	11,77^{abD}	17,64^{aE}
Orégano	3,33^{cA}	5,09^{cAB}	7,17^{cC}	10,18^{bC}	34,14^{bC}	42,66^{aC}
Tomilho	3,97^{fA}	11,97^{eA}	23,43^{dB}	37,88^{cB}	52,83^{bB}	68,39^{aB}
Mistura	3,55^{cA}	6,45^{cAB}	7,40^{cC}	10,38^{bcC}	16,04^{bC}	27,94^{aD}

Controle: óleo de soja; TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg.kg^{-1}); Orégano (3.000 mg.kg^{-1} de oleoresina); Tomilho (3.000 mg.kg^{-1} de oleoresina); Mistura (3.000 mg.kg^{-1} de cada oleoresina).
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 ($P > 0,05$).

Figura 11 – Médias de índice de peróxidos para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 60°C.

De acordo com a Figura 11, observa-se aumento nos valores de peróxidos em todos os tratamentos durante o aquecimento na estufa, o que era esperado pelo desenvolvimento de produtos primários da oxidação lipídica. Porém, nas amostras de óleo de soja adicionadas do antioxidante TBHQ, observa-se um aumento menos

proeminente ao longo dos tempos de aquecimento.

Em relação aos tratamentos dentro de cada tempo de aquecimento, observa-se que no tempo inicial os tratamentos não diferiram significativamente e nos tempos finais, 8 e 10 dias, o antioxidante TBHQ apresentou maior efeito protetor com relação à formação de peróxidos. O tratamento com oleoresina de orégano apresentou diferença significativa quando comparado com a oleoresina de tomilho, exceto nos tempos iniciais. A mistura apresentou efeito protetor semelhante ao TBHQ, até 6 dias de estocagem. Após este período diferiu significativamente dos demais tratamentos, e no final do período de aquecimento proporcionou a segunda maior proteção ao óleo.

Com relação à eficiência contra a formação dos compostos primários de oxidação no final do período de estocagem em estufa, pode-se classificar os tratamentos da seguinte maneira: TBHQ > mistura > orégano > tomilho > controle.

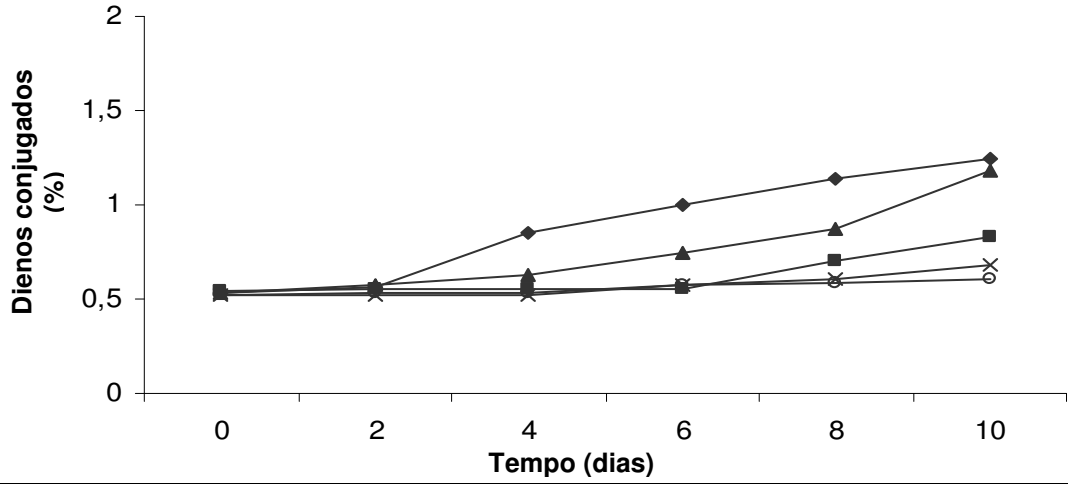
Resultados semelhantes foram encontrados por Almeida-Doria e Regitano-d'Arce (2000) ao estudarem a ação antioxidante de extratos etanólicos de alecrim e orégano em óleo de soja. Os extratos foram comparados com os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHA + BHT. Nos ensaios em estufa (63ºC), os valores de peróxidos do óleo de soja adicionado de TBHQ foram menores do que os das amostras adicionadas dos extratos de orégano (1.000 $mg.kg^{-1}$), de alecrim (500 $mg.kg^{-1}$) ou da mistura deles. Todos os tratamentos retardaram a oxidação do óleo, entretanto, os extratos naturais não atingiram a eficiência do TBHQ, mas foram tão efetivos quanto à mistura BHA + BHT.

Bandoniené et al. (2002) ao avaliarem diferentes oleoresinas aplicadas em óleo de colza, entre elas sálvia e segurelha, verificaram que os extratos reduziram a taxa de oxidação do óleo de colza nos testes de estufa (80℃/85 h) em termos de formação de peróxidos.

Angelo e Jorge (2008) ao estudarem o extrato de coentro (1.600 $mg.kg^{-1}$) em óleo de girassol, após 10 dias de aquecimento a 60ºC, encontraram valores maiores para o índice de peróxidos, média de 92,15 $meq.kg^{-1}$.

Com a formação de hidroperóxidos ocorre a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, principalmente linoléico e linolênico, com conseqüente formação de dienos conjugados. Essa estrutura conjugada absorve fortemente a luz ultravioleta no comprimento de onda entre 232 e 234 nm (KULAS; ACKMAN, 2001; WHEATLEY, 2000).

O Anexo G 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 estocagem. Os resultados do desdobramento dessa interação encontram-se na Figura 12.



	0	2	4	6	8	10
Controle	0,53^{eA}	0,56^{eA}	0,85^{dA}	1,00^{cA}	1,14^{bA}	1,24^{aA}
TBHQ	0,52^{bA}	0,53^{abA}	0,53^{abC}	0,57^{abC}	0,58^{abD}	0,61^{aC}
Orégano	0,54^{cA}	0,55^{cA}	0,55^{cC}	0,55^{cC}	0,70^{bC}	0,83^{aB}
Tomilho	0,53^{eA}	0,57^{deA}	0,63^{dB}	0,75^{cB}	0,87^{bB}	1,18^{aA}
Mistura	0,52^{cA}	0,52^{cA}	0,52^{cC}	0,57^{bcC}	0,61^{abD}	0,68^{aC}

Controle: óleo de soja; TBHQ: terc-butilhidroquinona (50 mg.kg^{-1}); Orégano (3.000 mg.kg^{-1} de oleoresina); Tomilho (3.000 mg.kg^{-1} de oleoresina); Mistura (3.000 mg.kg^{-1} de cada oleoresina).
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 ($P > 0,05$).

Figura 12 – Médias de dienos conjugados para interação Tratamentos x Tempos de aquecimento a 60°C.

Como observado na Figura 12, houve aumento gradual na formação de dienos conjugados ao longo do teste acelerado em estufa, de forma progressiva, do início ao fim do aquecimento, tanto para o controle, quanto para as oleoresinas.

No óleo de soja adicionado do antioxidante TBHQ, houve diferença significativa apenas entre o tempo inicial e final, demonstrando maior eficiência na proteção do óleo. Para a oleoresina de tomilho, o aumento na formação de dienos conjugados começou a ser notado a partir dos tempos de estocagem 2 e 4 dias, apresentando valores cada vez maiores no decorrer do aquecimento. Já, para a oleoresina de orégano e mistura, o aumento na formação de dienos conjugados no

óleo começou a ser detectado estatisticamente a partir de 8 dias de aquecimento.

Em cada tempo de estocagem, nota-se que não houve diferença estatística na formação de dienos conjugados entre os tratamentos estudados até o tempo de estocagem de 2 dias. A partir daí, observa-se que a aplicação do antioxidante sintético TBHQ e da mistura de oleoresinas foi mais efetiva entre os tratamentos testados e não houve diferença significativa entre si na proteção do óleo de soja estocado em estufa a 60ºC.

Ao final do processo, pode-se verificar que os tratamentos empregando antioxidantes demonstraram efeito antioxidante durante a estocagem, quando comparados ao controle, reduzindo a formação de dienos, com exceção da oleoresina de tomilho. O antioxidante TBHQ e a mistura de oleoresinas apresentaram maior redução de dienos conjugados, com 51 e 45%, respectivamente, quando comparados ao controle. Observa-se, ainda, que ao analisar as oleoresinas separadamente, a de orégano foi mais eficaz, com valor final 33% menor que o controle, já a oleoresina de tomilho apresentou uma redução de apenas 5% não diferindo estatisticamente do controle.

Com relação à atividade de outros antioxidantes naturais, Andreo e Jorge (2007) verificaram que o óleo de soja adicionado do antioxidante TBHQ (50 $mg.kg^{-1}$) apresentou redução de 65% na formação de dienos conjugados no tempo de aquecimento final (12 horas) e a mistura de TBHQ com extrato de gengibre (50 $mg.kg^{-1}$ + 2.500 $mg.kg^{-1}$) apresentou 67%.

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.

Extrato etanólico de manjericão 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).

4.4. Conclusões

Em baixa temperatura, como no teste acelerado em estufa, as oleoresinas isoladamente não conseguiram proteger o óleo na mesma proporção que o antioxidante sintético, mas a mistura das oleoresinas e conseqüente aumento da concentração, foi tão eficiente quanto o antioxidante TBHQ. Antioxidantes naturais

como a mistura das oleoresinas de orégano e tomilho podem ser uma alternativa para a preservação de óleos vegetais como o de soja.

4.5. Referências bibliográficas

ALMEIDA-DORIA, R. F.; REGITANO-D'ARCE, A. B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 197-203, 2000.

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. 1-5, 2008.

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

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

BANDONIENÉ, D. et al. Antioxidative activity of sage (*Salvia officinalis* L.), savory (*Satureja hortensis* L.) and borage (*Borago officinalis* L.) extracts in rapeseed oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 104, n. 5, p. 286-292, 2002.

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

CALUCCI, L. et al. Effects of γ-irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 4, p. 927-934, 2003.

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.

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. 129-135, 2007.

KOSAR, M.; GÖGER, F.; CAN BASER, K. H. In vitro antioxidant properties and phenolic composition of *Salvia virgata* Jacq. from Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 7, p. 2369-2374, 2008.

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.

MALCOLMSON, L. J. et al. Sensory stability of canola oil: present status of shelf life studies. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 71, n. 4, p. 435-440, 1994.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: antioxidantes naturais da família *Lamiacea*. Aplicação em produtos alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.

MATHEW, S.; ABRAHAM, T. E. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various *in vitro* models. **Food Chemistry**, London, v. 94, n. 4, p. 520-528, 2006.

MOURE, A. et al. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, London, v. 72, n. 2, p.145-171, 2001.

POKORNY, J. Natural antioxidant functionality during food processing. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. (Ed.). **Antioxidants in food:** practical applications. Cambridge: Woodhead Publishing, 2001. p. 331-372.

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

RUTH, S. M. V.; SHAKER, E. S.; MONRRISSEY, 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.

SCHWARZ, K. et al. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 212, n. 3, p. 319-328, 2001.

WHEATLEY, R. A. Some trends in the analytical chemistry of lipid peroxidation. **Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 19, n. 10, p. 617-628, 2000.

4.6. Anexos

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

Causas de Variação	G.L.	Quadrado Médio	
		IP	DC
Tratamentos	4	3.342,4079**	0,2405**
Tempos de estocagem	5	3.195,3066**	0,2140**
Tratamentos x Tempos	20	346,5888**	0,0296**
Resíduo	30	5,9529	0,0008
Desvio Padrão		2,4398	0,0284
Coef. de Variação (%)		10,31	4,20

** Significativo (P < 0,01).

CAPÍTULO 5 – Ensaio IV

Extratos de especiarias de orégano (*Origanum vulgar* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.): repercussões sobre o perfil lipídico *in vivo*

Resumo

Evidências científicas têm demonstrado que os alimentos contêm substâncias fisiologicamente ativas que atuam na promoção da saúde e prevenção de enfermidades. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antioxidante e hipolipemiante das oleoresinas de orégano e tomilho sob o perfil lipídico e a oxidação da fração LDL *in vivo.* Foram utilizados ratos *Wistar*, alimentados com dieta hipercolesterolêmica e suplementação das oleoresinas por gavagem (16 $mg.kg^{-1}$), durante 40 dias. Foram realizadas análises de perfil lipídico (colesterol total e frações, triglicérides) e oxidação da LDL. A administração das oleoresinas isoladamente reduziu significativamente os valores de colesterol total, quando comparados ao grupo que recebeu somente dieta hipercolesterolêmica. A suplementação com oleoresina de orégano foi a mais efetiva na diminuição do colesterol total e o teor da fração HDL foi em média de 17% maior que o teor da fração LDL. Neste estudo, a suplementação de oleoresinas não apresentou efeitos positivos em relação aos índices de triglicérides e auto-anticorpos contra LDL-ox. Os resultados são promissores quanto à futura utilização da suplementação da oleoresina de orégano (16 $mg.kg^{-1}$) no controle do metabolismo lipídico, podendo ser um coadjuvante na prevenção dos distúrbios cardiovasculares.

Palavras-chave: o*riganum vulgar* L., *thymus vulgaris* L., colesterol, suplementação, ratos.

5.1. Introdução

O controle do crescimento global acelerado das doenças cardiovasculares é um grande desafio. Para mudar esse quadro é necessário focar na redução dos fatores de risco, dentre eles a hipercolesterolemia que é considerada uma das principais causas (SALGADO; CURTE; MANSI, 2008).

Segundo diretrizes do Programa Nacional Americano de Educação em Colesterol, estima-se que para cada 1% de redução na concentração de colesterol sangüíneo, o risco de doenças cardiovasculares diminui em 2%. A terapia dietética é o primeiro passo para a diminuição do colesterol sangüíneo, que pode favorecer uma diminuição de 10 a 13% da lipoproteína de baixa densidade (LDL) de forma lenta. Logo, um suplemento à dieta que seja seguro e bem tolerado pode ser útil no manejo não farmacológico da hipercolesterolemia visando redução mais rápida do LDL (GRUNDY et al., 1993; MAKI et al., 2001).

Embora seja amplamente documentada a relação positiva entre as dislipidemias e o desenvolvimento das doenças cardiovasculares e, particularmente, da aterosclerose estudos têm demonstrado que além das alterações no perfil lipídico, as modificações oxidativas das lipoproteínas são essenciais à iniciação e progressão da aterosclerose (HULTHE; FAGERBERG, 2002; TOSHIMA et al., 2000).

Entre as desordens metabólicas lipídicas, uma das hipóteses da resposta à injúria da aterosclerose propõe que o passo inicial na aterogênese é a disfunção endotelial induzida, em especial, pela exposição do endotélio vascular à LDL oxidada (LDL-ox) (XAVIER et al., 2004). Já, as lipoproteínas de alta densidade (HDL) têm um papel protetor contra o desenvolvimento da aterosclerose, impedindo a oxidação das LDL (OLIVEIRA et al., 2002).

Uma dieta rica em antioxidantes previne o estresse oxidativo e reduz a formação e absorção de peróxidos e seus produtos de decomposição (URSINI e SEVANIAN, 2002). Evidências científicas têm demonstrado que os alimentos contêm substâncias fisiologicamente ativas que são necessárias para a promoção da saúde e prevenção contra enfermidades. Portanto, os componentes da dieta são fundamentais na modulação do estresse oxidativo, determinando o papel da nutrição na modificação do risco de aterosclerose (STRINGHETA; VOLP; OLIVEIRA, 2008).

Dos vários produtos naturais que estão sendo estudados, as ervas e especiarias se destacam pela facilidade de incorporação aos alimentos e grande

atividade antioxidante já relatada (YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNY, 2006).

Segundo Cervato et al. (2000), extratos de orégano, tanto aquoso como metanólico têm um alto conteúdo de polifenóis e intensa propriedade antioxidante, atuando de forma eficaz na prevenção de todas as fases do processo oxidativo, desde a neutralização dos radicais livres, bloqueio de peroxidação catalisada pelo ferro e, finalmente, pela interrupção do radical lipídico na cadeia de reações.

Assim como no orégano, os compostos fenólicos, timol e carvacrol, são os principais compostos dos extratos de tomilho. Pesquisas a partir do óleo essencial do tomilho destacam a inibição moderada de oxidação da LDL (20-27%) (LAMBERT et al., 2001; TEISSEDRE; WATERHOUSE, 2000).

Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antioxidante e hipolipemiante das oleoresinas de orégano e tomilho sob o perfil lipídico e a oxidação da fração LDL *in vivo.*

5.2. Material e métodos

5.2.1. Ensaio biológico

O projeto foi submetido à Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Universidade de Estadual Paulista – Campus de Botucatu, conforme consta no parecer do memorando nº 21/07-CEEA (Anexo I).

Foram utilizados 40 ratos machos da linhagem *Wistar*, com 30 dias de vida, provenientes do Biotério do Centro Universitário de Rio Preto – UNIRP. Os animais permaneceram em gaiolas coletivas de polipropileno em ambiente com temperatura controlada de 23 ± 2ºC, ciclo claro/escuro de 12 horas e água e dieta *ad libitum*. Foram alimentados por um período de 40 dias, incluindo o tempo de adaptação de 5 dias. As dietas experimentais foram preparadas pela Empresa Pragsoluções Biociências de acordo com a dieta padrão para roedores, *American Institute of Nutrition* – AIN-93G (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) e peletizadas (Tabela 8).

Foram constituídos 5 grupos, com 8 animais cada um, distribuídos ao acaso, que receberam os seguintes tratamentos: Grupo 1 – dieta padrão; Grupo 2 – dieta hipercolesterolêmica; Grupo 3 – dieta hipercolesterolêmica e suplementação da oleoresina de orégano (16 $mg.kg^{-1}$ de peso); Grupo 4 – dieta hipercolesterolêmica e suplementação de oleoresina de tomilho (16 $mg.kg^{-1}$ de peso) e Grupo 5 – dieta hipercolesterolêmica e suplementação da mistura das oleoresinas (16 $mg.kg^{-1}$ de cada oleoresina).

Tabela 8 – Composição das dietas utilizadas no ensaio biológico (%).

Ingredientes	Dieta padrão (AIN-93G)	Dieta hipercolesterolêmica
Amido de milho	39,75	39,75
Caseína (Labsinth)	20,00	20,00
Amido dextrinizado	13,20	13,20
Sacarose	10,00	10,00
Óleo de soja	7,00	1,00
Banha de porco	-	5,00
Colesterol (Sigma)	-	1,00
Celulose microcristalina	5,00	5,00
Mix mineral	3,50	3,50
Mix vitaminas	1,00	1,00
L-cistina	0,30	0,30
Bitartarato de colina	0,25	0,25
Butil-hidroxitolueno	0,0014	0,0014

As oleoresinas foram diluídas no óleo de soja sem adição de antioxidantes sintéticos. A partir do período de adaptação a gavagem foi realizada diariamente, em todos os grupos, visto que é um processo gerador de estresse. Os grupos 1 e 2 foram suplementados com óleo de soja, de forma a manter a mesma ingestão energética entre os grupos. A ingestão e o peso dos animais foram monitorados diariamente durante todo o ensaio para obter o parâmetro do cálculo das oleoresinas administradas e para análise da curva de ganho de peso e da eficácia alimentar da dieta (ganho de peso/consumo da dieta). A média foi utilizada como medida da tendência central de cada grupo.

Após o ensaio e jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados com éter etílico, por via inalatória e, por punção cardíaca, foram colhidas as amostras de sangue para as análises do perfil lipídico sobre os níveis de colesterol total, frações (HDL, LDL e VLDL), triglicérides e oxidação da LDL.

5.2.2. Análises *in vivo*

As dosagens sorológicas para determinação do perfil lipídico, teor de colesterol total, fração HDL e triglicérides foram realizadas utilizando kits enzimáticos da Katal Biotecnológica. A fração LDL foi determinada segundo a fórmula de Friedewald; Levy; Fredrickson (1972), considerando-se:

$$VLDL\text{-}c = \frac{Triglicérides}{5}$$

$$LDL\text{-}c = Colesterol\ total - (VLDL\text{-}c + HDL\text{-}c)$$

A oxidação da LDL foi determinada pelo método de ensaio imunoenzimático de fase sólida indireta (ELISA), através da determinação de auto-anticorpos contra LDL oxidada (LDL-ox). Para tanto foi necessário o isolamento da lipoproteína LDL.

A fração de LDL foi preparada por ultracentrifugação seqüencial (HAVEL; EDER; BRAGDON, 1955), utilizando-se 75 Ti rotor (Hitachi Centrifuge), a 4ºC, 100.000 x g. Inicialmente o plasma foi centrifugado durante 20 horas para obtenção da VLDL (densidade = 1,006 $g.mL^{-1}$). Após esse período, a densidade do infranadante foi acertada para 1,063 $g.mL^{-1}$ com adição de KBr e, em seguida, centrifugado durante 20 horas (100.000 x g, a 4ºC), para obtenção da LDL (densidade < 1,063 $g.mL^{-1}$). A LDL presente no sobrenadante foi retirada e dialisada *overnight*, em solução PBS – tampão fosfato (NaCl 0,9%, Na_2HPO_4 0,2%, NaOH 0,38% e EDTA 0,001% pH = 7,4) a 4ºC. Após este processo a LDL foi filtrada com filtro de 0,22 µm de diâmetro (Millipore). As proteínas foram quantificadas utilizando-se o Kit BCA (PIERCE) de acordo com as instruções do fabricante. A LDL foi obtida para a sensibilização de placas de 96 poços para detecção de auto-anticorpos para LDL-ox.

Para obtenção da LDL-ox, a LDL foi dialisada em PBS por 24 horas a 4°C, para retirada do EDTA. Em seguida, a LDL foi incubada com sulfato de cobre ($CuSO_4$) 20 µM, por 18 horas a 37ºC. Após este período, a oxidação foi bloqueada pela adição de EDTA 1 mM ao meio contendo LDL com cobre. Para avaliar o grau de oxidação da LDL foi realizada a dosagem de TBARS (PUHL et al., 1994), formada a partir da peroxidação lipídica da partícula. Foram incubados 50 µL de amostra com 200 µL de reagente de TBARS (ácido tiobarbitúrico 1%, ácido clorídrico 562,5 µmol e ácido tricloroacético 15%, para 100 mL de água bidestilada). A mistura foi colocada sob fervura, a 100ºC, por 15 min, centrifugada a 1000 x g por 10 min. O sobrenadante foi retirado e a leitura da absorbância foi medida utilizando-se filtro de 540 nm em um leitor de microplacas (GENIOS TECAN, AUSTRIA). Os resultados foram expressos baseando-se em uma curva padrão de MDA (Malondialdeído, TOP, Merck, Alemanha).

Para dosagem de auto-anticorpos contra LDL-ox foi utilizado o método

ELISA (FERNVIK et al., 2004). Placas de 96 poços (Costar, EUA) foram sensibilizadas com 50 µL, na concentração de 7,5 $\mu g.mL^{-1}$ de LDL-ox em tampão carbonato de sódio, 0,1 M, pH 9,4, durante 18 h, a 4ºC. Após 4 ciclos de lavagens com 100 µL de PBS, as placas foram bloqueadas com solução de gelatina a 1,0% (Gibco, EUA), em temperatura ambiente, por 24 horas. Em seqüência, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS e os poços receberam, em triplicata, 50 µL das amostras dos diferentes grupos, diluídas 1:400 em PBS. Após 2 horas de incubação, as placas foram lavadas 4 vezes com 100 µL de PBS-T e incubadas com 50 µL de conjugado com peroxidase, por 1 hora, em temperatura ambiente. Foi utilizado como conjugado IgG de cabra anti-IgG rato marcada com peroxidase (KLP, EUA) na diluição 1:100. Posteriormente a mais 4 ciclos de lavagem, com PBS-T, o processo de revelação foi realizado com a adição, em cada poço, de 75 µL de solução de TMB (250 µL de 3,3'5,5'-tetrametilbenzidina 6,5% em DMSO, 12 mL de tampão citrato 0,1 M, pH 5,5 e 10 µL de H_2O_2). A reação foi interrompida com a adição de 25 µL de ácido sulfúrico 2 M (Merck, Alemanha). Os resultados foram obtidos por leitura espectrofotométrica a 450 nm em leitor ELISA (GENIOS TECAN, AUSTRIA). Para compensar a variação inter-placas foi utilizada como controle, IgG purificada de rato – 10 $mg.mL^{-1}$ – Pierce Protein Research Products) e PBS como solução branca. Os títulos de anticorpos foram expressos como Índice de Reatividade (IR) para cada amostra e calculados da seguinte maneira:

$$\text{Índice de Reatividade (IR)} = \left(\frac{a - b}{c - b}\right)$$

Onde:

a = absorbância da amostra a 450 nm;

b = absorbância do branco a 450 nm;

c = absorbância do controle a 450 nm.

5.2.3. Análise estatística

Os resultados do ensaio biológico (Colesterol total, HDL, LDL, triglicérides e da LDL-ox) foram submetidos às análises de variância, utilizando-se o delineamento em blocos casualizados, com 8 repetições (BANZATTO; KRONKA, 2006). As análises de variância e testes de Tukey para as médias a 5% foram obtidas através do programa ESTAT - Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0, 1999, Brasil.

5.3. Resultados e discussão

Segundo De Luca et al. (1996), a faixa de ingestão média de ração para ratos situa-se entre 12 a 15 g por dia. Observou-se nos cinco grupos estudados, uma quantidade média de ingestão de 11 g por dia, sendo, portanto, um pouco abaixo dos valores relatados na literatura.

O consumo total de ração entre os animais, durante os 40 dias de tratamento, variou de 410 a 471 g, entretanto, esta variação não foi suficiente para influenciar no ganho de peso animal. Os valores médios de ganho de peso corporal em função das diferentes dietas e suplementações utilizadas estão apresentados na Tabela 9, assim como o Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), obtido por meio da razão entre o ganho de peso do animal e o consumo da ração.

Tabela 9 – Valores médios de ganho de peso corporal e Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) dos animais em função das diferentes dietas e suplementações utilizadas.

Parâmetros	**Grupos**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Ganho de peso (g)	194^{a}	192^{a}	193^{a}	185^{a}	187^{a}
CEA	$0,47^{a}$	$0,43^{ab}$	$0,41^{b}$	$0,42^{ab}$	$0,42^{ab}$

Grupo 1: dieta padrão; Grupo 2: dieta hipercolesterolêmica; Grupo 3: dieta hipercolesterolêmica + suplementação de oleoresina de orégano (16 $mg.kg^{-1}$); Grupo 4: dieta hipercolesterolêmica + suplementação de oleoresina de tomilho (16 $mg.kg^{-1}$); Grupo 5: dieta hipercolesterolêmica + suplementação da mistura das oleoresinas (16 $mg.kg^{-1}$ de cada). CEA: Coeficiente de Eficiência Alimentar.
a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Observa-se que o grupo 3, suplementado com oleoresina de orégano, apresentou um valor de CEA abaixo do grupo controle, entretanto, foi similar aos demais grupos. Esses dados dão indícios de que os compostos presentes nas oleoresinas não interferiram no aproveitamento dos nutrientes da ração e demonstraram que a suplementação permitiu o desenvolvimento e crescimento normais dos animais, excluindo a possibilidade de efeito antinutricional das oleoresinas.

O Anexo J apresenta a análise de variância, no delineamento em blocos casualizados, do perfil lipídico dos grupos estudados. Como observado em todas as análises houve diferença significativa ($P < 0,01$) apenas para os tratamentos. A Tabela 10 apresenta as médias dos parâmetros bioquímicos séricos dos animais em

função das diferentes dietas e suplementações utilizadas.

Tabela 10 – Valores médios dos parâmetros bioquímicos séricos dos animais em função das diferentes dietas e suplementações utilizadas.

Parâmetros bioquímicos (mg.dL^{-1})	**Grupos**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Colesterol total	65^{c}	104^{a}	67^{c}	80^{bc}	91^{ab}
HDL	23^{b}	24^{b}	30^{a}	25^{a}	31^{a}
LDL	35^{bc}	69^{a}	25^{c}	45^{b}	49^{b}
Triglicérides	35^{b}	59^{a}	62^{a}	52^{a}	53^{a}

Grupo 1: dieta padrão; Grupo 2: dieta hipercolesterolêmica; Grupo 3: dieta hipercolesterolêmica + suplementação de oleoresina de orégano (16 mg.kg-1); Grupo 4: dieta hipercolesterolêmica + suplementação de oleoresina de tomilho (16 mg.kg-1); Grupo 5: dieta hipercolesterolêmica + suplementação da mistura das oleoresinas (16 mg.kg-1 de cada).
a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05).

Ratos *Wistar* podem ser resistentes em desenvolver hipercolesterolemia e aterosclerose em razão, possivelmente, do aumento na conversão de colesterol em ácidos biliares no fígado (MACHADO et al., 2003). Esta resistência não foi confirmada neste estudo, onde observou-se um elevado aumento do colesterol total (60%) e da fração LDL (97%) com a ingestão de dietas hipercolesterolêmicas (grupo 2), em relação ao controle.

De acordo com a Tabela 10, a administração das oleoresinas isoladamente, grupos 3 e 4, reduziu significativamente os valores de colesterol total, quando comparados ao grupo 2, que recebeu somente dieta hipercolesterolêmica. A suplementação com oleoresina de orégano foi a mais efetiva na diminuição do colesterol, não diferindo-se do grupo 1 que recebeu dieta normocolestolêmica.

Observa-se, porém que a mistura das oleoresinas não foi efetiva na promoção da redução do colesterol total. Fato que pode estar relacionado com a alta dose de compostos bioativos suplementados, devido à combinação das concentrações das oleoresinas.

Ribeiro et al. (2008) destacam que grupos de animais que recebem elevadas concentrações de compostos bioativos como suplementação na dieta, podem ter efeito pró-oxidante, com aumento da peroxidação de lipídios no soro e potencialização do estresse oxidativo. Entretanto, a utilização de doses equivalentes ao nível de consumo humano usual pode ter efeito de proteção antioxidante.

Quanto às frações HDL-c observa-se que os grupos com suplementação de oleoresinas apresentaram maiores valores, diferindo-se dos grupos 1 e 2 de forma significativa. O grupo 3, suplementado com oleoresina de orégano, apresenta valor de HDL em média de 17% maior que o LDL. Já para os demais grupos suplementados com oleoresina esta relação é inversa, sendo o HDL menor que o LDL. Além disso, o índice aterogênico, obtido pela relação LDL/colesterol total (DE LA CRUZ et al., 2000), foi menor no grupo 3 (0,37), reforçando que a suplementação com oleoresina de orégano diminui o risco de doenças cardiovasculares (DCV), visto que o aumento da LDL tem um papel essencial na patogênese da aterosclerose. Para os demais grupos, os valores médios foram 0,54; 0,66, 0,56 e 0,54 para grupos 1, 2, 4 e 5 respectivamente.

Segundo Abdalla e Sena (2008), a aterosclerose é uma doença que envolve mecanismos complexos, dentre os quais, destacam-se a relação dos produtos gerados durante os processos de peroxidação lipídica como as alterações nas partículas de LDL.

As DCV representam uma relevante causa de mortalidade nas populações. As alterações causadoras de DCV ocorrem lentamente nos organismos e o estudo sobre compostos que diminuem o aparecimento de fatores de risco clássicos são de grande interesse. Os indicadores de risco para as DCV mais importantes são a elevação de LDL e a diminuição de HDL (AMAGANIJAN; BATLOUNI, 2000).

Rodrigues et al. (2003) encontraram valores semelhantes para a relação LDL/colesterol total para animais tratados com suplementação nutricional de antioxidantes (0,30), em estudo do efeito da flavonóide rutina em ratos *Wistar*.

Os resultados também são concordantes com os obtidos por Oliveira et al. (2002), cujos estudos obtiveram redução significativa de colesterol total e triglicérides, além das LDL, bem como aumento dos níveis de HDL no plasma de ratos hiperlipidêmicos induzidos por dieta, quando tratados com diferentes flavonóides.

Neste estudo, a suplementação de oleoresinas não apresentou efeitos positivos em relação aos índices de triglicérides, visto que os grupos 3, 4 e 5 que receberam suplementação não diferiram do grupo 2, permanecendo com os triglicérides acima do grupo 1, controle.

Na dosagem de auto-anticorpos por ELISA, a LDL oxidada pelo íon cobre é fixada nos microporos da placa, como forma de antígeno, onde os anticorpos, se

presentes na amostra, se ligarão especificamente. Os níveis de auto-anticorpos fornecem uma evidência indireta da importância da LDL-ox na doença cardiovascular (DUARTE; MORESCO; BEM, 2008).

O Anexo K apresenta a análise de variância, no delineamento em blocos casualizados, da determinação de auto-anticorpos contra LDL-ox. Como observado os tratamentos não foram significativos (P > 0,05). A Tabela 11 apresenta as médias do Índice de Reatividade (IR) para todos os grupos em função das diferentes dietas e suplementações utilizadas.

Tabela 11 – Valores médios da determinação de auto-anticorpos contra LDL-ox, expressos em Índice de Reatividade (IR), dos grupos em função das diferentes dietas e suplementações utilizadas.

Parâmetro bioquímico	**Grupos**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
LDL-ox	1,2665[a]	1,2175[a]	1,3605[a]	1,2459[a]	1,3419[a]

Grupo 1: dieta padrão; Grupo 2: dieta hipercolesterolêmica; Grupo 3: dieta hipercolesterolêmica + suplementação de oleoresina de orégano (16 mg.kg-1); Grupo 4: dieta hipercolesterolêmica + suplementação de oleoresina de tomilho (16 mg.kg-1); Grupo 5: dieta hipercolesterolêmica + suplementação da mistura das oleoresinas (16 mg.kg-1 de cada).
a, b... (linha): médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem pelo teste de Tukey (P > 0,05).

Os valores médios de auto-anticorpos contra LDL-ox não se diferenciarem significativamente entre si, entretanto, pode-se observar uma tendência de aumento dos auto-anticorpos contra LDL-ox para os grupos suplementados com a oleoresina de orégano.

A relação entre os níveis desses anticorpos e a doença arterial coronariana é inconsistente, alguns estudos demonstraram uma correlação positiva entre os níveis desses anticorpos e doença arterial coronariana (ERKKILA et al., 2000; SHERER et al., 2001), enquanto outros não demonstraram qualquer associação (LEINONEN et al., 1998). Apesar do papel plausível do estresse oxidativo na patogênese da aterosclerose, vários estudos prospectivos, controlados, não demonstraram uma redução da doença arterial coronariana com o uso de suplementos antioxidantes (VIRTAMO et al., 1998, YUSUF et al., 2000).

Oliveira et al. (2000) estudaram o efeito da vitamina E sobre os níveis de auto-anticorpos formados contra a LDL-ox em *hamsters* hiperlipidêmicos e, verificaram que os grupos alimentados com dieta hipercolesterolêmica apresentaram

um aumento de três vezes no colesterol sérico e de duas vezes nos triglicérides, em relação ao grupo controle, mas a suplementação da vitamina E não alterou os níveis de lipoproteínas séricas, porém, levou a uma menor formação de auto-anticorpos contra LDL-ox.

5.4. Conclusões

Na avaliação *in vivo*, os resultados são promissores quanto à futura utilização da suplementação da oleoresina de orégano (16 $mg.kg^{-1}$) no controle do metabolismo lipídico, principalmente na redução do colesterol total e aumento do HDL, podendo ser um coadjuvante na prevenção dos distúrbios cardiovasculares.

5.5. Referências bibliográficas

ABDALLA, D. S. P.; SENA, K. C. M. Biomarcadores de peroxidação lipídica na aterosclerose. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 21, n. 6, p. 749-756, 2008.

AMAGANIJAN, D.; BATLOUNI, M. Impacto dos fatores de risco tradicionais. **Revista da Socidade de Cardiolologia do Estado de São Paulo**, São Paulo, v. 10, n. 6, p. 686-693, 2000.

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

CERVATO, C. et al. Antioxidant properties of oregano [*Origanum vulgare*] leaf extracts. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 24, n. 6, p. 453-65, 2000.

DE LA CRUZ, J. et al. Lipid peroxidation, glutathione system in hyperlipidemic rabbits: influence of olive oil. **Biochimica et Biophysica Acta,** Amsterdam, v. 1485, n. 1, p. 36-44, 2000.

DE LUCA, R. R. et al. **Manual para técnicos em bioterismo**. 2. ed. São Paulo: Winner Graph, 1996. 259 p.

DUARTE, M.; MORESCO, R. N.; BEM, A. F. Metodologias para a determinação da LDL oxidada e sua aplicação como marcador de risco cardiovascular. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 2, p. 101-106, 2008.

ERKKILA, A. T. et al. Autoantibodies against oxidized low-density lipoprotein and cardiolipin in patients with coronary heart disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology**, Dallas, v. 20, n. 1, p. 204-209, 2000.

FERNVIK, E. C. et al. The autoantibody repertoire against copper or macrophage modified LDL differs in normolipidemic and hypercholesterolemic patients. **Journal of Clinical Immunology**, New York, v. 24, n. 2, p. 170-176, 2004.

FRIEDEWALD, W.; LEVY, R.; FREDRICKSON, D. Estimation of the concentration of lowdensity lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clinical Chemistry**, Washington, v. 18, n. 6, p. 499-502, 1972.

GRUNDY, S. M. et al. Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II) **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 269, n. 23, p. 3015-3023, 1993.

HAVEL, R. J.; EDER, H. A.; BRAGDON, J. H. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. **The Journal of Clinical Investigation**, Michigan, v. 34, n. 9, p. 1345-1353, 1955.

HULTHE, J.; FAGERBERG, B. Circulating oxidized LDL is associated with subclinical atherosclerosis development and inflammatory cytokines (AIR Study). **Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology**, Dallas, v. 22, n. 7, p. 1162-1167, 2002.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LEINONEN, J. S. et al. The level of autoantibodies against oxidized LDL is not associated with the presence of coronary heart disease or diabetic kidney disease in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Free Radical Research**, London, v. 29, n. 2, p.137-141, 1998.

MACHADO, D. F. et al. Efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico e no peso do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido cólico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 270-275, 2003.

MAKI, K. C. et al. Lipid responses to plant-sterol-enriched reduced-fat spreads incorporated into a National Cholesterol Education Program Step I diet. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 74, n. 1, p. 33-43, 2001.

OLIVEIRA, T. T. et al. Efeito de diferentes doses de flavonóides em ratos hiperlipidêmicos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 45-51, 2002.

OLIVEIRA, F. G. et al. Effect of vitamin E supplementation on antibody levels against malondialdehyde modified LDL in hyperlipidemic hamsters. **Cardiovascular Research**, London, v. 47, n. 3, p. 567-573, 2000.

PUHL, H. et al. Methods to determine oxidation of low-density lipoproteins. **Methods in Enzymology**, New York, v. 233, n. 1, p. 425-441, 1994.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C. AIN-93 purifeid diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 123, n. 11, p. 1939-1951, 1993.

RIBEIRO, S. M. R. et al. Efeitos pró e antioxidantes dose-dependente de compostos bioativos. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. (Org.) **Alimentos funcionais:** benéficos para a saúde. Viçosa: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. Ed., 2008, p. 235-260.

RODRIGUES, H. G. et al. Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 315-320, 2003.

SALGADO, J. M.; CURTE, F.; MANSI, D. N. Effect of gala apples (*Malus domestica* Borkh) on lipidemia of hyperlipidemic rats. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 477-484, 2008.

SHERER, Y. et al. Coronary artery disease but not coronary calcification is associated with elevated levels of cardiolipin, beta-2-glycoprotein-I, and oxidized LDL antibodies. **Cardiology**, Basel, v. 95, n. 1, p. 20-24, 2001.

STRINGHETA, P. C.; VOLP, A. C. P.; OLIVEIRA, T. T. Corantes naturais: usos e aplicações como compostos bioativos. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. (Org.) **Alimentos funcionais:** benéficos para a saúde. Viçosa: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. Ed., 2008, p. 103-138.

TEISSEDRE, P. L.; WATERHOUSE, A. L. Inhibition of oxidation of human low-density lipoproteins by phenolic substances in different essential oils varieties, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 9, p. 3801-3805, 2000.

TOSHIMA, S. et al. Circulation oxidized low density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis & Vascular Biology**, Dallas, v. 20, n. 10, p. 2243-2247, 2000.

URSINI, F.; SEVANIAN, A. Postprandial oxidative stress. **Biological Chemistry**, Berlim, v. 383, n. 3-4, p. 599-605, 2002.

VIRTAMO, J. et al. Effect of vitamin E and beta carotene on the incidence of primary nonfatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease. **Archives of Internal Medicine**, Chicago, v. 158, n. 6, p. 668-675, 1998.

XAVIER, H. T. et al. Efeitos da lipoproteína LDL-oxidada sobre a proliferação e a motilidade espontânea *in vitro* de células endoteliais de artérias coronárias humanas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, São Paulo, v. 83, n. 6, p. 488-492, 2004.

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

YUSUF, S. et al. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The heart outcomes prevention evaluation study investigators. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 342. n. 3, p. 154-160, 2000.

5.6. Anexos

Anexo I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa (Memorando nº 21/07-CEEA).

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Botucatu

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 21/07-CEEA, sobre "Extratos de especiarias: aplicações em óleo de soja e repercussões sobre o perfil lipídico in vivo", sob a responsabilidade de **NEUSA JORGE**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela ***COMISSÃO DE ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL*** (CEEA), em reunião de 27/04/2007.

Botucatu, 27 de abril de 2007.

Prof. Dr. MARCELO RAZERA BARUFFI
Presidente - CEEA

NADIA JOVÊNCIO COTRIM
Secretária – CEEA

Instituto de Biociências – CEEA – Comissão de Ética na Experimentação Animal
Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-000 Botucatu SP Brasil
Tel 14 3811 6013/6014 fax 14 3815 3744 e-mail: dta@ibb.unesp.br

Anexo J – Análise de variância para colesterol total (Col), fração HDL colesterol (HDL), fração LDL colesterol (LDL) e triglicérides (Trig).

Causas de Variação	G.L.	Quadrado Médio			
		Col	HDL	LDL	Trig
Blocos	7	194,4250^{NS}	16,7107^{NS}	192,3679^{NS}	69,4857^{NS}
Tratamentos	4	2.134,8500**	115,1625**	2.146,2125**	883,4750**
Resíduo	28	153,9071	7,7911	141,5554	107,0036
Desvio Padrão		12,4059	2,7911	11,8977	10,3443
Coef. de Variação (%)		15,24	10,50	26,72	19,78

** Significativo (P < 0,01).
^{NS} Não Significativo (P > 0,05).

Anexo K – Análise de variância para determinação de auto-anticorpos anti LDL-ox.

Causas de Variação	G.L.	Quadrado Médio
		LDL-ox
Blocos	7	0,0406*
Tratamentos	4	0,0307^{NS}
Resíduo	28	0,0151
Desvio Padrão		0,1229
Coef. de Variação (%)		9,55

** Significativo (P < 0,01).
^{NS} Não Significativo (P > 0,05).