



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Patricia Joho Hiromoto

Extrato de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como antioxidante
natural aplicado em óleo de soja

São José do Rio Preto
2018

Patricia Joho Hiromoto

Extrato de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como antioxidante
natural aplicado em óleo de soja

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

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

São José do Rio Preto
2018

H668e	Hiromoto, Patricia Joho Extrato de hibisco (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) como antioxidante natural aplicado em óleo de soja / Patricia Joho Hiromoto. -- São José do Rio Preto, 2018 78 f. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto Orientadora: Neuza Jorge 1. Tecnologia de alimentos. 2. Extratos naturais. 3. Antioxidantes. 4. Fenóis. 5. Óleo de soja. I. Título.
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Patricia Joho Hiromoto

Extrato de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como antioxidante
natural aplicado em óleo de soja

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Neuza Jorge
UNESP – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Débora Maria Moreno Luzia
UEMG – Frutal

Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Vieira
UFTM – Uberaba

São José do Rio Preto
12 de dezembro de 2018

Aos meus queridos pais, Tadashi
e Luiza, e ao meu irmão Marcelo,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meu caminho e me guiar nas escolhas corretas.

À orientadora Profa. Dra. Neuza Jorge, por todo apoio, atenção e contribuição neste trabalho.

Aos membros da banca, que aceitaram participar da banca e colaboraram com este trabalho.

Ao técnico, Luiz Camolezzi, por todo auxílio durante as análises e principalmente pelos melhores momentos no laboratório.

Aos meus pais, Tadashi e Luiza, que me apoiaram e fizeram com que tudo fosse possível e ao meu irmão Marcelo que me incentivou nos momentos mais difíceis.

Ao meu Bruno, por todo amor, paciência e todos os momentos que tornaram a minha vida mais feliz, e por todo incentivo.

Aos meus padrinhos, Francisco e Lucia, que estiveram ao meu lado em todos os momentos. E a Luciana, Tiago, Ana e Arthur, minha alegria dos finais de semana.

Aos meus avós, Pedro e Rosa, pela preocupação e amor que me concederam nesses anos todos.

A minha segunda família, Fernando, Liliana e Tânia, que me acolheram nos momentos que mais precisei, em especial aos meus afilhados Taís Fonseca e Lucas Nunes, vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui!

Ao meu grande amigo Wellington Umeda, que me deu todo apoio, incentivo e tornou essa etapa menos difícil.

À minha irmã, Haline Ogata, por todo carinho, conselho, ajuda e pela amizade.

Aos amigos Elisa Ribeiro e Tiago Polachini, que sempre me ajudaram, incentivaram e, mesmo longe, estiveram comigo.

À Mayara Martins por todos os conselhos, incentivos e principalmente pela amizade.

Aos colegas de laboratório, Fábio Miguel de Freitas, Kamila Carrilho, Larissa Rocha, Luciene Mendes, Maria Paula Fortuna, Tuany Nogueira, Renata Laurito, Geisa Simplício e Andresa Alves, pelas conversas, viagens, toda aprendizagem e companhia.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O interesse atual por antioxidantes naturais de fontes vegetais vem crescendo no Brasil, principalmente por antioxidantes bioativos. O hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) é rico em compostos bioativos, além de possuir propriedades antioxidantes e antimicrobianas. O cálice é a parte da planta mais utilizada, devido seu elevado teor de compostos fenólicos, e suas sementes são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, sendo consideradas como subproduto da indústria. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito antioxidante do extrato etanólico de hibisco na estabilidade oxidativa de óleo de soja sob estocagem acelerada em estufa. Os extratos etanólicos de cálices e sementes de hibisco foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos totais e à atividade antioxidante por meio dos métodos DPPH, FRAP e sistema β -caroteno/ácido linoleico. O extrato de cálices de hibisco apresentou maiores quantidades de compostos fenólicos totais (64,18 mg EAG/g) e atividade antioxidante (65%), portanto, foi adicionado no óleo de soja. Os tratamentos: OS (óleo de soja), Tocoferol (óleo de soja + 300 mg/kg de α -tocoferol), Extrato (óleo de soja + 300 mg/kg de compostos fenólicos de extrato) e Mistura (óleo de soja + 300 mg/kg de α -tocoferol + 300 mg/kg de compostos fenólicos de extrato) foram preparados e submetidos à estocagem acelerada em estufa a 60°C. As amostras foram analisadas em 0, 6 e 12 dias quanto ao índice de peróxidos, *p*-anisidina, valor total de oxidação, estabilidade oxidativa e teor de tocoferóis. Dentre os tratamentos, o Extrato promoveu maior eficiência na inibição da formação de compostos primários e secundários da oxidação lipídica, além de proporcionar maior estabilidade oxidativa e maior retenção de tocoferóis totais (96%) na estocagem. E ao final da estocagem, o Extrato também se mostrou eficaz na redução das alterações físico-químicas ocorridas no óleo de soja, superando o antioxidante natural α -tocoferol. Embora o óleo de hibisco não tenha demonstrado valores relevantes de fitosteróis, apresentou clorofila, vitamina E e tocoferóis totais.

Palavras-chave: antioxidantes, compostos fenólicos, α -tocoferol, estabilidade oxidativa.

ABSTRACT

*The current interest in natural antioxidants from vegetable sources has been increasing in Brazil especially regarding bioactive antioxidants. Bioactive compounds can be found in hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.), which is also rich in vitamins and minerals, and has important antioxidant and antimicrobial properties. The calyx of hibiscus is the most used part of the plant due to its high content of phenolic compounds, while its seeds are rich in polyunsaturated fatty acids and are considered a by-product of the industry. This study aims to evaluate the antioxidant effect of ethanolic hibiscus extract on the oxidative stability of soybean oil in accelerated storage test. The ethanolic extracts of calyces and hibiscus seeds were evaluated to determine the total phenolic compounds and their antioxidant activity using DPPH, FRAP and β -carotene/linoleic acid methods. Compared to the seed extract, the extract of hibiscus calyces presented a greater amount of phenolic compounds (64,18 mg EAG/g), as well as antioxidant activity (65%), so it was added in soybean oil. The treatments used were: OS (soybean oil), Tocopherol (soybean oil + 300 mg/kg of α -tocopherol), Extract (soybean oil + 300 mg/kg of phenolic compounds from the extract) and Misture (soybean oil + 300 mg/kg of α -tocopherol + 300 mg/kg of phenolic compounds from the extract) were prepared and subjected to accelerated storage in an oven at 60°C. The samples were analyzed on days 0, 6 and 12 to determine the content of peroxides, *p*-anisidine, total oxidation value, oxidative stability and tocopherols. Among the treatments, Extract was more efficient at inhibiting the formation of primary and secondary compounds from the lipid oxidation. It also provided higher oxidative stability and higher tocopherols retention (96%) during the storage. At the end of the storage, Extract was also efficient at reducing physical and chemical changes in the soybean oil, which surpassed the activity of the natural antioxidant α -tocopherol. Although the hibiscus oil did not present relevant quantity of phytosterols, it presented chlorophyll, vitamin E and total tocopherols.*

Keywords: antioxidants, phenolic compounds, α -tocopherol, oxidative stability.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Constituintes físico-químicos dos cálices e sementes de hibisco.....	30
Tabela 2	Quantificação das frações de compostos fenólicos no extrato de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	31
Tabela 3	Frações de fitosteróis em óleos de hibisco e milho.....	34
Tabela 4	Rendimento, umidade, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos de cálice e semente de hibisco.....	46
Tabela 5	Médias de índice de peróxidos, <i>p</i> -anisidina, valor Totox e estabilidade oxidativa para a interação tratamentos x tempos de estocagem a 60°C.....	51
Tabela 6	Médias de tocoferóis para a interação tratamentos x tempos de estocagem a 60°C.....	55
Tabela 7	Médias de ácidos graxos para o óleo de hibisco.....	58
Tabela 8	Médias de fitosteróis para o óleo de hibisco.....	60
Tabela 9	Médias de tocoferóis para o óleo de hibisco.....	60

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismo de ação da oxidação lipídica.....	19
Figura 2	Mecanismo de ação para os antioxidantes primários.....	22
Figura 3	Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos.....	24
Figura 4	Estrutura química dos tocoferóis.....	25
Figura 5	Fórmula estrutural dos ácidos clorogênicos.....	26
Figura 6	Hibisco: planta (a) e flor (b).....	28
Figura 7	Morfologia do hibisco: cálice (a), fruto (b) e semente (c).....	29
Figura 8	Cálices de hibisco.....	30
Figura 9	Sementes de hibisco.....	32
Figura 10	Exsicata do hibisco.....	35
Figura 11	Hibiscos secos: cálices (a) e sementes (b).....	36
Figura 12	Extrato de hibisco: cálices (a) e sementes de hibisco (b).....	37
Figura 13	Tratamentos: OS (a), Tocoferol (b), Extrato (c) e Mistura (d).....	39
Figura 14	Curva cinética da atividade antioxidante do extrato de cálices de hibisco para o sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	50
Figura 15	Curva cinética da atividade antioxidante do extrato de sementes de hibisco para o sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	50
Figura 16	Óleo de hibisco.....	57



LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Atividade antioxidante
AG	Ácido gálico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
b.u.	Base úmida
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
cm	Centímetro
DPPH	Radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAG	Equivalente de ácido gálico
EQ	Equivalente de quercetina
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GP	Galato de propila
h	Horas
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>
IA	Índice de <i>p</i> -anisidina
IP	Índice de peróxidos
kcal	Kilocaloria
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
m	Metro
mg	Miligrama
mm	Milímetro
m/v	Massa/volume
OS	Óleo de soja
R ²	Coeficiente de determinação
R [•]	Radical livre
RH	Ácido graxo insaturado

ROO [•]	Radical peróxido
ROOH	Hidroperóxido
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
Totox	Valor total de oxidação
TPTZ	2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo geral.....	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 Óleos e gorduras.....	17
3.1.1 Óleos vegetais.....	17
3.1.2 Oxidação lipídica.....	18
3.2 Teste acelerado em estufa.....	20
3.3 Antioxidantes.....	21
3.3.1 Mecanismo de ação.....	22
3.3.2 Antioxidantes sintéticos.....	23
3.3.3 Antioxidantes naturais.....	24
3.3.4 Sinergismo.....	26
3.4 Hibisco.....	28
3.4.1 Cálices.....	29
3.4.2 Sementes.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 Material.....	35
4.1.1 Hibisco.....	35
4.1.2 Extratos.....	36
4.1.3 Antioxidante natural.....	37
4.1.4 Óleo de soja.....	37
4.1.5 Óleo de hibisco.....	38
4.2 Teste acelerado em estufa.....	38
4.3 Métodos.....	39
4.3.1 Análises nos extratos.....	39
4.3.2 Análises nos óleos.....	42
4.4 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 Análises nos extratos.....	46

5.1.1 Rendimento.....	46
5.1.2 Umidade.....	47
5.1.3 Compostos fenólicos totais.....	47
5.1.4 Atividade antioxidante.....	48
5.2 Análises no óleo de soja.....	50
5.2.1 Índice de peróxidos.....	52
5.2.2 Índice de p-anisidina.....	52
5.2.3 Valor Totox.....	53
5.2.4 Estabilidade oxidativa.....	53
5.2.5 Perfil de tocoferóis.....	54
5.3 Análises no óleo de hibisco.....	56
5.3.1 Teor lipídico.....	56
5.3.2 Clorofila.....	57
5.3.3 Perfil de ácidos graxos.....	57
5.3.4 Perfil de fitosteróis.....	59
5.3.5 Perfil de tocoferóis.....	60
6 CONCLUSÕES.....	62
7 REFERÊNCIAS	63
APÊNDICES.....	75

1 INTRODUÇÃO

Os óleos e gorduras são compostos solúveis em solventes orgânicos, estando entre os principais componentes dos alimentos. São macronutrientes que desempenham funções energéticas, estruturais e hormonais no organismo. Dentre os óleos vegetais, o mais consumido no Brasil é o de soja em relação aos outros óleos comercializados.

Durante o processo de obtenção e armazenamento, os óleos sofrem o processo de degradação conhecido como oxidação lipídica. A oxidação lipídica é uma das principais causas da deterioração de óleos e gorduras e é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, modificando as características sensoriais, além de provocar alterações que irão afetar a qualidade nutricional devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, e também a integridade e segurança dos alimentos.

Com a finalidade de retardar a oxidação lipídica, a indústria de alimentos tem empregado o uso de aditivos alimentares como antioxidantes, que podem ser de origem sintética ou natural. Os antioxidantes sintéticos são os mais utilizados pelas indústrias, dentre eles estão: butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (GP). Porém, o uso contínuo desses antioxidantes pode provocar efeitos tóxicos e carcinogênicos ao organismo.

Dessa forma, pesquisas buscam extrair antioxidantes naturais de fontes vegetais para que sejam eficientes na estabilidade oxidativa e possibilitem a substituição do uso de antioxidantes sintéticos por naturais. Os antioxidantes naturais estão presentes em vegetais, sendo as principais fontes os óleos vegetais, sementes oleaginosas e especiarias. Dentre os principais antioxidantes naturais estão os tocoferóis, carotenoides e ácidos orgânicos. Os tocoferóis são os antioxidantes naturais mais estudados e aplicados em alimentos a fim de prevenir alterações oxidativas, sendo o α -tocoferol, o mais biologicamente ativo no organismo.

O hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) também conhecido popularmente como vinagreira, Roselle, azedinha, groselheira, é uma espécie vegetal pertencente à família *Malvaceae* e cultivada em regiões tropicais e subtropicais. Rica em compostos bioativos, vitaminas e minerais tem poder antioxidante, diurético e

antimicrobiano. É utilizado em diferentes preparações culinárias como chás, vinhos, geleias, sorvetes e sucos.

As partes da planta mais utilizadas são as folhas e os cálices, caracterizadas por uma coloração avermelhada e um sabor adstringente, o que chama a atenção das indústrias farmacêutica e alimentícia. Os cálices de hibisco apresentam elevado teor de compostos fenólicos, ácidos orgânicos, vitamina C e antocianinas. As sementes são ricas em ácidos graxos poli-insaturados e fitosteróis, sendo consideradas como subproduto da indústria.

As sementes oleaginosas são importantes componentes da agricultura tradicional. Nutricionalmente, os óleos obtidos a partir destas sementes fornecem calorias, proteínas, vitaminas e ácidos graxos essenciais na dieta, sendo facilmente digeridos e possuem um custo relativamente baixo. Pensando na economia, já que muitas vezes essas sementes são descartadas pela indústria, o óleo de sementes de hibisco pode ser usado como ingrediente para consumo na culinária.

Sendo assim, tendo em vista o alto consumo de óleo de soja no Brasil, utilizado principalmente em preparações culinárias, a importância em conservar suas propriedades bioativas e a tendência em se utilizar antioxidantes naturais, além das propriedades funcionais do hibisco, faz-se necessário o estudo do potencial antioxidante do extrato de hibisco adicionado em óleo de soja sob estocagem acelerada.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito antioxidante do extrato etanólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) na estabilidade oxidativa de óleo de soja sob estocagem acelerada em estufa.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar os teores de compostos fenólicos totais nos extratos etanólicos de cálices e sementes de hibisco.
- Avaliar o efeito antioxidante dos extratos etanólicos de cálices e sementes de hibisco pelos métodos do sequestro de radicais livres DPPH, FRAP e sistema β -caroteno/ácido linoleico.
- Analisar o óleo de soja adicionado de extrato por meio das medidas dos índices de peróxidos, *p*-anisidina, valor total de oxidação, estabilidade oxidativa e teor de tocoferóis durante estocagem acelerada em estufa a 60°C por 12 dias.
- Caracterizar os compostos bioativos do óleo extraído das sementes de hibisco.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Óleos e gorduras

Os lipídios são macronutrientes que desempenham funções energéticas, estruturais e hormonais no organismo. Além de funções tecnológicas, atuam como emulsificantes, texturizantes, umectantes e aromatizantes na indústria de alimentos (KANNER, 1994).

Apresentam importante função nutricional já que são importantes fontes de energia, cada grama de lipídio corresponde a 9 kcal, atuam como carreadores de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e são fontes de ácidos graxos essenciais como os ácidos linoleico e α -linolênico. Contribuem ainda para as características sensoriais dos alimentos, como sabor, cor, odor e textura, além de atuar como meio de transferência de calor em processos de aquecimento, promovendo qualidade e características desejáveis (BOCKISCH, 1998).

Óleos e gorduras são os principais constituintes dos lipídios e são caracterizados como insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Se diferenciam de acordo com o estado físico em que se encontram à temperatura ambiente, os óleos são líquidos e as gorduras, sólidas (LAWSON, 1995).

São constituídos majoritariamente por triacilgliceróis, compostos formados pela esterificação de uma molécula de glicerol com três moléculas de ácido graxo. Dentre os componentes minoritários estão os fosfolipídeos, glicolipídeos, esteróis, carotenoides, tocoferóis, tocotrienóis e esqualeno. As reações de hidrólise ocasionam o rompimento das ligações éster formando mono, diacilgliceróis e ácidos graxos livres (SEVANI; HOCHSTEIN, 1985).

3.1.1 Óleos vegetais

Os óleos vegetais possuem altas concentrações de tocoferóis e são consumidos pela população, constituindo-se nos alimentos como maior contribuição pela ingestão de vitamina E (TAGHVAEI; JAFARI, 2015).

No Brasil, os óleos vegetais mais consumidos são: soja, milho, amendoim, algodão, babaçu e palma. Cerca de 80% da produção dos óleos vegetais são

aplicados na indústria de alimentos e os 20% restantes são destinados para aplicações industriais na produção de detergentes, cosméticos, lubrificantes, tintas, vernizes e plásticos (TRINDADE et al., 2015).

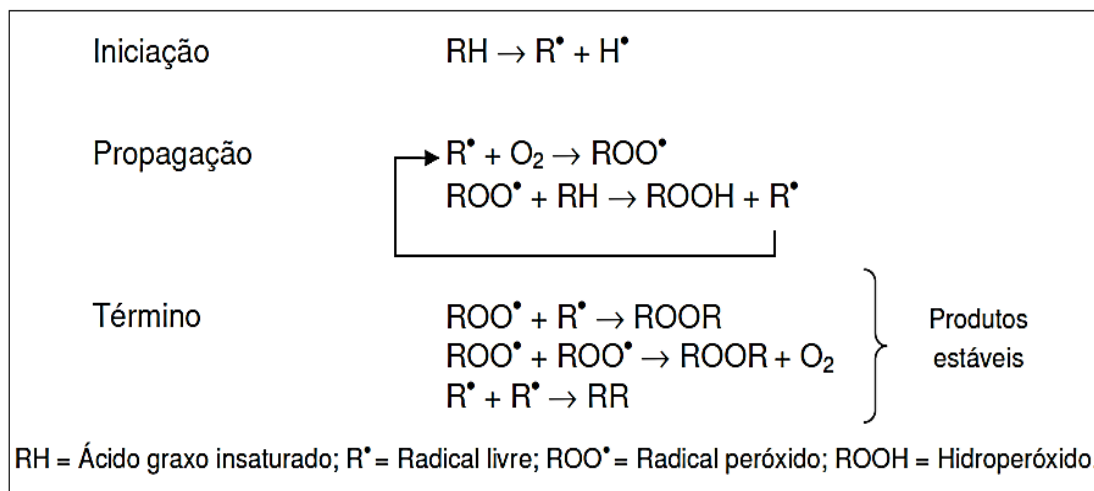
O Brasil é o segundo maior produtor de soja no mundo, sendo que a produção da safra de 2016/2017 foi de 114 milhões de toneladas, ficando atrás apenas para os Estados Unidos com produção de 117 milhões de toneladas. (CONAB, 2017). Segundo a ABIOVE (2018), a produção de óleo de soja no Brasil em 2018 foi de 8.650 toneladas com consumo doméstico de 7.600 toneladas.

O óleo de soja é composto de ácidos graxos insaturados que representam 85% do total de lipídios e aproximadamente 60% destes são constituídos pelos ácidos graxos essenciais, como linoleico e linolênico. Dentre os compostos minoritários do óleo de soja, estão os tocoferóis que despertam grande interesse devido a seu caráter vitamínico e a sua atividade antioxidante (JIANG, 2014). O óleo de soja, devido ao grande consumo em nível mundial, é o principal contribuinte para a ingestão de vitamina E pela população (GUINAZI et al., 2009).

O conteúdo de tocoferóis em óleos vegetais está diretamente relacionado com o tipo de processamento aplicado e ao armazenamento, de acordo com as formas de estocagem, exposição à luz, oxigênio, temperatura e dentre outros fatores (CICHON, 2002; JIANG, 2014).

3.1.2 Oxidação lipídica

A oxidação lipídica é a principal reação de deterioração durante o processamento e armazenamento dos alimentos. É responsável pelo desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis, o que torna os alimentos impróprios para consumo (ANGELO, 1996). Além disso, pode provocar outras alterações que poderão afetar a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais e também pode alterar a integridade e segurança dos alimentos, já que ocorre a formação de compostos secundários tóxicos (LAWSON, 1995). A Figura 1 mostra o mecanismo de ação da oxidação lipídica que envolve três estágios: iniciação, propagação e término.

Figura 1 – Mecanismo de ação da oxidação lipídica.

Fonte: adaptada de Ramalho e Jorge (2006).

A deterioração dos ácidos graxos é iniciada com a primeira fase da autoxidação que é caracterizada pela formação de radicais livres ($R^{\bullet}$). A presença de catalisadores, tais como luz visível, radiação ultravioleta, metais ou metaloproteínas quebra o ácido graxo insaturado liberando radicais livres e hidrogênio tornando a molécula altamente reativa e capaz de reagir com qualquer composto situado próximo a sua órbita externa, apresentando uma função oxidante ou redutora de elétrons (SIMIC, 1981).

Os radicais livres formados são susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico (O_2), originando o radical peroxila ($ROO^{\bullet}$), o qual, ao receber um átomo de hidrogênio de outro ácido graxo insaturado (RH) produz hidroperóxidos ($ROOH$) e outro radical livre, contribuindo para a reação em cadeia (SIMIC, 1981).

Os produtos primários da oxidação lipídica (peróxidos e hidroperóxidos) são de natureza instável e, com o decorrer da reação, se decompõem em compostos secundários responsáveis pelo odor característico de ranço, como aldeídos, cetonas e ácidos (LAWSON, 1995).

Na última fase da autoxidação, devido à redução da quantidade de ácidos graxos insaturados presentes no sistema, as moléculas de radicais livres combinam-se originando produtos estáveis ($ROOR$ ou RR), os quais são conhecidos como produtos secundários da oxidação, como os epóxidos, compostos voláteis e não voláteis. Nesta fase, as alterações são mais fortes, podendo resultar em mudanças na cor e na viscosidade do lipídio (SIMIC, 1981).

3.2 Teste acelerado em estufa

A avaliação do estado de oxidação do óleo é um meio de controlar e garantir a qualidade dos produtos comercializados. Existem diferentes métodos para avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. Cada método fornece informações sobre um estado específico do processo oxidativo que pode variar em função das condições aplicadas. Por isso, procura-se avaliar em condições padronizadas, de acordo com um determinado período de indução da reação, ou seja, o tempo necessário para se atingir o ponto crítico de oxidação. A determinação do período de indução não deve ser restrita a um determinado momento, deve ser realizada ao longo do tempo, de forma que represente o *shelf life* do produto (HORUZ; MASKAN, 2015).

É possível determinar a estabilidade oxidativa nas condições normais de armazenamento, em tempo real, ou através de testes preditivos como os testes de envelhecimento acelerado. Os testes acelerados permitem estimar de forma rápida a eficácia de um antioxidante quando adicionado aos óleos e gorduras (ANTONIASSI, 2001).

Um dos métodos acelerados para se avaliar a estabilidade oxidativa é o teste acelerado em estufa. Neste método, o óleo é mantido a 60°C estocado e posteriormente é analisado periodicamente por meio de métodos de identificação de produtos de oxidação primária e secundária. Para acelerar a oxidação, estes testes incluem elevação de temperatura, adição de metais, aumento da pressão de oxigênio, estocagem sob luz e agitação. Porém, o aquecimento é o meio mais utilizado e eficiente.

A condição de armazenamento acelerado em estufa envolve colocar uma quantidade de amostra de óleo em estufa com circulação de ar forçado, onde um dia de teste de armazenamento em estufa acelerada a 60°C é equivalente a um mês de armazenamento em temperatura ambiente (CHONG et al., 2015; GUO et al., 2016).

Desta forma, é possível conhecer a vida de prateleira do óleo, já que os resultados fornecidos pelo teste apresentam uma boa correlação com a avaliação efetuada em condições ambientais de armazenamento (ANTONIASSI, 2001).

3.3 Antioxidantes

As espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas no organismo como intermediários necessários e funcionam como mensageiros secundários na sinalização celular. Podem causar efeitos prejudiciais à saúde, já que em altas concentrações no DNA e RNA podem levar a condições patológicas (SARANGARAJAN et al., 2017). As ERO são produzidas principalmente nas mitocôndrias, peroxissomas e retículo endoplasmático e através da cadeia respiratória mitocondrial, na qual ocorre altas taxas de produção de adenosina trifosfato (ATP), oxidação de ácidos graxos e desintoxicação dos processos xenobióticos. O equilíbrio na produção de ERO e sua eliminação através dos antioxidantes determinam um equilíbrio no sistema. A interrupção desse equilíbrio leva ao estresse oxidativo (MURPHY, 2009; NIMSE; PAL, 2015).

Por isso, a demanda por inibidores eficientes nos processos de oxidação tornou-se essencial. Sabe-se que os antioxidantes têm importante papel de proteção contra doenças, já que esses compostos eliminam as ERO. Além disso, o uso de antioxidantes em óleos comestíveis interrompe as reações em cadeia, eliminando os radicais livres e são importantes na prevenção e tratamento de doenças relacionadas (SZYDŁOWSKA-CZERNIAK et al., 2008).

Durante a oxidação lipídica nos alimentos, os antioxidantes podem atuar na ligação com íons metálicos, no sequestro de radicais livres e na decomposição dos peróxidos, impedindo o desencadeamento das reações oxidativas (POKORNÝ, 2007).

Os antioxidantes são componentes que impedem a autooxidação de óleos e gorduras, doando seu hidrogênio aos radicais livres formados nos estágios de iniciação e propagação da autooxidação (TAGHVAEI; JAFARI, 2015).

A utilização de antioxidantes em alimentos é uma estratégia para evitar as reações oxidativas no processamento e armazenamento dos alimentos. Têm sido utilizados pelas indústrias a fim de prevenir ou mediar o dano oxidativo eliminando os radicais livres antes da fase de propagação da oxidação lipídica (JOHNSON; DECKER, 2015).

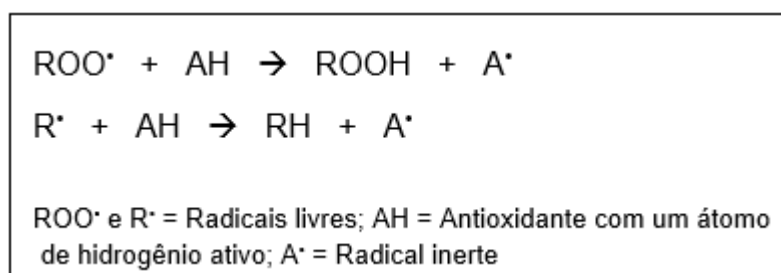
Atualmente, a tendência das indústrias de alimentos é substituir a utilização de antioxidantes sintéticos pelos naturais a fim de minimizar a utilização de produtos

sintéticos e manter a estabilidade oxidativa dos óleos comestíveis e demais produtos.

3.3.1 Mecanismo de ação

De acordo com seu mecanismo de ação, os antioxidantes são classificados como primários e secundários. Os primários são compostos fenólicos que atuam interrompendo a reação em cadeia através da doação de elétrons ou hidrogênio promovendo a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a fase de iniciação e propagação, transformando-os em produtos mais estáveis (A^*) e inativos ($ROOH$ e RH) para a propagação das reações (BERDHAL; NAHAS; BARREN, 2010). A Figura 2 representa o mecanismo de transferência de hidrogênio dos antioxidantes primários.

Figura 2 – Mecanismo de ação para os antioxidantes primários.



Fonte: Ramalho e Jorge (2006).

Os principais antioxidantes deste grupo são os polifenóis, como butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), galato de propila (GP) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ), que são sintéticos, e os tocoferóis, que são naturais (GUZMAN et al., 2009).

Os antioxidantes secundários, também chamados de sinergistas, são capazes de aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando utilizados em combinação adequada. Sua ação antioxidante retarda a reação oxidativa por meio de diversos mecanismos, como a complexação com metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos com consequente formação de compostos mais estáveis. O ácido cítrico é um agente quelante, o qual possui a capacidade de sequestrar íons metálicos como cobre e ferro que catalisam a oxidação lipídica. Já

os removedores de oxigênio, como o ácido ascórbico, são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio através de reações químicas, tornando-o indisponível para propagação da autooxidação. Os principais antioxidantes secundários são: ácidos cítrico, ascórbico e tartárico (POKORNÝ, 2007).

3.3.2 Antioxidantes sintéticos

São comumente incorporados aos alimentos a fim de prevenir a oxidação e prolongar a sua vida útil. Têm a vantagem por sua estabilização em gorduras e alta eficiência, já que são lipossolúveis. Embora não possuam cor, odor e sabor, a maioria deles perde sua atividade antioxidante em temperaturas elevadas (POKORNÝ, 2007; SASSE; COLINDRES; BREWER, 2009).

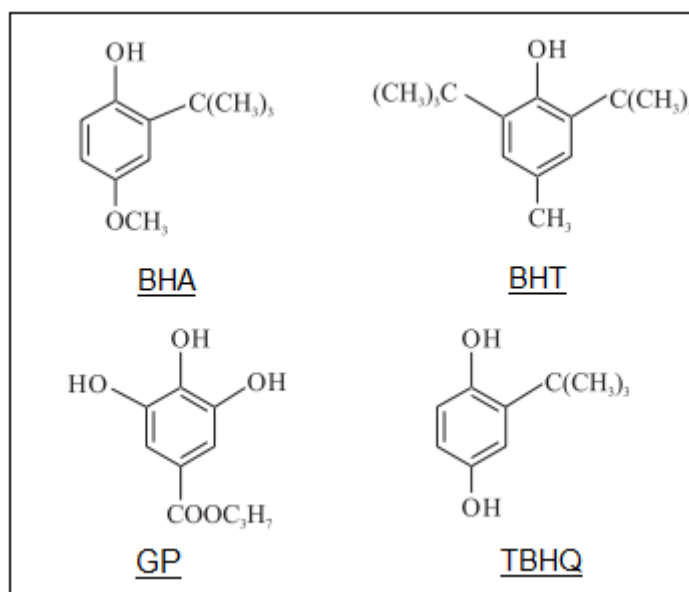
Esses antioxidantes são considerados seguros, embora alguns estudos indicam o contrário. Em alguns países seu uso é regulamentado devido seu potencial efeito de citotoxicidade e carcinogênese, que pode ser observado em estudos toxicológicos (TAGHVAEI; JAFARI, 2015).

Por estes motivos, o uso destes antioxidantes em alimentos é limitado. Em países como Japão, Canadá e em alguns países europeus (Inglaterra, Dinamarca, Noruega e Suíça), o uso de TBHQ em alimentos não é permitido (LIU et al., 2016). No Brasil, o uso de antioxidantes sintéticos é controlado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que limita o uso de 200 mg/kg para BHA e TBHQ, e 100 mg/kg para BHT e GP, como concentrações máximas permitidas para os óleos vegetais (BRASIL, 2008).

Os principais antioxidantes sintéticos utilizados são: BHA, BHT, GP e TBHQ. A estrutura fenólica destes compostos apresentada na Figura 3, permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando, assim, a molécula do acilglicerol e interrompendo a propagação da reação de oxidação (GUZMAN et al., 2009).

Atualmente, as indústrias de alimentos buscam alternativas mais seguras para implementação desses aditivos em alimentos, visando a substituição desses antioxidantes sintéticos pelos naturais. Neste âmbito, estão sendo desenvolvidas pesquisas com extratos naturais à base de sementes, cascas e especiarias, a fim de avaliar sua atividade antioxidante e a viabilidade de sua aplicação em alimentos (ALMEIDA et al., 2015; CHONG et al., 2015; GUO et al., 2016; MELO et al., 2016).

Figura 3 – Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos.



Fonte: Guzman et al. (2009).

3.3.3 Antioxidantes naturais

Os antioxidantes naturais estão presentes em diferentes tipos de alimentos, principalmente os de origem vegetal. Entre as principais fontes incluem os grãos e sementes de oleaginosas, de cereais, de frutas, castanhas, legumes e especiarias (CHONG et al., 2015; GUO et al., 2016; JORGE; VERONEZI; PEREIRA, 2016; MELO et al., 2016).

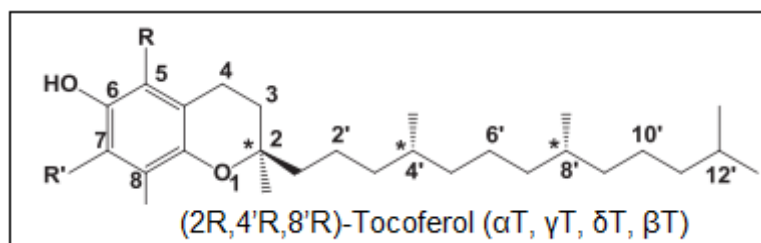
Além de combaterem os radicais livres presentes nos alimentos, os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação celular, retardando o envelhecimento das células e o surgimento de doenças imunomodulatórias, como o câncer e a doença de Alzheimer (CHICHON, 2002).

Os principais compostos bioativos capazes de atuar como antioxidantes naturais são os tocoferóis, os compostos fenólicos, os carotenoides, e alguns tipos de ácidos orgânicos, como os ácidos ascórbico e cítrico.

Os tocoferóis, compreendem o grupo da vitamina E e estão presentes naturalmente nos óleos vegetais. São substâncias lipossolúveis, precursores da vitamina E e apresentam quatro isômeros: α -, β -, γ - e δ -tocoferol (Figura 4). Os isômeros mais abundantes nos alimentos são α e γ -tocoferol. Sua ação antioxidante

consiste na capacidade de doação de seus hidrogênios fenólicos a radicais livres a fim de estabilizá-los (GUINAZI et al., 2009).

Figura 4 – Estrutura química dos tocoferóis.



Fonte: Jiang (2014).

Entre os isômeros da vitamina E, o α -tocoferol é considerado o mais biologicamente ativo, já o γ e δ -tocoferol são considerados os de maior atividade *in vitro*, atuando como antioxidantes mais eficientes. Porém, a atividade antioxidante relativa dos tocoferóis depende de vários parâmetros, incluindo temperatura, composição, os métodos testados, os substratos utilizados, o nível de oxidação empregado e as metodologias utilizadas para o monitoramento da oxidação (GUINAZI et al., 2009).

O α -tocoferol pode ser produzido por síntese, sendo constituinte natural de alguns alimentos, e também é comercializado como aditivo para aplicação na indústria de alimentos. Segundo o *Codex Alimentarius Commission* (2009), a concentração máxima permitida é de 300 mg/kg de adição de α -tocoferol em óleos vegetais.

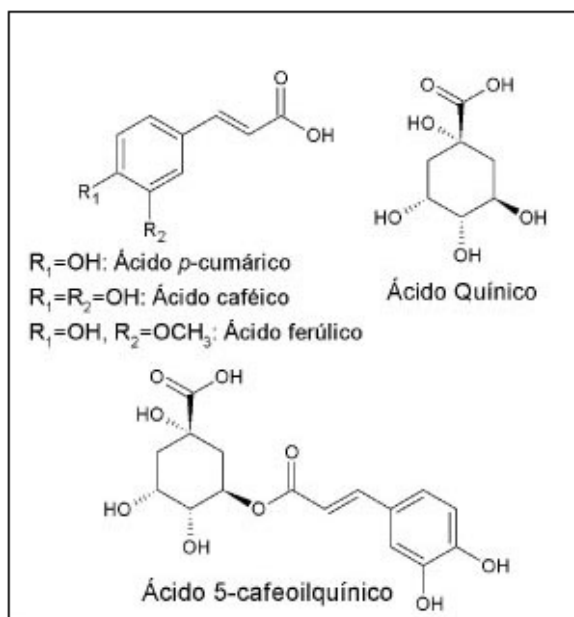
Os compostos fenólicos são potentes antioxidantes, podendo agir como redutores de oxigênio singlete, atuando nas reações de oxidação lipídica. Caracterizam-se pela presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula. Os produtos da reação dos compostos fenólicos são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático existente na estrutura, e à sua capacidade redutora, permitindo que estes compostos apresentem propriedades antioxidantes (POKORNÝ, 2007).

A presença de compostos fenólicos nos alimentos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos e antiocianinas, vitaminas C, E e carotenoides, contribuem para os efeitos benéficos destes alimentos (BROINIZI et al., 2007; LINARES et al., 2015).

No hibisco, os principais compostos fenólicos presentes são os ácidos

hidroxicinâmicos, como o ácido cafeico e *p*-cumárico, que se encontram esterificados ao ácido quínico, formando os ácidos clorogênicos, conforme Figura 5 (OLIVEIRA; BASTOS, 2011; RIAZ; CHOPRA, 2018). É também rico em isômeros de glicosídeos de quercetina e kaempferol que auxiliam na atividade anti-inflamatória e apresentam considerável atividade antioxidante (RIAZ; CHOPRA, 2018).

Figura 5 – Fórmula estrutural dos ácidos clorogênicos.



Fonte: Oliveira e Bastos (2011).

Os carotenoides representam um grupo de pigmentos naturais presentes em vegetais, com coloração que varia entre o vermelho e o amarelo. Apresentam atividade antioxidante protegendo a célula contra a oxidação lipídica, e são precursores para a biossíntese da vitamina A. Sua ação na desativação do oxigênio singlete ou como sequestradores de radicais peroxila, reduz a incidência de doenças degenerativas no organismo, como câncer e cardiopatias (BASU et al., 2001).

Os ácidos orgânicos, tais como ascórbico e cítrico, também são encontrados em frutas e vegetais e agem como antioxidantes protegendo contra a ação dos radicais livres. Atuam como quelantes de íons metálicos e removedores de oxigênio que catalisam a oxidação lipídica (POKORNÝ, 2007).

3.3.4 Sinergismo

Sinergismo é a associação de duas substâncias dotadas de capacidade antioxidante que interagem uma com a outra, evidenciando melhor ação antioxidante do que a verificada em cada uma, isoladamente (POKORNÝ, 2007; MELO et al., 2016).

O mecanismo de ação varia com o tipo de antioxidante, pois atuam complexando metais pró-oxidantes, regenerando os antioxidantes primários ou inibindo a decomposição de peróxidos, interrompendo o processo de autooxidação (RAMALHO; JORGE, 2006).

Hras et al. (2000) investigaram o sinergismo entre antioxidantes naturais e verificaram que o extrato de alecrim (20 mg/kg) com os antioxidantes palmitato de ascorbila (10 mg/kg) e ácido cítrico (10 mg/kg) adicionados em óleo de girassol armazenado a 60°C apresentaram efeito sinérgico em ambos os tratamentos. Foi observado que a atividade antioxidante foi maior para estes tratamentos quando comparados individualmente. Já ao comparar com o tratamento de óleo adicionado de α -tocoferol (10 mg/kg) conclui-se que reduziu a atividade antioxidante, agindo como pró-oxidante.

Ao avaliar o efeito sinérgico da mistura de 2500 mg/kg de extrato de gengibre com 50 mg/kg de antioxidante sintético TBHQ em óleo de soja sob estocagem acelerada em estufa, Andreo e Jorge (2007) concluíram que este tratamento apresentou capacidade antioxidante semelhante ao do óleo de soja adicionado de 50 mg/kg de TBHQ, portanto, não houve sinergismo neste tratamento já que a eficiência em retardar a oxidação lipídica do óleo de soja no teste acelerado em estufa foram iguais para ambos os tratamentos.

Luzia e Jorge (2009) avaliaram a atividade antioxidante do extrato de sementes de limão adicionado em óleo de soja e constataram que a mistura do extrato de sementes de limão na concentração de 2400 mg/kg com 50 mg/kg de TBHQ mostrou-se eficiente em relação a formação dos compostos primários de oxidação.

Por isso, com o aumento da demanda por produtos que contribuam para a melhoria da qualidade de vida, provenientes especialmente de fontes naturais, novas pesquisas têm sido realizadas visando a substituição dos antioxidantes sintéticos ou até mesmo a associação a eles ou a outros antioxidantes naturais, possibilitando atividade sinérgica.

3.4 Hibisco

O hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) é uma planta pertencente à classe das *Dicotyledonae*, família *Malvaceae* e gênero *Hibiscus*, e é cultivado em regiões de clima tropical e subtropical (ISMAIL; IKRAM; NAZRI, 2008). Também conhecido popularmente como roselle, vinagreira, quiabo-azedo, caruru-da-guiné e azedinha. É uma planta nativa da África Oriental, e foi introduzida no Brasil pelos escravos. Rica em compostos bioativos, vitaminas e minerais. As antocianinas presentes são responsáveis pela capacidade antioxidante e pela coloração vermelha dos cálices, apresentada na Figura 6a (WANG et al., 2000; LINARES et al., 2015; YOUSSEF; EL KADY; NAGY, 2015; RIAZ, CHOPRA, 2018).

Figura 6 – Hibisco: planta (a) e flor (b).



Fonte: Elaborada pelo autor.

É um herbáceo anual, ereto e espesso que pode crescer de 0,5 até 3 m de altura, com hastes cilíndricas, coloração avermelhada e lisa aveludada. As folhas são lobadas e profundas e variam de 8 a 15 cm de comprimento, dispostas em hastes cilíndricas e avermelhadas (RIAZ; CHOPRA, 2018). As flores são axilares, ou seja, estão presentes nas axilas das folhas, com cerca de 12,5 cm de largura. As pétalas são brancas com um centro avermelhado na base da coluna estaminal, como mostra a Figura 6b (ROCHA et al., 2014).

A planta leva cerca de três a quatro meses para chegar ao ponto de maturidade antes que as flores sejam colhidas. Existem mais de 300 espécies distribuídas em diversas regiões de climas tropicais e subtropicais com chuvas bem distribuídas de 1500 a 2000 mm/ano. Toleram um clima mais quente e úmido, solos bem drenados e temperatura noturna superior a 21°C (ISMAIL; IKRAM; NAZRI, 2008; RIAZ; CHOPRA, 2018).

Pode-se observar que a morfologia do hibisco é composta basicamente do cálice (Figura 7a), tipicamente vermelho, fruto (Figura 7b) aveludado contendo uma cápsula de 1,25 a 2 cm de comprimento, com coloração verde quando imaturo, contendo 5 válvulas internas, cada válvula com 3 a 4 sementes (Figura 7c) que possuem formato de rim, coloração marrom claro, com comprimento de 3 a 5 mm (MAHADEVAN; SHIVALI; KAMBOJ, 2009).

Figura 7 – Morfologia do hibisco: cálice (a), fruto (b) e semente (c).



Fonte: Elaborada pelo autor.

3.4.1 Cálices

O cálice é composto de cinco sépalas com um colar de 8 a 12 brácteas finas e pontiagudas em torno da base das sépalas que envolvem o fruto com semente (MAHADEVAN; SHIVALI; KAMBOJ, 2009). Os cálices maduros e comestíveis são colhidos após 15 a 20 dias da floração. O restante da plantação é deixado no campo até as sementes estarem prontas para debulhar. Como apresentados na Figura 8, os cálices de hibisco geralmente são consumidos na sua forma seca.

A composição nutricional dos cálices de hibisco evidencia a presença de proteínas, vitaminas e minerais, tais como ferro, fósforo, cálcio, manganês, alumínio, magnésio, sódio, potássio e ácido ascórbico (MAHADEVAN; SHIVALI; KAMBOJ,

2009).

Figura 8 – Cálices de hibisco.



Fonte: Elaborada pelo autor

Na Tabela 1 podem-se observar os constituintes físico-químicos dos cálices e sementes de hibisco nas mesmas concentrações. As sementes apresentaram maior teor de proteínas, lipídios e fibras quando comparadas aos cálices.

Tabela 1 – Constituintes físico-químicos dos cálices e sementes de hibisco.

Constituintes físico-químicos (%)	Cálices*	Sementes**
Proteínas	7,51	18,8 - 22,3
Lipídios	0,46	19,1 - 22,8
Fibras	11,17	39,5 - 42,6

*Abou-arab et al. (2011).

**Mahadevan, Shivali e Kamboj (2009).

Linares et al. (2015) avaliaram o perfil fitoquímico e a capacidade antioxidante de 25 variedades de hibisco, e em relação aos compostos fenólicos totais dos extratos de cálices de hibisco, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), encontraram valores que variavam de 24 a 100 mg EAG/g. Já o conteúdo de flavonoides variou de 419 a 2260 mg EQ/100 g.

A quantificação dos compostos fenólicos do extrato aquoso de cálices de hibisco por CLAE detectou 17 compostos diferentes, como podem ser observados na Tabela 2.

Já o teor de antocianinas encontrado nos cálices de hibisco foi de 107,3 mg/100 g, valor próximo ao encontrado no mirtilo, cerca de 113,55 mg/100 g, sendo este considerado um alimento fonte de flavonoides com potencial atividade

antioxidante (SELLAPAN; AKOH; KREWER, 2002).

Tabela 2 – Quantificação das frações de compostos fenólicos no extrato de cálices de *Hibiscus sabdariffa*.

Compostos fenólicos	mg/kg
Ácido hidroxicítrico	8288,03 ± 397,63
Ácido hibiscus	31122,02 ± 1128,39
Ácido clorogênico (isômero I)	2755,15 ± 62,42
Ácido clorogênico	1923,72 ± 38,69
Ácido clorogênico (isômero II)	1041,19 ± 16,96
Miricetina 3-arabinogalactose	57,32 ± 2,51
Quercetina 3-sambubiosideo	304,02 ± 5,90
Ácido 5-O-caffeyolshikimico	171,47 ± 6,92
Quercetina 3-arabinogalactose	495,70 ± 4,34
Quercetina 3-glucosideo	143,74 ± 2,16
Kaempferol 3-O-rutinosideo	91,86 ± 2,28
N-Feruloiltiramina	98,97 ± 1,80
Kaempferol 3-O-(<i>p</i> -comarilglucosideo)	28,37 ± 0,48
Quercetina	121,24 ± 2,01
7-Hidrocumarina	1839,20 ± 25,34
Delfinidina 3-sambubiosideo	2701,21 ± 165,55
Cianidina 3-sambubiosideo	1939,15 ± 39,27

Fonte: Arroyo et al. (2011).

Nas Índias Ocidentais, os cálices *in natura* são utilizados para produção de vinho, gelatina, xarope, bebidas, pudim e bolos, e cálices secos são usados para chá, geléia, marmelada, sorvetes, tortas e outras sobremesas. No Egito e no Sudão é muito comum a produção de refrigerante à base de cálice de hibisco, popularmente conhecido como *karkade*. São também usados como aditivos de cor e sabor no rum (MAHADEVAN; SHIVALI; KAMBOJ, 2009). Além disso, são utilizadas pela indústria farmacêutica para fabricação de produtos para aliviar sintomas de bronquite e tosse (ISMAIL; IKRAM; NAZRI, 2008). No Brasil, são consumidos na forma de chá, conservas, sucos, temperos e geleias (DUARTE; BOTELHO; AKUTSU, 2017). No Maranhão, as folhas do hibisco também são muito utilizadas na culinária tradicional como ingrediente base para preparação do arroz de cuxá

(BRASIL, 2010).

Estudos mostram que os cálices de hibisco apresentam diversos benefícios para a saúde atuando como antioxidante (AL-HASHIMI, 2012), hepatoprotetor (EZZAT et al., 2016), anti-inflamatório (SHEN et al., 2016), antibacteriano, antifúngico, anti-hipertensivo (WAHABI et al., 2010) e antitumoral (MALACRIDA et al., 2016).

Hopkins et al. (2013) analisaram inúmeros ensaios clínicos randomizados que mostraram que o consumo diário de chá ou extrato de cálices de hibisco teve influência favorável no perfil lipídico, incluindo redução do colesterol total, das frações de colesterol de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e das triglicérides, além do aumento das frações de colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL). Além de diminuir o risco de doenças cardiovasculares.

3.4.2 Sementes

As sementes apresentam formato de rim, coloração marrom-clara, 3 a 5 mm de comprimento e pesam aproximadamente 5 g (Figura 9). São ricas em ácidos graxos poli-insaturados e antioxidantes lipossolúveis, em especial o δ -tocoferol (MOHAMED et al., 2007; MAHADEVAN; SHIVALI; KAMBOJ, 2009). São compostas de 18,8-22,3% de proteínas, 19,1-22,8% de lipídios e 39,45-42,6% de fibras, e ricas em minerais como cálcio, ferro, fósforo e magnésio (MAHADEVAN; SHIVALI; KAMBOJ, 2009).

Figura 9 – Sementes de hibisco.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Estudos feitos por Halimatul et al. (2007) e Hainida et al. (2008) mostraram que as sementes de hibisco contêm proteína de boa qualidade, semelhante à caseína, já que é rica em aminoácidos essenciais. Outro estudo demonstrou que as sementes podem reduzir o colesterol total e LDL quando administrada a ratos hipercolesterolêmicos (HAINIDA et al., 2008).

No México, essas sementes são torradas e consumidas como substituto do café, e no Sudão são cozidas e fermentadas como substituto da carne e na fabricação de óleos comestíveis (MENDOZA et al., 2008). As sementes apresentam também propriedades medicinais, atuando como diurético e laxante (ISMAIL; IKRAM; NAZRI, 2008).

O tratamento térmico das sementes causa uma série de modificações desejáveis à sua composição química, propriedades nutricionais e organolépticas, porém, pode induzir a perdas de vitaminas e aminoácidos essenciais (ISMAIL; IKRAM; NAZRI, 2008).

Hainida et al. (2008) analisaram a composição nutricional das sementes de hibisco e encontraram 9,9% de umidade, 33,5% de proteínas, 22,1% de lipídios, 13,0% de carboidratos e 18,3% de fibras alimentares totais. De acordo com Nyam et al. (2014), as sementes são consideradas fontes de fibras dietéticas já que apresentam inúmeros benefícios para saúde, como a redução do colesterol total, alteração nos níveis de insulina e diminuição do risco de câncer de cólon. A casca da semente é composta de uma quantidade substancial de fibra insolúvel, enquanto que a parte interna da semente contém fibra solúvel.

Em relação aos ácidos graxos presentes nas sementes, são altamente semelhantes às propriedades do óleo de milho, assim como ambos são ricos em fitosteróis, como pode ser observado na Tabela 3.

Além disso, o óleo de sementes de hibisco é rico em clorofila, um grupo de diferentes pigmentos verdes típicos em organismos que realizam fotossíntese, com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antimutagênicas presentes nos vegetais (CRUZ; CASAL, 2018).

Durante o processamento de sementes oleaginosas, a clorofila é extraída, e se estiver presente em grande concentração, transmite coloração esverdeada e pode interferir na qualidade do óleo extraído (DIOSADY, 2005). A clorofila é responsável pelo aumento da acidez no óleo, gerando um custo maior para o seu

refinamento.

Tabela 3 – Frações de fitosteróis em óleos de hibisco e milho.

Frações (mg/100 g)	Hibisco	Milho
Campesterol	107,0 ± 6,1	115,3 ± 7,3
Campestanol	-	8,5 ± 0,7
Stigmasterol	50,6 ± 2,5	45,7 ± 3,6
β-Sitosterol	559,3 ± 8,5	458,0 ± 9,1
β-Sitostanol	32,9 ± 6,5	42,4 ± 1,5

Médias ± desvios padrões das análises em triplicata

Fonte: Atta e Imaizumi (2002).

Por isso, o conteúdo de clorofila é considerado um parâmetro de qualidade, devendo ser removida durante o processo de refino para aumentar a estabilidade oxidativa do óleo. Esses pigmentos promovem a autooxidação do óleo quando expostos à luz, devido às suas características fotossensibilizantes do anel porfirina dessas moléculas facilitando a formação de oxigênio singlete (GOMES et al., 2003).

As sementes de hibisco muitas vezes são removidas e descartadas como subproduto concomitante ao cultivo em larga escala. Por isso, a importância em realizar estudos com as sementes, a fim de reduzir custos e evitar problemas de remoção desses resíduos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

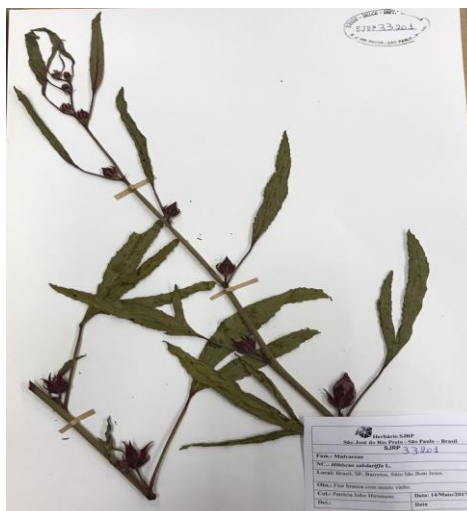
4.1.1 Hibisco

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Óleos e Gorduras da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/IBILCE), campus São José do Rio Preto, SP, Brasil.

O hibisco foi proveniente do sítio São Bom Jesus, localizado na cidade de Barretos, SP, Brasil (latitude 20°51'50" S e longitude 48°63'64" O) durante a safra 2017. O ponto de colheita foi quando os cálices atingiram cerca de 4 a 6 cm de comprimento, com hastes firmes e textura tenra. A colheita pode ser feita de 15 em 15 dias e a floração perdura por até 6 meses.

Primeiramente, a colheita dos ramos de hibisco foi feita em fevereiro de 2017, no período matutino. Os hibiscos foram transportados em bolsa térmica para cidade de São José do Rio Preto. Os ramos de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) *in natura* foram identificados botanicamente e encaminhados como exsicatas (Figura 10) para registro no Herbário do Departamento de Zoologia e Botânica, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP/IBILCE, recebendo a identificação SJRP 33201.

Figura 10 – Exsicata do hibisco.



Fonte: Elaborada pelo autor.

Os ramos de hibisco foram higienizados em água corrente e separados manualmente os cálices e os frutos com sementes. Os cálices e sementes foram selecionados neste estudo tendo em vista a capacidade antioxidante presente, e as sementes por serem consideradas subprodutos da indústria (ATTA; IMAIZUMI, 2002; LINARES et al., 2015). Os cálices foram separados e cortados em pequenos pedaços de 3 cm e as sementes separadas dos frutos e reservadas para posterior secagem em estufa. Os componentes vegetais (cálices e sementes) do hibisco foram colocados, separadamente, em estufa (modelo MA-035, Marconi, Piracicaba, Brasil) a 40°C durante 48 horas para secagem (Figura 11).

Figura 11 – Hibisco secos: cálices (a) e sementes (b).



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.1.2 Extratos

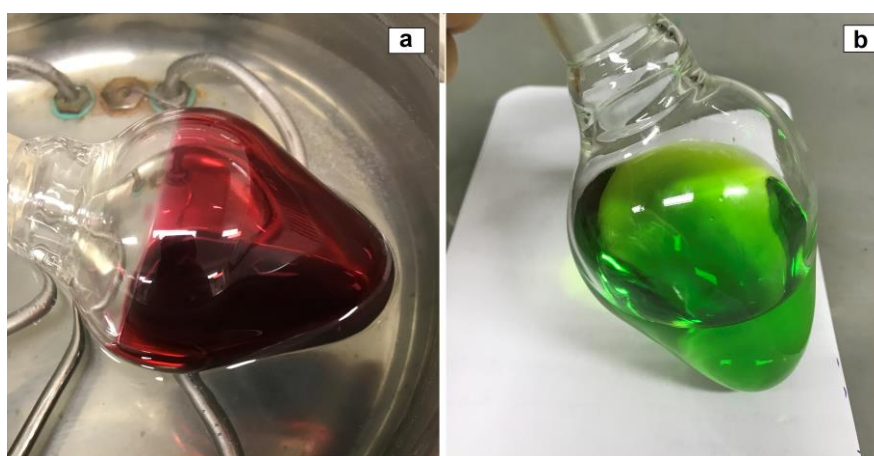
Os cálices e sementes de hibisco secos em estufa foram triturados em mini processador de alimentos (modelo MPR514, Cadence, Balneário Piçarras, Brasil) até a obtenção de um pó homogêneo.

Para obtenção dos extratos foi utilizado o método de Carvajal-Zabarral et al. (2009), onde 135 g de cálices e sementes de hibisco secos e triturados foram adicionados em 500 mL de etanol (96%) a temperatura ambiente. Durante 8 dias essa mistura foi mantida imersa em frasco âmbar com tampa, e foram feitas agitações manuais em dias alternados, seguido por filtração a vácuo. Posteriormente, o filtrado foi submetido em rotaevaporador (modelo Q 344B2, Quimis, São Roque, Brasil) a 38°C para remoção do solvente e obtenção do extrato seco. A Figura 12 apresenta os extratos de cálices e sementes de hibisco. Os

extratos secos de hibisco foram ressuspensos em etanol na proporção 1:20 (m/v) e armazenados em vidros âmbar a -18°C para análises posteriores.

A escolha do solvente foi feita de acordo com estudos que obtiveram melhores resultados na extração de compostos fenólicos (CARVAJAL-ZABARRAL et al., 2009; GONZALEZ-MONTELONGO; LOBO; GONZALEZ, 2010; MOHD-ESA et al., 2010; SINDI; MARSHALL; MORGAN, 2014; LINARES et al. 2015).

Figura 12 – Extrato de hibisco: cálices (a) e sementes (b).



Fonte: Elaborada pelo autor.

Para cada extrato foram feitas as análises de teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante determinada pelos métodos DPPH, FRAP e β -caroteno/ácido linoleico.

4.1.3. Antioxidante natural

O antioxidante natural utilizado foi o α -tocoferol, em sua forma comercial, fornecido pela empresa GNTLab, marca Sigma Aldrich, 96% de pureza. Foi adicionado em óleo de soja na concentração de 300 mg/kg.

4.1.4. Óleo de soja

Utilizou-se o óleo de soja refinado sem adição de antioxidantes sintéticos, proveniente do comércio local na cidade de São José do Rio Preto, SP, Brasil.

4.1.5. Óleo de hibisco

O óleo de sementes de hibisco foi extraído por meio do método proposto por Bligh e Dyer (1959). As sementes de hibisco foram secas e trituradas em mini processador de alimentos (modelo MPR514, Cadence, Balneário Piçarras, Brasil) e, em seguida, foram pesados 10 g de sementes de hibisco e adicionados de 40 mL de clorofórmio, 80 mL de metanol e 32 mL de água destilada. Essa mistura foi colocada em mesa agitadora orbital (modelo TE-141, Tecnal, Piracicaba, Brasil) por 30 minutos. Novamente foram adicionados 40 mL de clorofórmio e 40 mL de sulfato de sódio e agitado por 2 minutos. Foi feito o processo de filtração a vácuo seguido pelo balão de separação durante 1 hora e 30 minutos.

Após o processo de extração, a mistura de solvente e óleo foi filtrada com filtro de papel contendo sulfato de sódio anidro. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida a 40°C e o óleo obtido foi acondicionado em vidro âmbar, inertizado com nitrogênio gasoso e armazenado a -18°C para posterior realização das análises.

4.2 Teste acelerado em estufa

O extrato de cálices de hibisco foi o que apresentou maior atividade antioxidante e por isso, foi adicionado no óleo de soja na concentração de 300 mg/kg, baseando-se no teor de compostos fenólicos totais presentes, e estocado em estufa a 60°C por 12 dias.

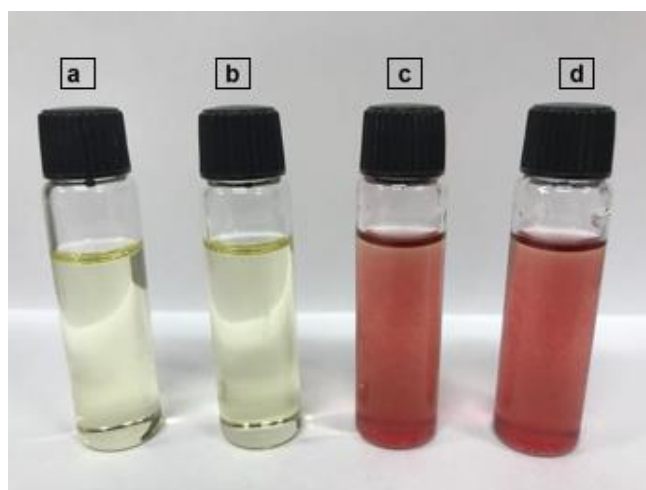
O óleo de soja adicionado de extrato foi posteriormente inserido no ultrassom (modelo 740D, Ultrasonic Cleaner, Ribeirão Preto, Brasil) durante 15 minutos, para se obter a homogeneização eficiente do extrato no óleo.

O teste acelerado em estufa foi realizado com os tratamentos apresentados na Figura 13, sendo OS (óleo de soja), Tocoferol (óleo de soja + 300 mg/kg de α -tocoferol), Extrato (óleo de soja + 300 mg/kg de fenólicos) e Mistura (óleo de soja + 300 mg/kg de α -tocoferol + 300 mg/kg de fenólicos).

A concentração de 300 mg/kg de extrato e de α -tocoferol foi definida de acordo com a quantidade máxima de α -tocoferol permitida pela legislação brasileira (BRASIL, 2008).

Os tratamentos foram mantidos em estufa aquecida com circulação de ar (modelo MA-035, Marconi, Piracicaba, Brasil) a 60°C por 12 dias, utilizando-se béqueres de 100 mL contendo 70 mL de amostra com relação superfície/volume de 0,3/cm. As amostras, em diferentes intervalos de tempos (0, 6 e 12 dias), foram recolhidas, inertizadas com nitrogênio gasoso e armazenadas a -18°C até o momento das análises de índices de peróxidos, *p*-anisidina, estabilidade oxidativa e perfil de tocoferóis.

Figura 13 – Tratamentos: OS (a), Tocoferol (b), Extrato (c) e Mistura (d).



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Métodos

4.3.1 Análises nos extratos

- Rendimento

Os cálices e sementes de hibisco foram pesados em balança analítica (modelo AS200, Ohaus, Florham Park, EUA) após secagem em estufa e armazenados em vidros âmbar hermeticamente fechados. E posteriormente, o extrato seco foi pesado após passagem pelo rotaevaporador. O cálculo do rendimento foi expresso em porcentagem: $\text{Rendimento (\%)} = (\text{peso do extrato seco} / \text{peso do hibisco seco}) \times 100$.

- Umidade

Foi realizada em estufa a vácuo (modelo TE-395, Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 70°C com pesagem a cada duas horas, até obtenção de peso constante, segundo o método Ca 2d-25 da AOCS (2009).

- Compostos fenólicos totais

Os teores de compostos fenólicos totais foram determinados pelo método proposto por Singleton e Rossi (1965), no qual uma amostra de 100 µL da solução etanólica do extrato de hibisco foi adicionada de 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, de 1,5 mL de solução saturada de carbonato de sódio 20% e de 6 mL de água destilada, em tubos de ensaio âmbar. Os tubos de ensaio ficaram em repouso no escuro em temperatura ambiente. Após 2 horas, a absorvância foi determinada a 760 nm em espectrofotômetro (modelo UV mini-1240, Shimadzu Corp., Kyoto, Japão).

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi efetuada com base na curva padrão de ácido gálico. O coeficiente de determinação da curva analítica foi de $R^2 = 0,9998$. Os resultados dos compostos fenólicos totais foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g).

- Método do radical livre DPPH

Determinado pelo método proposto por Brand-Williams, Curvelier e Berset (1995) e Mensor et al. (2001), onde foi preparada uma solução etanólica de DPPH (2,2- difenil-1-picrihidracil) a 0,06 mM. A amostra foi preparada com extrato etanólico de cálices de hibisco com concentração de 1 g/mL e com extrato etanólico de sementes de hibisco com concentração de 0,12 g/mL. No procedimento foram pipetados 100 µL da amostra em 3,9 mL de solução do radical DPPH em tubo de ensaio âmbar e homogeneizada em vórtex. Após o armazenamento no escuro durante 30 minutos, a absorvância foi lida a 515 nm, em espectrofotômetro (modelo UV mini 1240, Shimadzu, Kyoto, Japão). O resultado foi expresso em porcentagem de Atividade Antioxidante (AA) pela fórmula: $AA (\%) = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100] / Abs_{controle}\}$, onde, Abs é a absorvância.

Paralelamente, foi conduzido um branco com 1 mL de solução DPPH e uma solução controle de etanol com a solução DPPH.

- Método FRAP

Segundo método descrito por Szydlowska-Czerniak et al. (2008), a presença de um antioxidante reduz o complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPZ) ao complexo ferroso (Fe^{2+} -TPZ) em condições ácidas. O complexo formado por esta reação apresenta coloração azul intensa, a absorvância é lida a 595 nm, permitindo assim o monitoramento da atividade redutora do extrato (SZYDŁOWSKA-CZERNIAK et al., 2008).

Foram preparadas soluções de HCl 40 mM, TPTZ 10 mM, cloreto férrico 20 mM, tampão acetato 0,3 M e o reagente FRAP. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 90 μL da amostra para tubos de ensaio âmbar e adicionada 270 μL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP (25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de cloreto férrico 20 mM). A mistura foi homogeneizada em agitador de tubos tipo vórtex (modelo QL-901, marca Biomixer, Curitiba, Brasil), e mantida em banho de aquecimento (modelo 550, Fisatom, São Paulo, Brasil) a 37°C por 30 minutos.

O coeficiente de determinação da curva utilizando as soluções de trolox foi de $R^2 = 0,9947$. A absorvância foi medida em espectrofotômetro (modelo UV mini 1240, Shimadzu, Kyoto, Japão) a 595 nm. A atividade antioxidante foi expressa em μM Trolox/g.

- Sistema β -caroteno/ácido linoleico

Foi empregada a metodologia proposta por Marco (1968) e modificada por Miller (1971). Foi preparada uma emulsão de β -caroteno/ácido linoleico, pela adição de 2 mg de β -caroteno em 10 mL de clorofórmio, e posterior homogeneização em agitador de tubos do tipo vórtex (modelo QL-901, Biomixer, Curitiba, Brasil). Uma alíquota de 1 mL desta solução foi transferida para um balão de fundo redondo contendo 25 μL de ácido linoleico e 200 μL de Tween 40. O clorofórmio da mistura foi evaporado com nitrogênio gasoso. Após a evaporação, foram adicionados à mistura 50 mL de água destilada aerada (saturada em oxigênio por 30 minutos). Em seguida, foi agitada em vórtex até a formação da emulsão de β -caroteno/ácido linoleico.

Para a análise, a leitura do branco foi realizada em 5 mL da emulsão de β -caroteno/ácido linoleico. Uma amostra controle foi feita com 5 mL da emulsão de β -

caroteno/ácido linoleico adicionada de 500 µL de etanol. Para análise do extrato, 500 µL de extrato de hibisco foi adicionada à 5 mL da emulsão, e em seguida, foi aquecida em banho de aquecimento (modelo 550, Fisatom, São Paulo, Brasil) a 50°C durante 15 minutos. A leitura foi realizada a 470 nm, em espectrofotômetro (modelo UV mini 1240, Shimadzu, Kyoto, Japão), em intervalos de 15 minutos durante 2 horas. A atividade antioxidante foi determinada em porcentagem de inibição (I%). As absorvâncias foram convertidas em porcentagem de inibição oxidativa: $I\% = (TDc - TDa) / TDc \times 100$, onde, I% é a porcentagem de inibição relativa ao controle, TDc é taxa de degradação do controle e TDa é taxa de degradação da amostra. A taxa de degradação é a diferença entre a absorvância no tempo zero e no tempo 120 minutos.

4.3.2 Análises nos óleos

Para o óleo de soja foram realizadas as análises de índice de peróxidos, índice de *p*-anisidina, valor Totox, estabilidade oxidativa e perfil de tocoferóis. E para o óleo de sementes de hibisco foram analisados clorofila, perfil de tocoferóis, perfil de ácidos graxos e perfil de fitosteróis.

- Índice de peróxidos

Foi determinado segundo a norma Cd 8-53 da AOCS (2009), a qual mede o iodo liberado a partir da reação do iodeto de potássio com os peróxidos. Foi calculado em miliequivalentes de oxigênio ativo por quilograma de matéria graxa.

- Índice de *p*-anisidina

A determinação do índice de *p*-anisidina foi realizada de acordo com a norma Cd 18-90 da AOCS (2009), a qual quantifica compostos secundários de degradação, como os aldeídos, por meio de medida espectrofotométrica a 350 nm. O resultado foi calculado conforme a equação: $IpA = [V \times (1,2 \times Abs_2 - Abs_1)]/m$, onde, IpA é o índice de *p*-anisidina, V é o volume de iso-octano em mL, Abs₂, a absorbância inicial, Abs₁, a absorbância final, e m, a massa em gramas.

- Valor total de oxidação (Totox)

O valor Totox (VT) foi obtido pela equação matemática que combina os resultados dos índices de peróxidos e *p*-anisidina. Foi realizado com base na seguinte equação: $VT = 2 IP + IA$, onde, IP o valor de índice de peróxidos e IA, o índice de *p*-anisidina. O resultado representa o total de compostos produzidos pela autooxidação dos óleos.

- Clorofila

A análise de clorofila foi feita de acordo com o método da AOCS Ch 4-91 (2009) por meio da leitura por espectrofotômetro (modelo UV mini 1240, Shimadzu, Kyoto, Japão), nos comprimentos de onda de 630, 670 e 710 nm para quantificação de clorofila. O resultado foi expresso em mg/kg pelo seguinte cálculo: $C = [A_{670} - (A_{630} + A_{710}) / 2] / 0,1016 \times L$, onde, C é a concentração de pigmentos em mg/kg de óleo, A é a absorvância em seus respectivos comprimentos de onda e L é a espessura da cubeta em cm.

- Estabilidade oxidativa

Os tratamentos foram analisados conforme método proposto pela norma Cd 12b-92 da AOCS (2009), com utilização do equipamento Rancimat (modelo 743, Metrohm, Herisau, Suíça), baseando-se na determinação da condutividade elétrica dos produtos voláteis de degradação. A determinação foi realizada a 110°C, com fluxo de ar de 20 L/h, utilizando 3 g de amostra e 60 mL de água destilada nos frascos contendo os eletrodos. Por este método é possível observar a curva de condutividade elétrica *versus* tempo registrada com o decorrer da reação e o período de indução que foi expresso em horas.

- Perfil de tocoferóis

A análise de determinação de tocoferóis foi feita pelo método AOCS Ce 8-89 (2009) utilizando o cromatógrafo líquido de alta eficiência (modelo ProStar 210, Varian, Walnut Creek, Estados Unidos) equipado com detector de fluorescência. Foi utilizada coluna de aço inox empacotada com sílica (marca Microsorb 100 Si, Varian, Walnut Creek, Estados Unidos) de 250 x 4,6 mm x 5 µm, fluxo de 1,2 mL/min e comprimento de onda de excitação em 290 nm e de emissão em 330 nm e como

fase móvel foi utilizado o n-hexano/álcool isopropílico (95,5:0,5 v/v). A identificação de tocoferóis foi feita por comparação com o tempo de retenção dos padrões puros analisados nas mesmas condições das amostras. A quantificação de cada isômero foi realizada por padronização externa com base nas áreas dos picos, utilizando padrões de α -, β -, γ - e δ -tocoferol (Supelco, Bellefonte, Estados Unidos), com grau de pureza de 99,9, 98, 99,4, e 99,6%, respectivamente. Os teores de tocoferóis foram expressos em mg/kg de óleo.

- Perfil de ácidos graxos

Foi determinada pelo método da AOCS Ce 2-66 (2009) por meio de cromatografia em fase gasosa com esterificação prévia das amostras. O método consiste de metilação alcalina a frio da amostra e extração com n-hexano. Para a análise cromatográfica de ácidos graxos utilizou-se cromatógrafo gasoso, (modelo GC 3900, Varian, Walnut Creek, Estados Unidos), equipado com detector de ionização de chama, injetor e amostrador automático. Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida CP-Sil 88 de 60 m de comprimento, com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura de filme de 0,20 μ m. A temperatura inicial da coluna foi 90°C por 4 minutos, aquecida a 10°C/min até 195°C e mantida em isoterma durante 16 minutos. As temperaturas utilizadas no injetor e no detector foram 230 e 250°C, respectivamente. O gás de arraste foi o hidrogênio com velocidade linear de 30 mL/min. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção de padrões puros de ésteres metílicos de ácidos graxos com os componentes separados das amostras e a quantificação foi feita por normalização de área (%). Utilizando-se como padrão uma mistura composta de 37 ésteres etílicos de ácidos graxos (Supelco, Bellefonte, Estados Unidos), de C16:0 a C18:3n3, com pureza entre 99,1 e 99,9%.

- Perfil de fitosteróis

Determinada por cromatografia gasosa, a partir da matéria insaponificável, realizada conforme Duchateau et al. (2002). Foi utilizado cromatógrafo gasoso (modelo GC-2010 Plus, Shimadzu, Tóquio, Japão) equipado com detector de ionização de chama, injetor e amostrador automático. Os compostos foram separados em coluna capilar de sílica fundida Restek RTX 5, de 30 m de

comprimento, com diâmetro interno de 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 μ m. A temperatura da coluna inicializou-se em 300°C por 12 min, as temperaturas utilizadas no injetor e no detector foram 280 e 320°C, respectivamente. O gás de arraste foi o hidrogênio com velocidade linear de 15 mL/min. Os fitosteróis foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos padrões puros analisados nas mesmas condições das amostras. A quantificação de cada isômero foi feita por padronização interna (β -colestanol = 5 α -cholestano-3 β -ol, grau de pureza de 95%) com base nas áreas dos picos, utilizando padrões de campesterol, estigmasterol, β -sitosterol e estigmastanol (Supelco, Bellefonte, Estados Unidos), com grau de pureza de 99, 95, 98 e 97,4%, respectivamente. Os teores de fitosteróis individuais foram expressos como mg/kg de óleo.

4.4 Análise estatística

O trabalho foi realizado em esquema fatorial 4 x 3 (tratamentos x tempos de estocagem), no delineamento inteiramente casualizado, cujos resultados obtidos das determinações analíticas foram submetidos à análise de variância e as diferenças entre as médias foram testadas a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey por meio do programa ESTAT – Sistema para Análises Estatísticas, versão 2.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises nos extratos

5.1.1 Rendimento

No presente estudo, os valores de rendimento dos extratos etanólicos de cálices e sementes de hibisco foram 8,4% e 1,08%, respectivamente (Tabela 4). Orisakwe; Husaini e Afonne (2004) e Jung e Joo (2013) encontraram rendimentos de 22% e 38%, respectivamente, para os extratos aquosos de cálices de hibisco. A diferença entre os resultados encontrados pode ser justificada pelos diferentes métodos utilizados para extração, tipos de solventes e diferenças no teor de umidade.

Tabela 4 – Rendimento, umidade, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos de cálices e sementes de hibisco.

Análises	Cálices	Sementes
Rendimento (%)	8,40 ^a	1,08 ^b
Umidade (% b.u.)	88,73 ± 0,20 ^a	75,98 ± 3,31 ^b
Compostos fenólicos totais (mg EAG/g)	64,18 ± 0,01 ^a	5,06 ± 0,02 ^b
Atividade antioxidante		
DPPH (%)	65,40 ± 1,99 ^a	24,30 ± 2,07 ^b
FRAP (µM trolox/g)	155,25 ± 0,03 ^a	13,14 ± 0,07 ^b
β-caroteno/ácido linoleico (%)	39,30 ± 0,01 ^a	41,20 ± 0,01 ^a

Médias ± desvios padrões das análises em duplicata.

Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

Diversos estudos têm mostrado que a eficiência da extração de compostos antioxidantes pode ser influenciada pelas condições em que o processo de extração é realizado, incluindo o tipo de solvente, temperatura e tempo de extração (GONZALEZ-MONTELONGO; LOBO; GONZALEZ, 2010; MOHD-ESA et al., 2010; SINDI; MARSHALL; MORGAN, 2014).

Como cada fonte natural apresenta características específicas de estrutura e composição, quando combinados com solventes, o resultado da interação soluto-

solvente tem comportamento imprevisível (SOUSA et al., 2008).

5.1.2 Umidade

De acordo com os resultados obtidos, os cálices e sementes de hibisco apresentaram conteúdos de umidade de 88,73 e 75,98%, respectivamente, em base úmida (Tabela 4). Resultado similar foi encontrado por Ismail, Ikram e Nazri (2008) que mostraram que os cálices de hibisco *in natura* contêm 84,5% de umidade. Para as sementes, o teor de umidade obtido por Hainida et al. (2008) foi de 99,3%, valor superior a este estudo. Essa diferença possivelmente pode ser devido a variação climática, estágio de maturação, quantidade de incidência solar e local da plantação. Por outro lado, Rao (1996) encontrou teor de umidade de 76% das sementes, valor próximo ao obtido deste estudo.

5.1.3 Compostos fenólicos totais

A concentração dos compostos fenólicos totais presentes no extrato de cálices de hibisco foi de 64,18 mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato (Tabela 4). Linares et al. (2015) avaliaram os teores de compostos fenólicos totais de extratos etanólicos de cálices em diferentes variedades de hibisco, e valores semelhantes a este estudo foram encontrados em três variedades (60, 64 e 68 mg EAG/g), assim como o estudo de Mercado et al. (2015), que apresentaram teor de compostos fenólicos totais de 63,65 mg EAG/g de extrato de cálices de hibisco.

O teor de compostos fenólicos totais presentes no extrato de sementes de hibisco foi de 5,06 mg de EAG/g de extrato, semelhante ao encontrado por Mohd-esa (2010) que, ao comparar o teor de compostos fenólicos totais de diferentes partes do hibisco, concluiu que no extrato metanólico de hibisco obteve-se 4,87 mg EAG/g em comparação com outras partes do hibisco (flores, folhas e cálices). Isso mostra que em ambos os processos de extração alcoólica, tanto etanólica quanto metanólica, os valores de compostos fenólicos totais presentes foram similares. Devido a polaridade dos solventes, o etanol e o metanol são os solventes mais indicados como meios extratores para determinação de compostos fenólicos totais,

uma vez que, a escolha apropriada do solvente é importante já que os compostos vegetais a serem extraídos apresentam natureza distinta e polaridades diferentes (ALOTHMAN; BHAT; KARIM, 2009).

Diante desses resultados, o extrato de cálices de hibisco foi adicionado ao óleo de soja para ser estocado em estufa a 60°C por 12 dias.

5.1.4 Atividade antioxidante

As análises de variância para a atividade antioxidante estão apresentadas no Apêndice 1. Observa-se que o teste foi significativo ($p < 0,01$) para os tratamentos estudados para os métodos de DPPH e FRAP.

A Tabela 4 apresenta atividade antioxidante dos extratos de cálices e sementes de hibisco de acordo com métodos de DPPH, FRAP e β -caroteno/ácido linoleico. O extrato de cálices de hibisco apresentou maior atividade antioxidante quando comparado ao extrato de sementes, demonstrando sua eficácia na inibição da reação oxidativa por meio dos mecanismos de ação dos métodos DPPH e FRAP.

Linares et al. (2015) avaliaram a capacidade antioxidante de extratos etanólicos de 25 variedades de hibisco cultivadas em mesmas condições, pelo método de DPPH. Os valores encontrados variaram de 27,4 a 112,0 μM trolox/g hibisco e apontaram quatro variedades de extrato de cálices de hibisco que apresentaram valores semelhantes a este estudo de atividade antioxidante pelo método de DPPH. Ainda, concluíram que, a variedade de hibisco é importante em relação ao conteúdo total e à distribuição dos fitoquímicos (fenólicos e flavonoides), já que em diversas variedades provavelmente possuíam diferentes estruturas químicas e concentrações de compostos bioativos, que vão estar diretamente relacionadas com a atividade antioxidante.

Anokwuru et al. (2011) utilizaram diferentes tipos de solventes para obtenção dos extratos de cálices de hibisco e avaliaram a atividade antioxidante pelo método DPPH. O método de extração utilizando etanol como solvente apresentou 69% de atividade antioxidante, enquanto que, pela extração aquosa foi de 63%, ambos os valores próximos a este estudo. A diferença é provavelmente devido à característica do solvente que pode afetar os compostos extraídos da planta. A mudança na polaridade do composto antioxidante devido ao uso do solvente utilizado faz com

que aumente a polaridade do solvente, obtendo maior rendimento de extração destes compostos. Outros fatores que podem influenciar fortemente a atividade antioxidante são a concentração de antioxidantes, a temperatura e pH (MOHD-ESA et al., 2010).

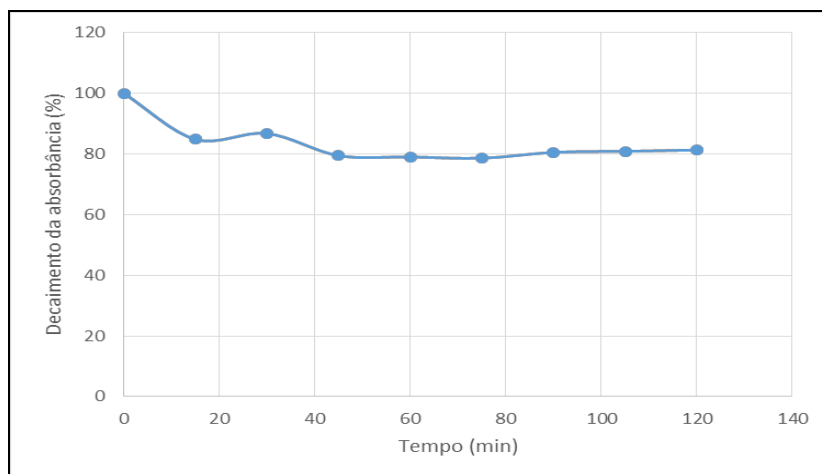
Ou et al. (2002) ao comparar atividade antioxidante de diferentes vegetais (cenoura, ervilha, tomate, cebola, repolho, brócolis, espinafre, beterraba) verificaram que a atividade antioxidante pelo método FRAP variou de 17 a 86 μM trolox/g, valores inferiores ao encontrado neste estudo, quando comparados ao extrato de cálices de hibisco. Assim como Jorge et al. (2015) avaliaram a capacidade antioxidante de extratos de diferentes variedades de pimenta, sendo que os valores de FRAP foram inferiores variando de 48,9 a 143,1 μM de Trolox/mg.

Pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, Mohd-esa (2010) avaliou atividade antioxidante de diferentes partes do hibisco e encontrou 61,5% de atividade antioxidante nos extratos metanólicos de cálices e 78,7% no extrato de sementes. Valores superiores aos encontrados neste estudo, para o extrato de sementes, que pode ser explicado pela diferença de solvente utilizado na metodologia de extração, já que a extração foi feita com metanol. Em ambos os extratos, cálices e sementes de hibisco, não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) de atividade antioxidante por este método.

Pela curva cinética da taxa de degradação *versus* tempo (Figura 14) pode-se observar que houve um baixo decaimento da absorbância nos primeiros 40 minutos de reação e, após este período, a curva se manteve constante para o extrato de cálices de hibisco.

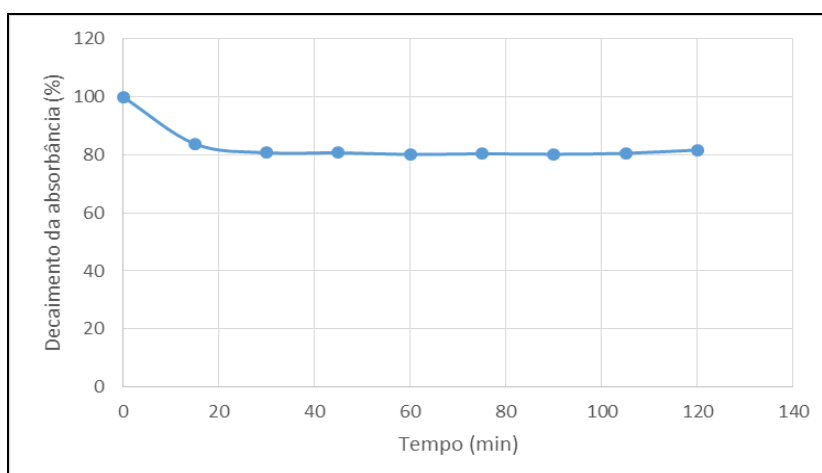
A presença de antioxidantes no sistema β -caroteno/ácido linoleico protege o ácido linoleico, prolongando o período de formação dos radicais livres. Quanto menor a queda na absorbância da amostra, mais potente é o antioxidante em impedir a degradação do β -caroteno (HUANG; WANG, 2004).

Figura 14 – Curva cinética da atividade antioxidante do extrato de cálices de hibisco para o sistema β -caroteno/ácido linoleico.



Pode-se observar na Figura 15, que para o extrato de sementes de hibisco, a curva se manteve constante após 20 minutos. Isso mostra que o extrato de sementes atuou como antioxidante assim como mostra os valores de atividade antioxidante que foi semelhante para o extrato de sementes quando comparado ao extrato de cálices de hibisco.

Figura 15 – Curva cinética da atividade antioxidante do extrato de sementes de hibisco para o sistema β -caroteno/ácido linoleico.



5.2 Análises no óleo de soja

As análises de variância para as determinações de peróxidos, *p*-anisidina,

valor Totox e estabilidade oxidativa apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) para os tratamentos, tempos e interação tratamentos x tempos (Apêndice 2). As médias dos valores estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Médias de índice de peróxidos, *p*-anisidina, valor Totox e estabilidade oxidativa para a interação tratamentos x tempos de estocagem a 60°C.

Análises / Tratamentos	Tempos de estocagem (dias)		
	0	6	12
Peróxidos (meq/kg)			
OS	0,82 ± 0,04 ^{Ac}	25,98 ± 1,11 ^{Bb}	51,92 ± 0,44 ^{aB}
Tocoferol	0,49 ± 0,02 ^{Ac}	27,38 ± 0,08 ^{Ab}	64,75 ± 0,67 ^{Aa}
Extrato	0,20 ± 0,01 ^{Ac}	2,71 ± 0,01 ^{Db}	9,88 ± 0,02 ^{Ca}
Mistura	1,27 ± 0,02 ^{Ac}	5,16 ± 0,20 ^{Cb}	7,18 ± 0,03 ^{Da}
<i>p</i>-anisidina			
OS	4,36 ± 0,09 ^{Ac}	6,82 ± 0,05 ^{Ab}	8,97 ± 0,11 ^{Aa}
Tocoferol	4,03 ± 0,01 ^{Ac}	5,97 ± 0,02 ^{Bb}	9,35 ± 0,07 ^{Aa}
Extrato	2,93 ± 0,04 ^{Ba}	2,67 ± 0,11 ^{Ca}	3,34 ± 0,01 ^{Ba}
Mistura	2,39 ± 0,01 ^{Bb}	2,64 ± 0,08 ^{Cb}	3,90 ± 0,34 ^{Ba}
Valor Totox			
OS	6,01 ± 0,03 ^{Ac}	58,79 ± 5,44 ^{Ab}	112,81 ± 0,98 ^{Ba}
Tocoferol	5,01 ± 0,12 ^{Ac}	60,73 ± 0,50 ^{Ab}	138,85 ± 1,90 ^{Aa}
Extrato	3,33 ± 0,04 ^{Ac}	8,10 ± 0,06 ^{Cb}	23,10 ± 0,09 ^{Ca}
Mistura	4,93 ± 0,11 ^{Ac}	12,96 ± 0,38 ^{Bb}	18,27 ± 0,94 ^{Da}
Estabilidade oxidativa (h)			
OS	4,50 ± 0,03 ^{Ca}	3,39 ± 0,02 ^{Cb}	2,26 ± 0,01 ^{Cc}
Tocoferol	4,61 ± 0,01 ^{Ca}	3,47 ± 0,01 ^{Cb}	2,40 ± 0,01 ^{Cc}
Extrato	10,39 ± 0,01 ^{Aa}	7,40 ± 0,01 ^{Ab}	5,41 ± 0,02 ^{Ac}
Mistura	9,68 ± 0,03 ^{Ba}	6,64 ± 0,02 ^{Bb}	4,89 ± 0,01 ^{Bc}

OS: óleo de soja; Tocoferol: óleo de soja + 300 mg/kg de α -tocoferol; Extrato: óleo de soja + 300 mg/kg de fenólicos; Mistura: óleo de soja + 300 mg/kg de α -tocoferol + 300 mg/kg de fenólicos. Médias ± desvios padrões seguidas de mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Médias ± desvios padrões seguidas de mesmas letras maiúsculas nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

5.2.1 Índice de peróxidos

Houve um aumento significativo do índice de peróxidos para os tratamentos ao longo do tempo de estocagem. Para Extrato e Mistura houve menor formação de peróxidos em comparação ao OS e Tocoferol, revelando a eficácia do extrato de hibisco na conservação da qualidade do óleo. E mesmo em 12 dias de estocagem, os valores de peróxidos para Extrato e Mistura foram inferiores ao valor máximo permitido para óleos vegetais refinados (10 meq/kg) (CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION, 2009).

Nyam et al. (2013) encontraram resultado similar ao analisar a estabilidade oxidativa do óleo de girassol adicionado de extrato de cálices de hibisco sob estocagem acelerada, e obtiveram valores de peróxidos menores quando comparados ao óleo adicionado de antioxidante sintético BHA durante a estocagem, evidenciando maior potencial antioxidante do extrato de hibisco.

No início da estocagem, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Já nos tempos 6 e 12 dias, o Extrato e a Mistura também apresentaram valores inferiores quando comparados com o OS e Tocoferol.

5.2.2 Índice de *p*-anisidina

O índice de *p*-anisidina para os tratamentos apresentou-se menor para o Extrato e Mistura, independentemente do tempo de estocagem. A formação desses compostos secundários da oxidação lipídica foi mais estável nestes tratamentos conforme os tempos de estocagem. Para o Extrato, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos de estocagem, o que indica que o extrato de hibisco apresentou potencial atividade antioxidante para a formação destes compostos secundários, inclusive em comparação ao antioxidante natural α -tocoferol.

Nyam et al. (2013) avaliaram o efeito antioxidante do extrato de cálices de hibisco em comparação ao antioxidante sintético BHA e concluíram que o BHA foi mais eficaz ao retardar a oxidação de produtos secundários em comparação com os produtos de oxidação primária, quando adicionados no óleo de girassol. No presente estudo, o conteúdo de *p*-anisidina do óleo de soja adicionado de extrato de hibisco foi menor do que o óleo de girassol suplementado com extrato de hibisco.

Entre Extrato e Mistura, não houve diferença significativa ($p > 0,05$), conforme os tempos de estocagem. Em contrapartida, entre os tratamentos OS e Tocoferol, em 6 dias de estocagem, o Tocoferol apresentou menor formação de *p*-anisidina.

5.2.3 Valor Totox

Os valores Totox dos tratamentos aumentaram em função do tempo de estocagem. No início da estocagem, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Aos 6 e 12 dias, o Extrato e Mistura apresentaram menores valores Totox em relação ao OS e Tocoferol. Isso mostra que o α -tocoferol não foi tão eficaz quanto o extrato, o que retrata que na Mistura o extrato de hibisco atuou como melhor antioxidante.

Ao final do período de estocagem, os valores Totox dos tratamentos contendo extrato de hibisco mostraram-se significativamente menores, uma vez que os compostos fenólicos presentes atuam inibindo ou interrompendo a fase de iniciação e propagação da oxidação lipídica. Estes antioxidantes funcionam como receptores de radicais livres e os produtos formados são compostos estáveis e inativos para propagação das reações, além de atuarem prevenindo, também, a formação de novos radicais livres no processo de oxidação lipídica (BERDHAL; NAHAS; BARREN, 2010).

Houve um aumento do valor Totox em função do tempo de estocagem para os tratamentos. É importante que o valor Totox seja inferior a 10, pois quanto menor o valor, maior a estabilidade contra a oxidação lipídica (BERSET; CUEVELIER, 1996).

5.2.4 Estabilidade oxidativa

A estabilidade oxidativa é um parâmetro muito utilizado para avaliar os sinais de deterioração do óleo durante o armazenamento, simulando a vida de prateleira do produto, além de verificar a eficiência da adição de antioxidantes. Verifica-se que ao longo da estocagem, houve uma diminuição significativa no período de indução para todos os tratamentos.

Dentre os tratamentos, o Extrato foi o que obteve maiores valores de

estabilidade oxidativa, visto que o período de indução foi de 2,3 vezes maior quando comparado ao OS nos tempos 0, 6 e 12 dias de estocagem. O extrato de hibisco foi o antioxidante natural mais eficiente durante todo o período de estocagem.

De acordo com Ramalho e Jorge (2008), ao avaliar estabilidade oxidativa do óleo de soja adicionado de 1000 mg/kg de extrato de alecrim concluíram que, os períodos de indução foram 5,85, 0,60 e 0,41 horas para 0, 5 e 10 dias de estocagem acelerada em estufa, respectivamente, valores inferiores ao encontrado neste estudo. A Mistura apresentou maior estabilidade oxidativa que OS e Tocoferol. Os tratamentos contendo extrato de hibisco apresentaram maiores valores de estabilidade oxidativa quando comparados aos demais tratamentos, independentemente do tempo de estocagem. Assim como não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre OS e Tocoferol.

A Mistura apresentou maior estabilidade oxidativa que OS e Tocoferol. Os tratamentos contendo extrato de hibisco apresentaram maiores valores de estabilidade oxidativa quando comparados aos demais tratamentos, independentemente do tempo de estocagem. Assim como não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre OS e Tocoferol.

5.2.5 Perfil de tocoferóis

Observa-se pela Tabela 6 que houve uma redução dos isômeros de tocoferóis ao longo do período de estocagem e o isômero β -tocoferol não foi detectado.

Embora o Tocoferol tenha apresentado maiores teores do isômero α -tocoferol, o Extrato expressou maior eficiência na retenção deste isômero (96%) ao final da estocagem. Embora α -tocoferol é considerado o principal contribuinte para a atividade de vitamina E; o γ -tocoferol é considerado um antioxidante mais eficiente (AMAROWICZ; PEGG, 2008).

Para o isômero γ -tocoferol, o Extrato e a Mistura demonstraram maiores taxas de retenção, 99 e 96%, respectivamente. Ao final da estocagem, o Extrato diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos, com maior teor de γ -tocoferol.

Entretanto, para o isômero δ -tocoferol, OS e Tocoferol apresentaram maiores teores de δ -tocoferol aos 12 dias de estocagem.

Tabela 6 – Médias de tocoferóis para a interação tratamentos x tempos de estocagem a 60°C.

Análises /	Tempos de estocagem (dias)			%
Tratamentos	0	6	12	retenção
α-tocoferol (mg/kg)				
OS	38,62 ± 0,01 ^{Ca}	35,29 ± 0,01 ^{Db}	18,00 ± 0,01 ^{Dc}	46,6
Tocoferol	184,76 ± 0,01 ^{Aa}	149,53 ± 0,01 ^{Ab}	94,04 ± 0,04 ^{Ac}	50,9
Extrato	38,28 ± 0,02 ^{Ca}	37,77 ± 0,01 ^{Cb}	36,75 ± 0,02 ^{Cc}	96
Mistura	170,74 ± 0,02 ^{Ba}	149,08 ± 0,01 ^{Bb}	58,53 ± 0,01 ^{Bc}	34,3
γ-tocoferol (mg/kg)				
OS	161,60 ± 0,01 ^{Ba}	153,43 ± 0,01 ^{Cb}	149,95 ± 0,01 ^{Bc}	92,8
Tocoferol	179,51 ± 0,01 ^{Aa}	157,33 ± 0,01 ^{Ab}	145,30 ± 0,03 ^{Cc}	80,9
Extrato	154,61 ± 0,01 ^{Da}	153,97 ± 0,01 ^{Bb}	153,38 ± 0,16 ^{Ac}	99,2
Mistura	155,63 ± 0,01 ^{Ca}	152,64 ± 0,04 ^{Db}	149,54 ± 0,08 ^{Bc}	96,1
δ-tocoferol (mg/kg)				
OS	51,33 ± 0,01 ^{Ca}	50,38 ± 0,01 ^{Bb}	46,94 ± 0,04 ^{Bc}	91,4
Tocoferol	54,18 ± 0,01 ^{Aa}	51,42 ± 0,03 ^{Ab}	49,38 ± 0,01 ^{Ac}	91,1
Extrato	51,48 ± 0,01 ^{Ca}	44,42 ± 0,05 ^{Db}	43,90 ± 0,01 ^{Dc}	85,3
Mistura	52,22 ± 0,01 ^{Ba}	47,40 ± 0,01 ^{Cb}	46,20 ± 0,01 ^{Cc}	88,5
Totais (mg/kg)				
OS	251,55 ± 0,01 ^{Ca}	239,11 ± 0,03 ^{Cb}	214,90 ± 0,11 ^{Dc}	85,4
Tocoferol	418,25 ± 0,01 ^{Aa}	358,28 ± 0,01 ^{Ab}	288,72 ± 0,08 ^{Ac}	69,0
Extrato	244,38 ± 0,03 ^{Da}	236,17 ± 0,02 ^{Db}	234,03 ± 0,45 ^{Cc}	95,7
Mistura	378,59 ± 0,05 ^{Ba}	349,13 ± 0,07 ^{Bb}	254,27 ± 0,01 ^{Bc}	67,2
Vitamina E*				
OS	61,12 ± 0,01 ^{Ca}	56,67 ± 0,01 ^{Db}	38,88 ± 0,01 ^{Dc}	63,6
Tocoferol	209,73 ± 0,01 ^{Aa}	171,45 ± 0,01 ^{Ab}	114,30 ± 0,05 ^{Ac}	54,5
Extrato	59,84 ± 0,02 ^{Da}	59,18 ± 0,01 ^{Cb}	58,06 ± 0,04 ^{Cc}	97,0
Mistura	192,44 ± 0,03 ^{Ba}	170,33 ± 0,01 ^{Bb}	79,35 ± 0,01 ^{Bc}	41,2

OS: óleo de soja; Tocoferol: óleo de soja + 300 mg/kg de α-tocoferol; Extrato: óleo de soja + 300 mg/kg de fenólicos; Mistura: óleo de soja + 300 mg/kg de α-tocoferol + 300 mg/kg de fenólicos. Médias ± desvios padrões seguidas de mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Médias ± desvios padrões seguidas de mesmas letras maiúsculas nas colunas não diferem pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

*Vitamina E (mg/kg) = α-tocoferol + (β-tocoferol + γ-tocoferol) x 0,25 + δ-tocoferol x 0,01 (KORNSTEINER; WAGNER; ELMADFA, 2006).

Silva e Jorge (2014) avaliaram a retenção de tocoferóis no óleo de soja adicionado de extratos de cogumelos e antioxidantes sintéticos, e concluíram que o tratamento com extrato de cogumelo *A. blazei* e com TBHQ foram os mais eficazes na retenção de β , γ e δ -tocoferol. O α -tocoferol foi o isômero menos resistente ao período de estocagem.

Em relação aos tocoferóis totais houve uma redução em função do tempo de estocagem. Tocoferol e Mistura apresentaram os maiores valores. O Extrato destacou-se na retenção dos tocoferóis totais (95%) ao final da estocagem, similar ao estudo de Ramalho e Jorge (2008) que avaliaram o óleo de soja adicionado de extrato de alecrim (1000 mg/kg) submetido a 10 horas de termoxidação, e concluíram que o alecrim apresentou boa eficiência em proteger o óleo de soja (95% de retenção de tocoferóis totais).

Observa-se que os teores de vitamina E decaíram significativamente ao longo do tempo de armazenamento. A vitamina E atua como antioxidante não enzimático, sendo o α -tocoferol o antioxidante capaz de interromper as reações de oxidação lipídica agindo diretamente na remoção dos radicais livres, conferindo proteção dos ácidos graxos das membranas celulares e lipoproteínas.

Dentre os tratamentos, o Tocoferol e Mistura foram os que apresentaram maiores teores de vitamina E. Porém, a Mistura não promoveu sinergia entre os antioxidantes naturais, já que apresentou valor inferior de vitamina E quando comparado ao Tocoferol.

5.3 Análises no óleo de hibisco

5.3.1 Teor lipídico

O teor de óleo das sementes de hibisco foi de 20%, similar ao estudo de Mohamed et al. (2007) que encontraram rendimento de 19% para o óleo de hibisco. As sementes de uva possuem menor teor de óleo presentes quando comparados a semente de hibisco, sendo 14% (PORTO; PORRETTO; DECORTI, 2013).

O óleo de sementes de hibisco é líquido, em temperatura ambiente, apresenta coloração esverdeada e é considerado um alimento valioso já que apresenta conteúdo proteico e calórico e quantidades substanciais de fibras e micronutrientes

(Figura 16). São compostos predominantemente de ácidos oleico e α -linolênico, além dos fitosteróis, responsáveis pela redução do colesterol dietético (NYAM et al., 2009).

Figura 16 – Óleo de hibisco.



Fonte: Elaborada pelo autor.

5.3.2 Clorofila

O teor de clorofila presente no óleo de hibisco foi de 21,24 mg/kg, elevado quando comparado ao óleo de abacate, 18,96 mg/kg, e ao azeite de oliva, 13,53 mg/kg, ambos com coloração esverdeada (JORGE et al., 2015; NORA et al., 2016).

A quantidade de clorofila presente no óleo de hibisco é considerada alta, já que o óleo apresenta coloração esverdeada, porém isso pode influenciar na qualidade do óleo já que a clorofila em grandes concentrações pode atuar como pró-oxidante, reduzindo a estabilidade oxidativa e a vida de prateleira.

5.3.3 Perfil de ácidos graxos

A porcentagem de ácidos graxos insaturados totais no óleo de hibisco foi de 1,6 vezes maiores que os saturados. O óleo de sementes de hibisco consiste em 38,46% de gorduras saturadas e 61,54% de ácidos graxos insaturados.

Os principais ácidos graxos saturados encontrados no óleo de hibisco foram o palmítico e o esteárico como pode ser observado na Tabela 7. Este resultado é coerente já que o palmítico é o ácido graxo saturado mais encontrado nos óleos

vegetais (ORSAVOVA et al., 2015).

Tabela 7 – Médias de ácidos graxos para o óleo de hibisco.

Ácidos graxos	%
Palmítico (16:0)	33,37 ± 0,13
Esteárico (18:0)	5,10 ± 0,01
Oleico (C18:1n9c)	26,10 ± 0,08
Linoleico (C18:2n6c)	35,04 ± 0,06
α-linolênico (C18:3n3)	0,41 ± 0,01
Oleico/linoleico	0,74
Saturados	38,46 ± 0,13
Insaturados	61,54 ± 0,13
SAT/INS	1/1,60

Médias ± desvios padrões das análises em duplicata.

A qualidade dos óleos vegetais comestíveis é determinada pela quantidade e composição em ácidos graxos insaturados. Dentre os ácidos graxos insaturados presentes, os majoritários foram o ácido linoleico, oleico e α-linolênico. A presença de ácidos graxos essenciais, como o ácido linoleico e o α-linolênico são muito importantes nutricionalmente já que são responsáveis por várias funções no organismo, como a manutenção da membrana celular, função cerebral, síntese de hemoglobina e na divisão celular. Estes ácidos graxos essenciais não são sintetizados pelo organismo, sendo necessário serem adquiridos pela dieta (MEINHART et al., 2017).

E quanto maior a quantidade de ácido oleico em relação ao linoleico, melhor a qualidade do óleo, contribuindo nutricionalmente para redução do colesterol total, LDL e triglicérides (RASTOGI et al., 2004). No presente estudo o valor da relação oleico/linoleico foi de 0,74, maior quando comparado ao óleo de feijão preto, na qual a relação oleico/linoleico foi de 0,58 (UMEDA; LUZIA; JORGE, 2018) e inferior ao óleo de abacate, 45,6 (JORGE et al., 2015). A relação entre o teor de ácido oleico e linoleico é indicativo de qualidade do óleo, pois quanto maior a quantidade de ácido poli-insaturado em relação ao mono-insaturado, menor é a vida de prateleira e a formação do colesterol LDL.

Mohamed et al. (2007) avaliaram a caracterização e atividade antioxidante do

óleo de hibisco extraído pelo método de Soxhlet e obteve maiores teores de ácidos oleico, 28,67%, e linoleico, 40,10%, ao comparar com este estudo.

Assim como Umeda, Luzia e Jorge (2018) avaliaram os compostos bioativos do óleo de feijão em diferentes tratamentos e verificaram mais de 50% de ácidos graxos insaturados presentes. O alto teor de ácidos graxos insaturados também presentes no óleo de hibisco é consistente com a alta quantidade de antioxidantes presentes, além da presença de fitosteróis e tocoferóis (Tabela 9 e 10). É uma importante fonte de ácidos graxos poli-insaturados, fibras e proteínas que são responsáveis pela redução na absorção do colesterol e do risco de doenças cardiovasculares (HAINIDA et al., 2008).

Comparando a relação entre o total de ácidos graxos saturados e insaturados deste trabalho pode-se observar que foi inferior aos citados por Malacrida, Kimura e Jorge (2012) para os óleos de sementes de laranja (1/2,08), limão (1/2,96) e tangerina (1/2,40).

A capacidade antioxidante também é considerada um dos fatores responsáveis pelo efeito hipocolesterolêmico, porém, neste estudo, as sementes não tiveram resultados satisfatórios quanto ao seu efeito antioxidante.

5.3.4 Perfil de fitosteróis

Os fitosteróis exercem diversas funções como, por exemplo, a redução de colesterol e propriedades antiinflamatórias, antibacterianas, antifúngicas, antiulcerativas e antitumorais (MOHAMED et al., 2007).

De fato, cerca de 95% dos fitosteróis totais encontrados nos alimentos são compostos de β -sitosterol, campesterol e estigmasterol (YANG, 2009). Dentre os isômeros de fitosteróis que foram detectados no óleo de hibisco, o β -sitosterol foi o mais abundante, representando 27,71%, assim como na maioria dos óleos vegetais (Tabela 8). Yang (2009) avaliou o teor de fitosteróis em diversos tipos de castanhas e o β -sitosterol também foi o isômero em maior concentração, seguidos pelo campesterol e estigmasterol.

Tabela 8 – Médias de fitosteróis para o óleo de hibisco.

Fitosteróis	mg/kg	%
Campesterol	8,29 ± 0,13	18,22
Estigmasterol	3,78 ± 0,59	8,31
β-sitosterol	27,71 ± 0,30	60,90
Estigmastanol	5,72 ± 0,25	12,57
Totais	45,50 ± 0,67	100

Médias ± desvios padrões das análises em duplicata.

5.3.5 Perfil de tocoferóis

O isômero β-tocoferol não foi identificado no óleo de hibisco como pode ser observado na Tabela 9. Em contrapartida, o α-tocoferol foi o isômero que apresentou maior quantidade, seguido pelo γ-tocoferol. Semelhante ao estudo de Yang (2009) que avaliou o teor de tocoferóis de diferentes tipos de castanhas (amêndoa, castanha do Brasil, nozes, macadâmia, amendoim, pistache) também não encontrou β-tocoferol, e apenas dois isômeros foram detectados, o α- e γ-tocoferol.

Tabela 9 – Médias de tocoferóis para o óleo de hibisco.

Tocoferóis	mg/kg	%
α-tocoferol	356,55 ± 0,49	76,55
γ-tocoferol	109,23 ± 0,87	23,45
Totais	465,78 ± 0,37	100
Vitamina E*	371,44 ± 0,38	79,74

Médias ± desvios padrões das análises em duplicata.

*Vitamina E (mg/kg) = α-tocoferol + (β-tocoferol + γ-tocoferol) x 0,25 + δ-tocoferol x 0,01 (KORNSTEINER; WAGNER; ELMADFA, 2006).

Esta classe de isômeros, além de atuar como antioxidante para proteger o alimento da oxidação e consequentemente conferir estabilidade, ainda é capaz de promover inúmeros benefícios à saúde humana, por meio de sua atividade de vitamina E. A vitamina E é uma vitamina lipossolúvel responsável pelo combate ao envelhecimento celular, já que retarda os danos causados pelos radicais livres, além de prevenir doenças cardiovasculares e degenerativas (PEH et al., 2016).

O teor de tocoferóis evidenciado pelo óleo de hibisco pode ser convertido

para 371,44 mg/kg de vitamina E expressa em α -tocoferol, por ser o isômero que apresenta a maior atividade de vitamina E em organismos vivos. Segundo as Dietary Reference Intakes (INSTITUTE DE MEDICINE, 2000), a ingestão diária recomendada de vitamina E para adultos varia de 11 a 15 mg/dia de α -tocoferol. De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o óleo de hibisco pode ser considerado fonte dessa vitamina.

6 CONCLUSÕES

O extrato de cálices de hibisco apresentou maiores teores de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (métodos DPPH e FRAP) em relação ao extrato de sementes. Pelo método β -caroteno/ácido linoleico, não houve diferença significativa entre os extratos de cálices e sementes.

Dentre os tratamentos, o Extrato promoveu maior eficiência na inibição da formação de compostos primários e secundários da oxidação lipídica, e proporcionou elevada estabilidade oxidativa ao óleo de soja quando comparado com o α -tocoferol. Porém, não se observou efeito sinérgico entre os antioxidantes naturais.

Ainda, o Extrato promoveu maior retenção de tocoferóis, principalmente dos isômeros α - e γ -tocoferol, que apresentaram maior estabilidade durante a estocagem acelerada em estufa.

Dentre os antioxidantes naturais estudados, o extrato de hibisco apresentou maior atividade antioxidante e capacidade em retardar a oxidação lipídica do óleo de soja durante a estocagem acelerada em estufa.

Embora o óleo de hibisco não tenha demonstrado valores relevantes de fitosteróis, apresentou clorofila, vitamina E e tocoferóis totais.

7 REFERÊNCIAS

ABIOVE – Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais. **Estatística mensal do complexo soja**. Disponível em: < <http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=estatistica&area=NC0yLTE=> > Acesso em: 18 de dezembro de 2018.

ABOU-ARAB, A. A.; ABU-SALEM, F. M.; ABOU-ARAB, E. A. Physico-chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*). **Journal of American Science**, New York, v. 7, n. 7, p. 445-456, 2011.

AL-HASHIMI, A. G. Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts. **African Journal of Food Science**, Basrah, v. 6, n. 21, p. 506-511, 2012.

ALMEIDA, P. L.; LIMA, S. N.; COSTA, L. L.; OLIVEIRA, C. C.; DAMASCENO, K. A.; SANTOS, B. A.; CAMPAGNOL, P. C. B. Effect of jabuticaba peel extract on lipid oxidation, microbial stability and sensory properties of Bologna-type sausages during refrigerated storage. **Meat Science**, Barking, v. 110, p.9-14, 2015.

ALOTHMAN, M.; BHAT, R.; KARIM, A. A. Antioxidant capacity and phenolic content of selected tropical fruits from Malaysia, extracted with different solvents. **Food Chemistry**, London, n. 115, p. 785-788, 2009.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B. Leguminosas como uma fonte de antioxidantes naturais. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 110, n. 10, p. 865-878, 2008.

ANDREO, D.; JORGE, N. Evaluation of the antioxidant capacity of ethanolic ginger extract (*Zingiber officinale*) in accelerated incubator-storage test. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 2, p. 152-157, 2007.

ANGELO, A. J. S. Lipid oxidation in foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 36, n. 3, p. 175-224, 1996.

ANOKWURU, C. P.; ESIABA, I.; AJIBAYE, O.; ADESUYI, A. O. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* calyx. **Research Journal of Medicinal Plant**, Dubai, v. 5, n. 5, p. 557-566, 2011.

ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim Centro de Pesquisa de 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**. 6 ed. Champaign: AOCS, 2009.

ARROYO, S. F.; MEDINA, I. C. R.; DEBÓN, R. B.; PASINI, F.; JOVEN, J.; MICOL, V.; CARRETERO, A. S.; GUTIÉRREZ, A. F. Quantification of the polyphenolic fraction and *in vitro* antioxidant and *in vivo* anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. **Food Research International**, Barking, v. 44, p. 1490-1495, 2011.

ATTA, M. B.; IMAIZUMI, K. Some characteristics of crude oil extracted from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds cultivated in Egypt. **Journal of Oleo Science**, Tokyo, v. 51, n. 7, p. 457-461, 2002.

BASU, H. N.; VECCHIO, A. J. D.; FLIDER, F.; ORTHOEFER, F. T. Nutritional and potential disease prevention properties of carotenoids. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Chicago, v. 78, n. 7, p. 665-675, 2001.

BERSET, C.; CUVELIER, M. E. Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidant power. **Sciences des Aliments**, Cachan, v. 16, n. 3, p. 219-245, 1996.

BERDHAL, D. R.; NAHAS, R. I., BARREN, J. P. Synthetic and natural antioxidant additives in food stabilization: current applications and future research. In: DECKER, E. A.; ELIAS, R. J.; McCLEMENTS, D. J. **Oxidation in foods and beverages and antioxidant application**. New Delhi: Woodhead, 2010, Cap. 12, p.272-320.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method for total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOCKISCH, M. Fat and oils handbook. In: BOCKISCH, M. **Vegetable Fats and Oils**. Champaign: AOCS Press, 1998, p. 174-344.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de hortaliças não-Convencionais. Brasília: MAPA/ACS, 2010. Disponível em:<http://www.abcsem.com.br/docs/manual_hortalicas_web.pdf> Acesso em: 17 de dez. de 2018.

BRASIL. Resolução RDC nº 64, de 16 de setembro de 2008. Aprova o “Regulamento Técnico sobre atribuição de aditivos e seus limites máximos para alimentos”. Órgão emissor: ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br>> Acesso em: 29 de nov. de 2017.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. M. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E., MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

CARVAJAL-ZABARRAL, O.; HAYWARD-JONES, P. M.; ORTA-FLORES, Z.; NOLASCO-HIPÓLITO, C.; BARRADAS-DERMITZ, D. M.; AGUILAR-USCANGA, M. G.; PEDROZA-HERNÁNDEZ, M. F. Effect of *Hibiscus sabdariffa* L. dried calyx ethanol extract on fat absorption-excretion, and body weight implication in rats. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Akron, v. 9, p. 1-5, 2009.

CICHON, R. M. Lipids in human nutrition. In: SIKORSKI, Z. Z. E.; KOLAKOWSKA, A. **Chemical and functional properties of food lipids**. Boca Raton: CRC Press, 2002, Cap. 10, p. 189-204.

CHONG, Y. M.; CHANG, S. K.; SIA, W.C. M.; YIM, H. S. Antioxidant efficacy of mangosteen (*Garcinia mangostana* Linn.) peel extracts in sunflower oil during accelerated storage. **Food Bioscience**, New York, v. 12, p. 18-25, 2015.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (FAO/WHO). **Codex standart for named vegetable oils: codex stan 210-1999**. Codex Alimentarius, v. 10, 2009.

CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento), 2017. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, safra 2016/17, v. 4, n. 11. Brasília, Brasil.

CRUZ, R.; CASAL, S. Direct analysis of vitamin A, vitamin E, carotenoids, chrolophylls and free sterols in animal and vegetable fats in a single normal-phase liquid chromatographic run. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1565, p. 81-88, 2018.

DIOSADY, L. L. Chlorophyll removal from edible oils. **International Journal of Applied Science and Engineering**, Wufeng, v. 3, n. 2, p. 81-88, 2005.

DUARTE, I. A, S.; BOTELHO, R. B. A.; AKUTSU, R. C. Regional food consumption in the Northeast of Brazil by the low-income population. **Journal of Culinary Science & Technology**, Florida, p. 1-15, 2017.

DUCHATEAU, G. S. M. J. E.; BAUER-PLANCK, C. G.; LOUTER, A. J. H.; VAN DER HAM, M.; BOERMA, J. A.; VAN ROOIJEN, J. J. M.; ZANDBELT, P. A. Fast and accurate method for total 4-desmethyl sterol(s) content in spreads, fat-bleands, and raw materials. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 79, n. 3, p. 273-278, 2002.

EZZAT, S. M.; SALAMA, M. M.; EL-DIN, S. H. S.; SALEH, S.; EL-LAKKANY, N. M.; HAMMAM, O. A. Metabolic profile and hepatoprotective activity of the anthocyanin-

rich extract of *Hibiscus sabdariffa* calyces. **Pharmaceutical Biology**, Giza, p. 1-10, 2016.

GOMES, M. S. O.; SINNECKER, P.; TANAKA, R. T.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Effect of harvesting and drying conditions on chlorophyll levels of soybean (*Glycine max* L. Merr). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Columbus, v. 51, p. 1634-1639, 2003.

GONZALEZ-MONTELONGO, R., LOBO, M. G., GONZALEZ, M. The effect of extraction temperature, time and number of steps on the antioxidant capacity of methanolic banana peel extracts. **Separation and Purification Technology**, New York, v. 71, n. 1, p. 347-355, 2010.

GUINAZI, M.; MILAGRES, R. C. R. M.; SANT'ANA, H. M. P.; CHAVES, J. B. P. Tocopherols and tocotrienols in vegetable oils and eggs. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2098-2103, 2009.

GUO, Q.; GAO, S.; SUN, Y.; GAO, Y.; WANG, X.; ZHANG, Z. Antioxidant efficacy of rosemary ethanol extract in palm oil during frying and accelerated storage. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 94, p. 82-88, 2016.

GUZMAN, R.; TANG, H.; SALLEY, S.; SIMON, K. Y. Synergistic effects of antioxidants on the oxidative stability of soybean oil and poultry fat-based biodiesel. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Chicago, v. 86, p. 459-467, 2009.

HAINIDA, K. I. E.; AIMIN, I.; NORMAH, H.; MOHD-ESA, N. Nutritional and amino acid contents of differently treated Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds. **Food Chemistry**, London, v. 111, p. 906-911, 2008.

HAINIDA, E.; ISMAIL, A.; HASHIM, N.; MOHD-ESA, N.; ZAKIAH, A. Effects of deffated dried roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed powder on lipid profiles of hypercholesterolemia rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 88, p. 1043-1050, 2008.

HALIMATUL, S. M. N.; AMIN, I.; MOHD.-ESA, N.; NAWALYAH, A. G.; MUSKINAH, M. Protein quality of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds. **Asean Food Journal**, Selangor Darul Ehsan, v. 14, p. 131-140, 2007.

HOPKINS, A. L.; LAMM, M. G.; FUNK, J. L.; RITENBAUGH, C. *Hibiscus sabdariffa* L. in the treatment of hypertension and hyperlipidemia: A comprehensive review of animal and human studies. **Fitoterapia**, Milano, v. 85, p. 84-94, 2013.

HORUZ, T. I.; MASKAN, M. Effect of the phytochemicals curcumin, cinnamaldehyde, thymol and carvacrol on the oxidative stability of corn and palm oils at frying temperatures. **Journal of Food Science and Technology**, London, v. 52, n. 12, p. 8041-8049, 2015.

HRAS, A. R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. **Food Chemistry**, London, v.71, p. 229-233, 2000.

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

Institute de Medicine. Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington (DC): National Academies Press; 2000.

ISMAIL, A.; IKRAM; E. H. K.; NAZRI, H. S. M. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds – Nutritional composition, protein quality and health benefits. **Food – Global Science Books**, Isleworth, v.1, p. 1-16, 2008.

JIANG, Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 72, p. 76-90, 2014.

JOHNSON, D. R.; DECKER, E. A. The role of oxygen in lipid oxidation reactions: A review. **Annual Review of Food Science and Technology**, London, v. 6, p. 171-190, 2015.

JORGE, T. S.; POLACHINI, T. C.; DIAS, L. S.; JORGE, N.; ROMERO, J. T. Physicochemical and rheological characterization of avocado oils. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v. 39, n. 4, p. 390-400, 2015.

JORGE, N., VERONEZI, C. M.; PEREIRA, D. C. Extracts of red peppers: antioxidant activity and sensory evaluation. **Nutrition & Food Science**, Bingley, v. 46, n. 2, p. 228-236, 2016.

JUNG, E.; JOO, N. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and soybean oil effects on quality characteristics of pork patties studied by response surface methodology. **Meat Science**, Barking, v. 94, p.391-401, 2013.

KANNER, J. Oxidative process in meat and meat products: Quality implications. **Meat Science**, Barking, v. 36, p. 169-189, 1994.

KORNSTEINER, M.; WAGNER, K. H.; ELMADFA, I. Tocopherols and total phenolics in 10 different nut types. **Food Chemistry**, London, v. 98, n. 2, p. 381-387, 2006.

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

LINARES, I. B.; ARROYO, S. F.; ROMAN, D. A.; SUÁREZ, P. A. P.; DÍAZ, R. D. V.; GONZÁLES, I. A.; GUTIÉRREZ, A. F.; LEYVA, J. F. G.; CARRETERO, A. S. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 69, p. 385-394, 2015.

LIU, C.; LI, J.; BI, Y.; WANG, X.; SUN, S.; YANG, G. Thermal Losses of Tertiary Butylhydroquinone (TBHQ) and its effect on the qualities of palm oil. **Journal of Oleo Science**, Tokyo, v. 65, n. 9, p. 739-748, 2016.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Antioxidant activity of lemon (*Citrus limon*) seed extract added to soybean oil in accelerated incubator-storage test. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 946-949, 2009.

MAHADEVAN, N.; SHIVALI; KAMBOJ, P. *Hibiscus sabdariffa* Linn. – An overview. **Natural Product Radiance**, Punjab, v. 8, n. 1, p. 77-83, 2009.

MALACRIDA, C. R.; KIMURA, M.; JORGE, N. Phytochemicals and antioxidant activity of citrus seed oils. **Food Science and Technology Research**, Basel, v. 18, n. 3, p. 399-404, 2012.

MALACRIDA; A.; MAGGIONI, D.; CASSETTI, A.; NICOLINI, G.; CAVALETTI, G.; MILOSO, M. Antitumoral effect of *Hibiscus sabdariffa* on human squamous cell carcinoma and multiple myeloma cells. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 68, n. 7, p. 1161-1170, 2016.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 45, n. 9, p. 594-598, 1968.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA M.; SOUSA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MELO, P. S.; ARRIVETTI, L. O. R.; ALENCAR, S. M.; SKIBSTED, L. H. Antioxidative and prooxidative effects in food lipids and synergism with α -tocopherol of açai seed extracts and grape rachis extracts. **Food Chemistry**, London, v. 213, p. 440-449, 2016.

MENDOZA, J. S.; LÓPEZ, A. D.; GALINDO, S. N.; SANDOVAL, J. A. L. Some physical properties of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds as a function of moisture content. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 87, n. 3, p. 391-397, 2008.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidante activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy research**, Hoboken, v. 15, p.127-130, 2001.

MERCADO, G. M.; BENITEZ, F. J. B.; RODRÍGUEZ, G. R. V.; GONZÁLEZ, E. M.; AGUILAR, G. A. G.; PARRILLA, E. A.; AYERDI, S. G. S. Bioaccessibility of polyphenols released and associated to dietary fibre in calyces and decoction residues of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Journal of Functional Foods**, Barking, v. 18, p. 171-181, 2015.

MEINHART, A. D.; SILVEIRA, T. F. F.; MORAES, M. R.; PETRARCA, M.H.; SILVA, L. H.; OLIVEIRA, W. S.; WAGNER, R.; BOLINI, H. M. A.; BRUNS, R. E.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Optimization of frying oil composition rich in essential fatty acids by mixture design. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 84, p. 795-803, 2017.

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

MOHAMED, R.; FERNANDEZ, J.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) seed oil is a rich source of gamma-tocopherol. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 72, p. 207-211, 2007.

MOHD-ESA, N.; HERN, F. S.; ISMAIL, A.; YEE, C. L. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. **Food Chemistry**, London, v. 122, n. 4, p. 1055-1060, 2010.

MURPHY, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. **The Biochemical Journal**, London, v. 417, p. 1-13, 2009.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **Royal Society of Chemistry**, London, v. 5, p. 27986-28006, 2015.

NORA, B.; IYNDA, R.; HENCHIRI, C. Analysis of bioactive minor compounds in three olive oils from varieties of olive tree Eastern Algerian (Bouricha, Limli and Blanquette). **Journal of Natural Remedies**, Bangalore, v. 16, n. 4, p.153-164, 2016.

NYAM, K. L.; LEO, S. Y.; TAN, C. P.; LONG, K. L. Functional properties of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed and its application as bakery product. **Journal of Food Science and Technology**, London, v. 51, n. 12, p. 3830-3837, 2014.

NYAM, K. L.; TAN, C. P.; LAI, O. M.; LONG, K.; CHE MAN, Y. B. Physicochemical properties and biactive compounds of selected seed oils. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 42, p. 1396-1403, 2009.

NYAM, K. L.; WWONG, M. M.; LONG, K.; TAN, C. P. Oxidative stability of sunflower oils supplemented with kenaf seeds extract, roselle seeds extract and roselle extract, respectively under accelerated storage. **International Food Research Journal**, Seri Kembangan, v. 20, n. 2, p. 695-701, 2013.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Phenolic acids bioavailability. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

ORISAKWE, O. E.; HUSAINI, D. C.; AFONNE, O. J. Testicular effects of sub-chronic administration of *Hibiscus sabdariffa* calyx aqueous extract in rats. **Reproductive Toxicology**, Hoboken, v. 18, p. 295-298, 2004.

ORSAVOVA, J.; MISURCOVA, L.; AMBROZOVA, J. V.; VICHA, R.; MLCEK, J. Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 16, p. 12871-12890, 2015.

OU, B.; HUANG, D.; WOODILL, M. H.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, p. 3122-3128, 2002.

PEH, H. Y.; TAN, W. S. D.; LIAO, W.; WONG, W. S. F. Vitamin E therapy beyond cancer: Tocopherol versus tocotrienol. **Pharmacology and Therapeutics**, Kansas, v. 162, p. 152-169, 2016.

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

PORTO, C.; PORRETTO, E.; DECORTI, D. Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. **Ultrason Sonochemistry**, Oxford, v. 20, n. 4, p.1076-1080, 2013.

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

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

RAO; P. U. Nutrient composition and biological evaluation of mesta (*Hibiscus sabdariffa*) seeds. **Plant Food for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 49, p. 27-34, 1996.

RASTOGI, T.; REDDY, K. S.; SPIEGELMAN, D.; PRABHAKARAN, D.; WILLET, W. C.; STAMPFER, M. J.; ASCHERIO, A. Diet and risk of ischemic heart disease in India. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 79, n. 4, p. 582-592, 2004.

RIAZ, G.; CHOPRA, R. A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Amsterdam, v. 102, p. 575-586, 2018.

ROCHA, I. C. D.; BONNLAENDER, B.; HARTWIG, S.; PISCHEL, I.; HEINRICH, M. *Hibiscus sabdariffa* L. – a phytochemical and pharmacological review. **Food Chemistry**, London, v. 165, p. 424-443, 2014.

SARANGARAJAN, R.; MEERA, S.; RUKKUMANI, R.; SANKAR, P.; ANURADHA, G. Antioxidants: friend or foe? **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, Amsterdam v. 10, n. 12, p. 1111-1116, 2017.

SASSE, A.; COLINDRES, P.; BREWER, M. S. Effect of natural and synthetic antioxidants on the stability of cooked, frozen pork patties. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 74, n. 1, p. S30-S35, 2009.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, p. 2432-2438, 2002.

SEVANIAN, A.; HOCHSTEIN, P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. **Annual Review of Nutrition**, New York, n. 5, p.365-390, 1985.

SHEN, C. Y.; ZHANG, T. T.; ZHANG, W. L.; JIANG, J. G. Anti-inflammatory activities of essential oil isolated from the calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. **Food & Function**, Cambridge, v. 5, p. 327-345, 2016.

SIMIC, M. G. Free radical mechanisms in autoxidation processes. **Journal of Chemical Education**, Athens, v. 58, n. 2, 1981.

SINDI, H. A.; MARSHALL, L. J.; MORGAN, M. R. A. Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. **Food Chemistry**, London, v. 164, p. 23-29, 2014.

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

SILVA, A. C.; JORGE, N. Influence of *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei* extracts on the prevention of oxidation and retention of tocopherols in soybean oil in an accelerated storage test. **Journal of Food Science and Technology**, London, v. 51, n. 6, p. 1208-1212, 2014.

SOUSA, A.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L.; BENTO, A.; PEREIRA, J. A. Effect of solvent and extraction temperatures on the antioxidant potential of traditional stoned table olives “*alcaparras*”. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 41, n. 4, p. 739-745, 2008.

SZYDŁOWSKA-CZERNIAK, A.; KARLOVITS, G.; DIANOCZKI, C.; RECSEG, K.; SZLYK, E. Comparison of two analytical methods for assessing antioxidant capacity

of rapeseed and olive oils. **Journal of The American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 85, n. 2, p. 141-149, 2008.

TAGHVAEI M., JAFARI S. M. Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. **Journal of Food Science and Technology**, London, v. 52, n. 3, p. 1272-1282, 2015.

TRINDADE, A. S. N.; DANTAS, A. F.; LIMA, D. C.; FERREIRA, S. L. C.; TEIXEIRA, L. S. G. Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction for determination of Cu, Fe, Ni e Zn in vegetable oils by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. **Food Chemistry**, London, v. 185, p. 145-150, 2015.

UMEDA, W. M.; LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Evaluation of bioactive compounds in bean oils (*Phaseolus vulgaris* L.) Pérola and BRS Valente varieties. **Current Nutrition & Food Science**, Battle Ground, v. 14, p. 40-46, 2018.

UNDURTI, N.; DAS, D. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 1, n. 4, p. 420-439, 2006.

WAHABI, H. A.; ALANSARY, L. A.; AL-SABBAN, A. H.; GLASZIUO, P. The effectiveness of *Hibiscus sabdariffa* in the treatment of hypertension: a systematic review. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 17, n. 2, p. 83-86, 2010.

WANG, C. J.; WANG, J. M.; LIN, W. L.; CHU, C. Y.; CHOU, F. P.; TSENG, T. H. Protective effect of Hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide – induced hepatic toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, n. 5, p. 411-416, 2000.

YANG, J. Brazil nuts and associated health benefits: A review. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 42, p. 1573-1580, 2009.

YOUSSEF, M. A.; EL KADY, A. A.; NAGY, K. S. Effect of engineering treatments on extraction of Roselle juice (Karkdah). **Middle East Journal of Agriculture Research**, Giza, v. 4, n. 4, p. 697-706, 2015.

Apêndice 1 – Análises de variância para atividade antioxidante representada pelos métodos DPPH, FRAP e β -caroteno/ácido linoleico para os extratos de cálices e sementes de hibisco.

Fator de variação	G.L.	Quadrados médios		
		DPPH	FRAP	β -caroteno/ácido linoleico
Tratamentos	1	1755,6100**	20193,8310**	1,8360 ^{ns}
Resíduo	2	0,5252	0,0010	14,5863
Desvio padrão		0,7200	0,0300	3,8200
Coeficiente de variação (%)		1,58	0,04	9,01

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

^{ns}não significativo

Apêndice 2 – Análises de variância para determinação de índice de peróxidos (IP), índice de *p*-anisidina (IA), valor total de oxidação (Totox) e estabilidade oxidativa (EO).

Fator de variação	G.L.	Quadrados médios			
		IP	IA	Totox	EO
Tratamentos	3	1188,6007**	26,0503**	5472,0600**	31,8836**
Tempos	2	2151,7012**	17,9752**	9408,4973**	25,5417**
Tratamentos x tempos	6	435,0852**	2,9123**	1879,6452**	1,2494**
Resíduo	12	0,2179	0,0778	0,8841	0,0120
Desvio padrão		0,47	0,28	0,94	0,11
Coeficiente de variação (%)		2,83	5,83	2,49	5,42

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

Apêndice 3 – Análises de variância para determinação do perfil de tocoferóis.

Fator de variação	G.L.	Quadrados médios				
		α-tocoferol	γ-tocoferol	δ-tocoferol	Totais	Vit E
Tratamentos	3	20457,0915**	76,1875**	26,5159**	22627,9125**	20620,5358**
Tempos	2	6780,0915**	362,5434**	67,881**	11584,9924**	7188,5432**
Tratamentos x tempos	6	1578,7027**	110,1783**	3,5345**	2004,7139**	1629,2795**
Resíduo	12	0,0139	0,0287	0,0156	0,0726	0,0169
Desvio padrão		0,12	0,17	0,12	0,27	0,13
Coeficiente de variação (%)		0,14	0,11	0,25	0,09	0,12

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