



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

Centro de Ciências Agrárias
Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos
Programa de Mestrado e Doutorado em Ciência de Alimentos

**COMPOSTOS FENÓLICOS DE ERVAS *Lamiaceae* NA
ESTABILIDADE OXIDATIVA DA MANTEIGA E AVALIAÇÃO
DA TOXICIDADE DE EXTRATO DE ALECRIM (*Rosemarinus
officinalis* L.)**

Tese apresentada ao Programa de
Mestrado e Doutorado em Ciência de
Alimentos da Universidade Estadual de
Londrina, como requisito parcial para a
obtenção do título de Doutor em Ciência
de Alimentos.

Doutoranda: Renata Dinnies Santos
Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Lúcia H. da Silva
Miglioranza

Londrina – PR
2009

SANTOS, Renata D.; MIGLIORANZA, Lúcia H. S. **Compostos fenólicos de ervas *Lamiaceae* na estabilidade oxidativa da manteiga e avaliação da toxicidade de extrato de alecrim (*Rosemarinus officinalis* L.)**. 2009. 97 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2009.

RESUMO

Óleos e gorduras são substâncias susceptíveis a processos oxidativos. As reações de oxidação e a decomposição dos produtos da oxidação implicam na perda de qualidade e valor nutricional dos alimentos. O processo oxidativo pode ser inibido ou atrasado através do uso de antioxidantes, compostos naturais ou sintéticos, com estruturas químicas e mecanismos de ação diversos, capazes de retardar ou inibir, de forma significativa, a oxidação de qualquer substância oxidável. Neste trabalho determinou-se a concentração de compostos fenólicos e avaliou-se a atividade antioxidante dos extratos brutos de alecrim, orégano, sálvia, tomilho e manjerona pelos métodos de sequestro do radical DPPH, dosagem das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e teste de FRAP. O extrato alcoólico de alecrim foi avaliado quanto à toxicidade pelo método de redução do MTT. Avaliou-se também a estabilidade oxidativa de manteiga adicionada de compostos fenólicos de alecrim pelo método *Schaal Oven Test*. Os extratos alcoólicos de alecrim, orégano, tomilho, sálvia e manjerona apresentaram concentração em compostos fenólicos de 2,440, 5,350, 2,150, 2,280 e 2,390 mg/mL, respectivamente. As condições ótimas de extração foram 40% de etanol durante 4 horas para alecrim, orégano, sálvia e manjerona, e 40% de etanol durante 6 horas para tomilho. O extrato alcoólico de alecrim apresentou maior atividade antioxidante na inibição do radical DPPH. Não houve diferença significativa quanto à atividade antioxidante entre os extratos de alecrim, manjerona e tomilho, avaliada pela determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico ($p < 0,05$). O extrato de orégano se destacou pelo maior poder antioxidante no método de redução do ferro (valor de FRAP). Na avaliação da toxicidade do extrato alcoólico de alecrim *in vitro*, pelo método de redução do MTT, observou-se uma atividade citoprotetora concentração-dependente entre 50 e 250 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados sugerem que o uso do alecrim como antioxidante natural é seguro nas concentrações testadas. A manteiga obteve maior estabilidade à

oxidação com a adição de extrato alcoólico de alecrim na concentração de 400 ppm. Nesta concentração, retardou-se o início do período de propagação em 16 horas a 110°C e 96 horas a 60°C em comparação ao antioxidante sintético BHT a 200 ppm.

Palavras-chave: orégano, manjerona, sálvia, tomilho, alecrim, antioxidantes, *Schaal Oven Test*, DPPH

SANTOS, Renata D.; MIGLIORANZA, Lúcia H. S. **Oxidative stability of butter with added phenolic compounds from *Lamiaceae* herbs and *in vitro* evaluation of toxicity of rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.).** 2009. 97 p. Thesis (Doctor in Food Science) – State University of Londrina, Londrina. 2009.

ABSTRACT

Oils and fats are susceptible to the oxidative processes. Lipid oxidation causes nutritional losses and produces undesirable flavour, color and toxic compounds, which can make the foods less acceptable or unacceptable to consumers. The use of antioxidants, synthetic or natural substances that vary widely in chemical structure and have diverse mechanisms of action, is able to delay or inhibit significantly the oxidation of any reducible substance. This study established the best condition for the extraction of phenolic compounds and evaluated the antioxidant activity of crude rosemary, oregano, sage, thyme and marjoram extracts through methods of inhibition of the DPPH radical, determination of thiobarbituric acid reactive substances and FRAP test. The toxicity of alcoholic rosemary extract was evaluated through the method of MTT reduction. The *Schaal Oven Test* was used to evaluate the oxidative stability of butter added of alcoholic rosemary extract. The best condition for extraction of phenolic compounds was 40% ethanol in 4 hours running time for rosemary, oregano, sage and marjoram (2,440, 5,530, 2,280 and 2,390 mg/mL respectively) and 40% ethanol in 6 hours running time for thyme (2,150 mg/mL). The alcoholic rosemary extract showed the highest antioxidant activity in test of inhibition of the DPPH radical. There was no significant difference regarding the antioxidant activity between rosemary, marjoram and thyme extracts in the determination of thiobarbituric acid reactive substances ($p < 0,05$). The oregano extract demonstrated the highest antioxidant power in the FRAP test. In the *in vitro* evaluation of the alcoholic rosemary extract toxicity through the method of MTT reduction, a dose-dependent cytoprotective activity was observed between 50 and 250 $\mu\text{g/mL}$. The results suggest that the use of rosemary as natural antioxidant is safe in the tested concentrations. The highest oxidative stability of butter added of alcoholic rosemary extract at temperatures of 60 and 110°C was obtained with the concentration of 400 ppm of phenolic compounds, where it was observed the lowest levels of peroxides

formation and degradation. At that concentration, the start propagation period was delayed in 16 hours at 110°C and 96 hours at 60°C, if compared to 200 ppm BHT sintetic antioxidant.

Key words: oregano, marjoram, sage, thyme, rosemary, antioxidants, *Schaal Oven Test*, DPPH

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Patologias e danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	36
Figura 2: Classificação dos antioxidantes usados em alimentos.....	38
Figura 3: Estrutura química dos compostos BHA (1), BHT (2), PG (3) e TBHQ (4) .	40
Figura 4: Estruturas químicas dos tocoferóis e tocotrienóis	42
Figura 5: Estrutura básica de uma molécula flavonóide	42
Figura 6: Estrutura do ácido rosmarínico	47
Figura 7: Fluxograma do processo de extração de compostos fenólicos das especiarias	56
Figura 8: Resposta para os efeitos de concentração de etanol e tempo de extração sobre a concentração de compostos fenólicos totais das especiarias de acordo com metodologia de superfície de resposta: a) <i>Rosemarinus officinalis</i> L. (alecrim); b) <i>Origanum vulgare</i> (orégano); c) <i>Thymus vulgaris</i> L. (tomilho); d) <i>Salvia officinalis</i> L. (sálvia); e) <i>Origanum majoricum</i> (manjerona)	67
Figura 9: Inibição do radical DPPH em extratos alcoólicos de alecrim, orégano, manjerona, tomilho e sálvia.....	69
Figura 10: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) produzidas na presença dos extratos alcoólicos de alecrim, orégano, manjerona, tomilho e sálvia.	71
Figura 11: Citotoxicidade do extrato alcoólico de alecrim	75

Figura 12: Efeito citoprotetor do extrato alcoólico de alecrim no ensaio de redução de MTT.....	76
Figura 13: Variação do índice de peróxido da manteiga sem adição de antioxidantes, adicionada de BHT e de diferentes concentrações de compostos fenólicos do extrato alcoólico de alecrim em função do tempo de armazenamento, na temperatura de 110°C.	78
Figura 14: Variação do índice de peróxido da manteiga sem adição de antioxidantes, adicionada de BHT e de diferentes concentrações de compostos fenólicos do extrato alcoólico de alecrim em função do tempo de armazenamento, na temperatura de 60°C.	79
Figura 15: Produção de TBARS na manteiga sem adição de antioxidantes, adicionada de BHT e de diferentes concentrações de compostos fenólicos do extrato alcoólico de alecrim em função do tempo de armazenamento, na temperatura de 110°C.	80
Figura 16: Produção de TBARS na manteiga sem adição de antioxidantes, adicionada de BHT e de diferentes concentrações de compostos fenólicos do extrato alcoólico de alecrim em função do tempo de armazenamento, na temperatura de 60°C.	81
Figura 17: Correlações entre o índice de peróxido e os valores de decomposição (TBARS) de peróxidos: (a) manteiga 60°C; (b) manteiga 110°C; (c) manteiga adicionada de 400 ppm de compostos fenólicos de extrato alcoólico de alecrim à 60°C; (d) manteiga adicionada de 400 ppm de compostos fenólicos de extrato alcoólico de alecrim à 110°C.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Compostos fenólicos totais em extratos aquosos de ervas	46
Tabela 2: Valores experimentais e níveis codificados das variáveis independentes, para o planejamento fatorial 3^2	57
Tabela 3: Delineamento experimental para avaliação da estabilidade oxidativa da manteiga.....	62
Tabela 4: Compostos fenólicos totais nos extratos das especiarias, para o planejamento fatorial 3^2	64
Tabela 5: Efeitos para os extratos das especiarias no planejamento fatorial 3^2	68
Tabela 6: Concentração de compostos fenólicos totais nos extratos alcoólicos de alecrim, orégano, manjerona, tomilho e sálvia, nas condições ótimas de extração. .	68
Tabela 7: Redução percentual na produção de TBARS na presença dos extratos alcoólicos das especiarias.....	72
Tabela 8: Valores de FRAP para os extratos alcoólicos de alecrim, orégano, manjerona, tomilho e sálvia.....	73
Tabela 9: Variação no índice de peróxido em função do tempo para as amostras de manteiga submetidas à temperatura de 110°C	79
Tabela 10: Variação no índice de peróxido em função do tempo para as amostras de manteiga submetidas à temperatura de 60°C	80
Tabela 11: Produção de TBARS em função do tempo para as amostras de manteiga submetidas à temperatura de 110°C	81

Tabela 12: Produção de TBARS em função do tempo para as amostras de manteiga submetidas à temperatura de 60°C.....	82
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
AOAC	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
AOCS	<i>American Oil Chemist's Society</i>
AOM	<i>Active oxygen method</i>
BHA	Butil-hidróxi anisol
BHT	Butil-hidróxi tolueno
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
ERO's	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Poder antioxidante pela redução do ferro
IP	Índice de peróxido
MDA	Malondialdeído
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
OSI	<i>Oil stability instrument</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PG	Propil-galato
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Terc-butil hidroquinona
TEP	1,1,3,3-tetraetóxiopropano
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
TROLOX	Ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	PROCESSOS OXIDATIVOS	20
2.1.1	Oxidação lipídica em alimentos	21
2.1.1.1	Fotooxidação	23
2.1.1.2	Autooxidação	24
2.1.2	Métodos para avaliar a oxidação lipídica em alimentos	27
2.1.2.1	Testes de oxidação acelerada	27
2.1.2.2	Perda de ácidos graxos insaturados e ganho de peso	29
2.1.2.3	Determinação de hidroperóxidos	30
2.1.2.4	Dienos conjugados	30
2.1.2.5	Teste do ácido tiobarbitúrico	31
2.1.2.6	Valor de <i>p</i> -anisidina	31
2.1.2.7	Compostos carbonílicos	32
2.1.2.8	Análise sensorial	32
2.1.3	Oxidação lipídica em sistemas biológicos	33
2.1.3.1	Efeitos biológicos dos radicais livres	34
2.1.3.2	Estresse oxidativo	35
2.2	ANTIOXIDANTES	37
2.2.1	Antioxidantes sintéticos	40
2.2.2	Antioxidantes naturais	41
2.3	COMPOSTOS FENÓLICOS	44
2.4	ESPECIARIAS	47
2.4.1	Sálvia (<i>Salvia officinalis</i> L.)	47
2.4.2	Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i> L.)	48
2.4.3	Alecrim (<i>Rosemarinus officinalis</i> L.)	49
2.4.4	Orégano (<i>Origanum vulgare</i>)	50
2.4.5	Manjerona (<i>Origanum majoricum</i>)	51

2.5 MANTEIGA	52
3 OBJETIVOS	54
3.1 OBJETIVO GERAL	54
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
4 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 MATÉRIAS-PRIMAS	55
4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	55
4.2.1 Produção dos extratos das especiarias	55
4.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	57
4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	58
4.4.1 Sistema de inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	58
4.4.2 Peroxidação lipídica do ácido linoléico	58
4.4.3 FRAP (poder antioxidante pela redução do ferro)	59
4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DO EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ALCOÓLICO DE ALECRIM PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO MTT	60
4.6 ESTABILIDADE OXIDATIVA DA MANTEIGA	61
4.6.1 Índice de peróxido	62
4.6.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	63
4.6.3 Análise estatística	63
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
5.1 CONDIÇÕES ÓTIMAS DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	64
5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	69
5.2.1 Sistema de inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	69
5.2.2 Peroxidação lipídica do ácido linoleico	70
5.2.3 FRAP (poder antioxidante pela redução do ferro)	72

5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DO EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ALCOÓLICO DE ALECRIM PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO MTT	74
5.4 ESTABILIDADE OXIDATIVA DA GORDURA LÁCTEA (MANTEIGA) ADICIONADA DE EXTRATO ALCOÓLICO DE ALECRIM.....	77
6 CONCLUSÃO	87
REFERÊNCIAS	88

1 INTRODUÇÃO

Óleos, gorduras e alimentos que possuem estes ingredientes em sua formulação são susceptíveis a processos oxidativos. As reações de oxidação e a decomposição dos produtos da oxidação implicam na perda de qualidade e valor nutricional dos alimentos. O processo oxidativo pode ser inibido ou atrasado de várias formas, e a principal delas é através do uso de substâncias denominadas antioxidantes. Os antioxidantes são compostos naturais ou sintéticos, com estruturas químicas e mecanismos de ação diversos, capazes de retardar ou inibir, de forma significativa, a oxidação de qualquer substância oxidável.

Os componentes celulares, principalmente a membrana celular, são susceptíveis a processos oxidativos. A maior susceptibilidade da membrana celular se deve ao elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados, principais alvos das reações oxidativas. A oxidação lipídica em nível celular pode estar relacionada com doenças coronarianas, aterosclerose, câncer e processos de envelhecimento. O sistema de defesa antioxidante endógeno é formado por compostos enzimáticos e não-enzimáticos, estando presentes tanto no organismo como nos alimentos ingeridos. A situação de estresse oxidativo caracteriza-se pelo desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Havendo predomínio dessas espécies no meio, elas reagem com proteínas, ácidos nucléicos, carboidratos e, principalmente, com os lipídios, causando alterações nos mecanismos de homeostase celular, podendo levar à perda de sua funcionalidade. As lesões causadas pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio podem ser prevenidas ou reduzidas por meio da atividade de antioxidantes, que podem agir diretamente na neutralização da ação dessas espécies ou participar indiretamente de sistemas enzimáticos com essa função.

Assim, o emprego de antioxidantes em produtos industrializados e o consumo freqüente de alimentos que apresentem na sua composição substâncias naturais que inibem ou reduzem os processos oxidativos, estão relacionados, tanto com o aumento da vida de prateleira dos alimentos quanto com a melhoria da qualidade de vida da população.

Antioxidantes sintéticos, como o BHT (butil-hidróxi tolueno), BHA (butil-hidróxi anisol), TBHQ (terc-butil hidroquinona), entre outros, são frequentemente

empregados na indústria de alimentos. Porém, estudos com animais demonstram que tais substâncias podem causar efeitos negativos à saúde (RAMALHO; JORGE, 2006; SHAHIDI, 2000; YANISHLIEVA; MARINOVA, 2003).

Os antioxidantes naturais são compostos encontrados em praticamente todas as plantas, micro-organismos e até mesmo em tecidos animais. A maioria são compostos fenólicos e os grupos mais importantes são os tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos.

Os antioxidantes fenólicos naturais apresentam-se como uma alternativa para minimizar ou retardar a deterioração oxidativa em alimentos, além de elevar o valor funcional do alimento. São encontrados principalmente em frutas, vegetais, chás, vinhos e em várias ervas. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos nas plantas é devida principalmente às suas propriedades redox e à estrutura química, que desempenha um papel importante na neutralização de radicais livres, na ação quelante de metais e na absorção de oxigênio singlete e triplete (SHETTY et al., 2005).

A combinação de alimentos com moléculas biologicamente ativas, como os compostos fenólicos, pode ser uma estratégia para reduzir o risco de distúrbios metabólicos que podem conduzir a doenças crônicas, elevar o valor funcional do alimento e aumentar a vida de prateleira.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROCESSOS OXIDATIVOS

Os lipídios são ingredientes fundamentais para os aspectos sensoriais e fisiológicos dos alimentos e estão relacionados com a percepção do aroma, sabor e textura, além de proporcionar sensação de saciedade. Além disso, conferem valor nutritivo aos alimentos por serem a principal fonte de energia e também a principal fonte dos ácidos graxos essenciais e das vitaminas A, D, E e K. Também desempenham papéis fisiológicos importantes, interagindo com drogas lipofílicas, favorecendo o aproveitamento de vitaminas lipossolúveis e participam na formação e fluidez de membranas celulares (SIVIERI; OLIVEIRA, 2002).

Embora proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos sejam susceptíveis à oxidação, os ácidos graxos insaturados, por apresentarem maior instabilidade, são mais propensos ao processo oxidativo.

Grande parte dos processos oxidativos envolve a participação de radicais livres. Os primeiros estudos a respeito de radicais livres se deram por volta de 1924. No entanto, só nos anos setenta, começaram a surgir trabalhos relatando a importância dos radicais livres para os seres vivos, particularmente os aeróbios (BAST; HAENEN; DOELMAN, 1991).

O interesse por radicais livres e antioxidantes tem se intensificado ultimamente, pelo possível papel dessas substâncias na patogênese de diversas doenças. Assim, estudos sobre os sistemas de oxirredução envolvendo a peroxidação lipídica, espécies oxidantes, toxinas ambientais mediadas por radicais livres, e a relação desses sistemas com a aterosclerose, inflamação, diabetes, câncer e outras doenças, bem como uma desejada proteção efetuada pelos antioxidantes, tem levado inúmeros autores a se dedicarem ao assunto, procurando estabelecer uma base fisiopatológica segura para os vários processos (VANNUCCHI et al., 1998).

O termo radical livre é freqüentemente usado para designar qualquer átomo ou molécula com existência independente, contendo um ou mais elétrons não pareados nos orbitais externos. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas

altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Na natureza existem duas importantes substâncias que podem gerar radicais livres, o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (NO), que ocorre como poluente atmosférico, mas que também é sintetizado em diversas células (HÖEHR; ROVER Jr; VELLASCO, 2001).

Outra via de formação de espécies reativas de oxigênio (ERO's) consiste na redução unieletrônica do oxigênio à água, na qual a entrada de quatro elétrons na molécula de oxigênio promove o aparecimento do radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^\cdot$), intermediários parcialmente reduzidos do oxigênio molecular (HALLIWELL, 2006). O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar facilmente as membranas celulares e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (BIANCHI; ANTUNES, 1999; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HÖEHR; ROVER Jr; VELLASCO, 2001).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, carboidratos, lipídios e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Portanto, a toxicidade do oxigênio, em praticamente todas as células aeróbias, decorre da formação de ERO's que podem interagir com diversas biomoléculas, com o objetivo de se estabilizarem (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL, 2006).

2.1.1 Oxidação lipídica em alimentos

A principal causa da deterioração de óleos e gorduras é conhecida como rancidez, que se caracteriza pelo desenvolvimento de produtos sensorialmente inaceitáveis, em função da ocorrência de odores e sabores estranhos (*off flavours*). Além disso, pode causar perda de cor, inativação de vitaminas, perda do valor nutritivo e conseqüentemente rejeição do produto (KNEZ et al., 2000).

A rancidez pode ser classificada como rancidez hidrolítica e rancidez oxidativa. A rancidez hidrolítica resulta da hidrólise da molécula do triglicerídeo, com formação de glicerol e ácidos graxos livres, promovida por umidade e catalisada por

lipases (enzimas presentes nas oleaginosas, nos alimentos ou de origem microbiana) (McCLEMENTS; DECKER, 2007). Estas enzimas, em condições de alta umidade e temperaturas relativamente altas, favorecem o rápido aumento no conteúdo de ácidos graxos livres (ZAMBIAZI, 1999). Em tecidos vivos, a atividade das lipases é estritamente controlada, já que os ácidos graxos livres podem ser citotóxicos por perturbarem a integridade da membrana celular. Durante o processamento e armazenamento de tecidos animais e vegetais usados como matérias-primas em alimentos, as estruturas celulares e os mecanismos bioquímicos de controle podem ser destruídos, e como consequência, as lipases podem se tornar ativas (McCLEMENTS; DECKER, 2007). Os efeitos da degradação hidrolítica podem ser minimizados por armazenamento a frio, transporte e embalagens adequadas.

Na rancidez oxidativa as alterações são iniciadas por espécies reativas de oxigênio, que levam à formação de vários produtos primários e secundários, que resultam na alteração dos principais parâmetros de qualidade, como cor, sabor, aroma e valor nutritivo (NOGALA-KALUCKA et al., 2005). A rancidez oxidativa é mais difícil de ser evitada, já que é uma reação com baixa energia de ativação, tanto para seu início (4 – 5 kcal/mol) quanto para sua propagação (6 – 14 kcal/mol) (McCLEMENTS; DECKER, 2007).

A oxidação lipídica, que ocorre durante o armazenamento da matéria-prima, processamento e armazenamento do produto final, é considerada a principal causa da deterioração de alimentos (SAIJA et al., 2005). Ela resulta no desenvolvimento de *off flavour* pungente e ofensivo e destruição de vitaminas (A, D, E, K e C), ácidos graxos essenciais, clorofilas, carotenos, aminoácidos, proteínas ou enzimas pela produção de compostos tóxicos ou fisiologicamente ativos (KNEZ et al., 2000). Os óleos e gorduras que tenham sofrido degradação oxidativa tendem a escurecer, aumentar a viscosidade e incrementar a formação de espumas.

O fenômeno de oxidação dos lipídios depende de mecanismos reacionais diversos e extremamente complexos, os quais estão relacionados com o tipo de estrutura lipídica e o meio onde esta se encontra. O número e a natureza das insaturações presentes, o tipo de interface entre os lipídios e o oxigênio (fase lipídica contínua, dispersa ou emulsão), a exposição à luz e ao calor, a presença de pró-oxidantes ou de antioxidantes, são fatores determinantes para a estabilidade oxidativa dos lipídios. A degradação oxidativa dos ácidos graxos insaturados pode

ocorrer através de várias vias, em função do meio e dos agentes catalisadores (BORGES; SILVA; FERREIRA, 1999).

2.1.1.1 Fotoxidação

O mecanismo de fotoxidação de lipídios insaturados é promovido essencialmente pela radiação ultravioleta em presença de sensibilizadores, e envolve a participação de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) como intermediário reativo (BORGES; SILVA; FERREIRA, 1999; POKORNY, 2001). Os sensibilizadores são conhecidos como fotossintetizantes ou cromóforos, devido a sua capacidade de capturar e concentrar energia luminosa. A captura e concentração da luz são dependentes do arranjo dos elétrons ao redor do núcleo atômico da sua estrutura (ZAMBIAZI, 1999).

A fotoxidação não envolve a participação de radicais livres, sendo um mecanismo com adição direta do oxigênio em seu estado singlete que é altamente reativo. Assim, o produto primário da fotoxidação é o hidroperóxido, e sua velocidade de formação é de 10 a 30 vezes maior que na autoxidação, pois não há período de indução (CHOE, 2008). Na autoxidação, um grupamento metílico associado a uma dupla ligação é mais reativo que uma simples insaturação. Na fotoxidação, a reatividade está relacionada ao número de duplas ligações na cadeia (McCLEMENTS; DECKER, 2007). A oxidação fotossintética ocorre na presença de componentes naturalmente presentes no sistema lipídico e da luz.

A formação do oxigênio singlete ocorre pela transferência de energia luminosa pelos fotossensibilizadores (como por exemplo, clorofila, grupos heme), que absorvem luz na região do visível ou próximo do UV, transferindo energia para o oxigênio tripleto ($^3\text{O}_2$) e convertendo-o a oxigênio singlete. Por ser o oxigênio singlete altamente instável, ele reage rapidamente (cerca de 1.500 vezes mais rápido que o oxigênio tripleto) com regiões de alta densidade eletrônica, adicionando-se diretamente aos lipídios para formar os hidroperóxidos (ZAMBIAZI, 1999).

2.1.1.2 Autoxidação

A autoxidação é um processo dinâmico que evolui ao longo do tempo, sendo o principal mecanismo de oxidação de óleos e gorduras. Trata-se de um fenômeno puramente químico e bastante complexo, envolvendo reações radiculares capazes de auto-propagação, e que dependem do tipo de ação catalítica (temperatura, íons metálicos, radicais livres, pH) (BORGES; SILVA; FERREIRA, 1999).

A cinética da oxidação lipídica em alimentos normalmente é determinada por uma fase lag seguida de um aumento exponencial na taxa de oxidação. A extensão da fase lag é de extrema importância, já que nesta fase a rancidez não é sensorialmente detectada e o alimento apresenta-se com alta qualidade. Quando a fase exponencial é atingida, os processos de oxidação lipídica e desenvolvimento de *off flavours* aumentam rapidamente. A fase lag irá aumentar com a redução da temperatura, da concentração de oxigênio, com o grau de insaturação dos ácidos graxos, atividade de pró-oxidantes e aumento da concentração de antioxidantes (McCLEMENTS; DECKER, 2007).

No decurso da seqüência reacional, classicamente dividida em iniciação, propagação e terminação, é possível distinguir três etapas de evolução oxidativa (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; JADHAV et al., 1996; SHAHIDI; NACZK, 2004a):

1. Desaparecimento dos substratos de oxidação (oxigênio, lipídio insaturado);
2. Aparecimento dos produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos), cuja estrutura depende dos ácidos graxos presentes;
3. Aparecimento dos produtos secundários de oxidação, obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não-voláteis), cuja natureza e proporção dependem de diversos parâmetros.

A oxidação lipídica inicia com a formação de radicais livres e com o seqüestro do hidrogênio de um átomo de carbono adjacente à dupla ligação, onde a quantidade de energia para a abstração do hidrogênio é bastante baixa (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A formação do radical lipídico é usualmente mediada por traços de metais, irradiação, luz ou calor. Da mesma forma, os hidroperóxidos lipídicos, que existem em quantidades traço mesmo antes da reação de oxidação, são quebrados para formar novos radicais. Os hidroperóxidos lipídicos são formados através de vários caminhos, incluindo a reação do oxigênio singlete com lipídios insaturados ou a oxidação de ácidos graxos insaturados catalisada por lipoxigenases (JADHAV et al., 1996).

A propagação do processo oxidativo ocorre por meio de reações em cadeia que consomem oxigênio e formam novos radicais livres. Os radicais peróxido iniciam uma cadeia de reações com outras moléculas resultando na formação de hidroperóxidos lipídicos e radicais livres lipídicos. Essa reação, quando repetida várias vezes, produz um acúmulo de hidroperóxidos. A reação de propagação se torna um processo contínuo enquanto há disponibilidade de lipídios insaturados ou moléculas de ácidos graxos, sendo considerado um processo autocatalítico (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; JADHAV et al., 1996; SHAHIDI; NACZK, 2004a). Os hidroperóxidos não causam alterações no sabor e odor dos alimentos, mas seus produtos de degradação possuem grande capacidade de alteração de aroma e sabor (GORDON, 2001b).

A terminação da oxidação se dá quando ocorre uma redução na quantidade de lipídios ou ácidos graxos insaturados presentes. Os radicais livres presentes ligam-se uns aos outros, formando compostos estáveis (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Quando o conteúdo de hidroperóxidos de um sistema, contendo ácidos graxos insaturados, alcança certo valor crítico, sua composição torna-se importante e a taxa de oxidação lipídica aumenta. Durante a fase de propagação, a taxa de formação de hidroperóxidos é maior que a taxa de decomposição dos mesmos, e esta situação é reversa na etapa de terminação.

Os produtos resultantes da decomposição dos hidroperóxidos dependem do tipo de ácido graxo e da localização do hidroperóxido no ácido graxo. Podem ser compostos de cadeia curta, voláteis e não-voláteis, que contribuem acentuadamente para as alterações sensoriais do alimento. Por exemplo, a oxidação de óleos vegetais que possuem predominantemente ácidos graxos ω -6 irá produzir odores caracterizados como *grassy* (odor de grama recém cortada) e *beany* (odor de feijão cru), enquanto a oxidação de ácidos graxos ω -3 em óleos marinhos irá

produzir odor de peixe. Esses produtos de decomposição, principalmente os de cadeia curta, possuem limiares de percepção muito baixos, podendo ser detectados em baixíssimas concentrações (McCLEMENTS; DECKER, 2007).

Pró-oxidantes

Pró-oxidantes são compostos ou fatores que causam ou aceleram o processo de oxidação lipídica. A aceleração do processo causada pela presença de agentes pró-oxidantes pode se dar pela interação direta com os ácidos graxos insaturados para formar hidroperóxidos lipídicos ou pela formação de radicais livres. Há ainda agentes pró-oxidantes que favorecem a decomposição dos hidroperóxidos.

A formação de hidroperóxidos lipídicos é acelerada em presença do oxigênio singlete e de lipoxigenases. A incidência de radiação ionizante favorece a produção de radicais livres, principalmente o radical hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) a partir da molécula de água. Este radical é um dos mais reativos devido à sua capacidade de abstrair hidrogênio de moléculas de ácidos graxos, proteínas e DNA (McCLEMENTS; DECKER, 2007).

Os metais de transição, particularmente aqueles que possuem dois ou mais estados de valência, são um dos maiores agentes pró-oxidantes encontrados em alimentos. Eles reduzem a estabilidade oxidativa dos alimentos e tecidos biológicos devido à sua habilidade de decompor hidroperóxidos em radicais livres. (McCLEMENTS; DECKER, 2007). A reação catalisada por cobre e ferro é provavelmente a mais importante do ponto de vista prático (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001a).

Temperatura e oxigênio são também agentes pró-oxidantes. O aumento da temperatura normalmente aumenta a taxa de oxidação lipídica, e a estabilidade lipídica geralmente é melhor a baixas temperaturas. No entanto, o resfriamento não necessariamente evitará a autooxidação, pois a mesma pode ocorrer em temperaturas baixas. A temperatura influencia na relação entre a velocidade e a pressão parcial do oxigênio, já que o aumento da temperatura diminui a solubilidade do oxigênio em óleo, e em alguns casos, altas temperaturas podem

reduzir a velocidade das reações oxidativas (KIM; MIN, 2008; McCLEMENTS; DECKER, 2007; YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001a).

O efeito da umidade na oxidação lipídica em alimentos é fortemente dependente da atividade de água e do estado da água no alimento. Valores muito baixos de atividade de água ($<0,1$), típicos de produtos alimentícios secos, acentuam extremamente a oxidação. Atividade de água de 0,3 geralmente resulta em uma taxa mínima de oxidação, presumivelmente porque a água diminui o acesso do oxigênio ao lipídio ou reduz a atividade catalítica de metais por extinção dos radicais livres. Quando o valor da atividade de água no sistema é consideravelmente maior (0,55-0,85), a taxa de oxidação aumenta novamente, talvez por causa do aumento da mobilização de catalisadores e do oxigênio (McCLEMENTS; DECKER, 2007; YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001a).

2.1.2 Métodos para avaliar a oxidação lipídica em alimentos

Atualmente existem vários métodos para avaliar a oxidação lipídica em alimentos. Mudanças nas propriedades químicas, físicas ou sensoriais de óleos e gorduras durante a oxidação podem ser monitoradas para definir a extensão da oxidação lipídica. Entretanto, não existe um método padrão para detectar todas as alterações oxidativas que ocorrem simultaneamente num alimento. Os métodos disponíveis para monitorar a oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos podem ser divididos em dois grupos: o primeiro grupo avalia os produtos primários da oxidação lipídica, geralmente formados nas etapas de iniciação e propagação e o segundo determina os produtos secundários que se formam a partir da degradação dos hidroperóxidos (SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008).

2.1.2.1 Testes de oxidação acelerada

Devido à necessidade de prever o comportamento de um óleo ou gordura quanto à estabilidade oxidativa, foram desenvolvidos métodos que aceleram

o processo de deterioração e fornecem uma idéia de resistência ou suscetibilidade à oxidação. Neste caso, a amostra é submetida a um teste de oxidação acelerada, sob condições padronizadas e um ponto final é escolhido, no qual se encontram sinais de deterioração oxidativa. Alguns parâmetros como, temperatura, adição de metais, pressão parcial de oxigênio, luz e agitação, são utilizados para acelerar a oxidação e o desenvolvimento de rancidez nos óleos e emulsões, mas o aquecimento é o meio mais utilizado. A partir da análise de estabilidade oxidativa obtém-se como parâmetro, o período de indução, definido como o tempo para se atingir um nível de rancidez detectável ou uma significativa mudança na taxa de oxidação. A estabilidade oxidativa é um parâmetro que depende das características intrínsecas do óleo ou gordura (como presença de oxigênio, presença de metais, estado de oxidação) e das condições de armazenamento (temperatura, oxigênio, luz, embalagem) (SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008).

A escolha do método é influenciada pela sensibilidade do teste em relação às mudanças oxidativas que se deseja avaliar e sua correlação com avaliação sensorial.

Os métodos não automatizados *Active Oxygen Method* (AOM), também conhecido como *Swift Test*, e o *Schaal Oven Test* (teste de estufa), são métodos comuns de oxidação acelerada usados para avaliar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. O método AOM é baseado no princípio de que a rancificação de um óleo ou gordura é significativamente acelerada pela aeração e temperatura elevada. Neste método, o ar é borbulhado no óleo aquecido entre 98^o–100^oC e o índice de peróxido é determinado em diferentes intervalos de tempo. Os valores do índice de peróxido são então plotados em um gráfico em função do tempo e o período de indução é determinado graficamente (SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008). O teste de estufa é bastante semelhante ao AOM, porém a amostra é submetida a temperaturas elevadas e em determinados intervalos de tempo avalia-se a formação de peróxidos através da medida do índice de peróxido. Estes métodos fornecem bons resultados, apesar de serem técnicas que consomem grandes quantidades de reagentes e de tempo.

Versões automatizadas do AOM e teste de estufa, conhecidas como *Oil Stability Instrument* (OSI) e Rancimat, estão disponíveis. Estes métodos utilizam equipamentos específicos que medem as mudanças na condutividade causadas pela presença de ácidos orgânicos voláteis e iônicos automaticamente e

continuamente. Os ácidos orgânicos são produtos estáveis gerados pela decomposição de hidroperóxidos quando o óleo ou a gordura são oxidados por uma corrente de ar borbulhada através deles. O ponto final é determinado quando ocorre um rápido aumento na condutividade. Estes métodos têm a vantagem de analisar várias amostras simultaneamente em um curto intervalo de tempo (SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008).

2.1.2.2 Perda de ácidos graxos insaturados e ganho de peso

As alterações que ocorrem na composição dos ácidos graxos insaturados de um óleo ou gordura são uma forma de monitorar a deterioração oxidativa. Estes métodos requerem a extração total dos lipídios da amostra e a subsequente conversão destes compostos em derivados que possam ser analisados por cromatografia gasosa. Com estes resultados, é possível identificar a classe de lipídios que está fortemente envolvida no processo oxidativo. Por outro lado, as mudanças na composição dos ácidos graxos não devem ser avaliadas em amostras onde predominam ácidos graxos saturados, já que estas mudanças ocorrem em ácidos graxos insaturados durante a oxidação (GORDON, 2001a; SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008).

Durante os primeiros estágios do processo oxidativo, os óleos e gorduras apresentam elevação no peso, devido à combinação dos ácidos graxos com oxigênio durante a formação dos hidroperóxidos. Este aumento no peso pode ser usado para determinar o período de indução do óleo ou gordura, já que um rápido ganho de peso ocorre logo após o período de indução (GORDON, 2001a). Esta determinação não necessita de equipamentos específicos, embora todas as condições da análise, como tamanho da amostra, dimensões dos recipientes e temperatura, devem ser rigorosamente controladas para que os resultados sejam significativos e confiáveis (SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008).

2.1.2.3 Determinação de hidroperóxidos

O índice de peróxido é um método clássico para determinação de hidroperóxidos (produtos primários da oxidação) em óleos e gorduras. O método iodométrico é o mais utilizado, e consiste na redução do grupo hidroperóxido pelo íon iodeto. A quantidade de iodo (I_2) liberada é proporcional à concentração de peróxidos presentes e determinada através de titulação com solução padrão de tiosulfato de sódio usando amido como indicador. Os resultados são expressos em miliequivalentes de oxigênio ativo (mEq)/kg de amostra (McCLEMENTS; DECKER, 2007).

Existem ainda outros métodos disponíveis para a determinação dos hidroperóxidos. Métodos colorimétricos baseados na oxidação do Fe^{2+} a Fe^{3+} na presença de hidroperóxidos e a determinação do Fe^{3+} como tiocianato de ferro III. Os hidroperóxidos podem ainda ser determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (CG-MS) (SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008).

2.1.2.4 Dienos conjugados

Os dienos conjugados são rapidamente formados em ácidos graxos polinsaturados pela abstração de hidrogênio na etapa de iniciação. Estes compostos apresentam intensa absorção em 234 nm com coeficiente de extinção molar de $2,5 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os lipídios que contém metileno intercalado por dienos ou polienos mostram mudança na posição de suas duplas ligações durante a oxidação, devido à isomerização e formação de conjugados (GORDON, 2001a; SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008).

O aumento na absorção devido à formação de dienos e trienos conjugados é proporcional à absorção de oxigênio e à formação de peróxidos durante os estágios iniciais da oxidação. Porém, compostos que absorvem na mesma região, como carotenóides, por exemplo, podem interferir nesta

determinação devido à presença de ligações duplas conjugadas em sua estrutura (McCLEMENTS; DECKER, 2007).

O método para determinar dienos conjugados pode ser usado como medida do índice de estabilidade oxidativa, associado ou não à determinação do índice de peróxido.

2.1.2.5 Teste do ácido tiobarbitúrico

O teste do ácido tiobarbitúrico (TBA) é um dos testes mais antigos e mais frequentemente usados para avaliar a oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos. A intensidade da oxidação lipídica é representada por um valor de TBA. O teste consiste na reação de uma molécula de malondialdeído (MDA) com duas moléculas de TBA, produzindo um complexo de coloração rosa que absorve em 530-532 nm. O MDA é um dialdeído produzido pela degradação oxidativa de ácidos graxos com três ou mais duplas ligações. Isto significa que a formação de MDA durante a oxidação lipídica é dependente da composição inicial em ácidos graxos (McCLEMENTS; DECKER, 2007). Outros produtos resultantes da oxidação lipídica, como 2-alcenais e 2,4-alcadienais, também reagem com TBA, entretanto o exato mecanismo desta reação ainda não está completamente esclarecido (SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008).

2.1.2.6 Valor de *p*-anisidina

A *p*-anisidina é um composto que reage com aldeídos para formar produtos que absorvem em 350 nm. O valor de *p*-anisidina é definido como a absorbância de uma solução resultante da reação de 1g de óleo ou gordura com *p*-anisidina, em condições ácidas. Os produtos formados pela reação com aldeídos insaturados, principalmente 2-alcenais e 2,4-alcadienais, absorvem fortemente em 350 nm, e conseqüentemente, este teste é particularmente sensível a estes produtos de oxidação. Este teste não diferencia entre compostos voláteis e não-voláteis,

embora seja mais sensível a aldeídos insaturados voláteis do que aldeídos saturados voláteis (produtos secundários da oxidação). A medida do valor de *p*-anisidina é normalmente usada em conjunto com a determinação do índice de peróxido (GORDON, 2001a; SHAHIDI; WANASUNDARA, 2008).

2.1.2.7 Compostos carbonílicos

Outra forma de monitorar o desenvolvimento da oxidação lipídica em óleos e gorduras é através da medida de compostos carbonílicos formados devido à degradação dos hidroperóxidos. Estes compostos podem ser determinados pela reação com 2,4-dinitrofenilhidrazina para formar as correspondentes hidrazonas que absorvem em 430-460 nm. O método é limitado pela presença de outros compostos carbonílicos não originados da decomposição de hidroperóxidos, que podem causar interferência (McCLEMENTS; DECKER, 2007).

A análise de compostos carbonílicos individualmente é uma alternativa para evitar o problema de interferência. Hexanal, um dos maiores produtos secundários formados durante a oxidação do ácido linoléico ou outros ácidos graxos ω -6, tem sido usado como padrão para acompanhar o desenvolvimento da oxidação lipídica através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). De acordo com Shahidi e Wanasundara (2008) existe uma relação linear entre a concentração de hexanal, alteração sensorial e valor de TBA para lipídios oriundos de produtos cárneos. Entretanto, estudos recentes têm mostrado que durante a oxidação de produtos ricos em ácidos graxos ω -3, formam-se quantidades significativas de propanal, e existe uma boa correlação entre o conteúdo de propanal e o valor de TBA.

2.1.2.8 Análise sensorial

Uma das melhores formas para avaliar a oxidação lipídica é através da análise sensorial, já que é a única técnica que monitora diretamente o *off flavour*

gerado pelas reações oxidativas. Além disso, a análise sensorial pode ter alta sensibilidade, desde que provadores humanos possam detectar certos compostos aromáticos em concentrações abaixo ou próximos aos níveis de detecção de técnicas químicas ou instrumentais (McCLEMENTS; DECKER, 2007).

A avaliação sensorial de lipídios oxidados deve ser feita com julgadores treinados na identificação de produtos de oxidação. Esse treinamento é realizado para produtos específicos, uma vez que os produtos de oxidação de diferentes ácidos graxos produzem diferentes perfis sensoriais. Devido à necessidade de intenso treinamento, a análise sensorial muitas vezes demanda muito tempo e atinge custos proibitivos, tornando-se inconveniente quando se pretende aplicar em operações requeridas para controle de qualidade. Desta forma, várias técnicas químicas e instrumentais foram desenvolvidas, e correlacionam-se muito bem com a análise sensorial. A sensibilidade de julgadores treinados para identificar produtos de oxidação permite a detecção da deterioração oxidativa nos estágios iniciais, onde os métodos químicos comumente usados são incapazes de detectar essas pequenas alterações (GORDON, 2001a; McCLEMENTS; DECKER, 2007).

2.1.3 Oxidação lipídica em sistemas biológicos

Todos os componentes celulares são susceptíveis a processos oxidativos, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da oxidação lipídica (CERVATO, et al., 2000; FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A maior susceptibilidade da membrana celular se deve ao elevado conteúdo de ácidos graxos insaturados. Com isso, há perda da seletividade na troca iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos (como o malondialdeído), culminando com a morte celular (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; JADHAV et al., 1996).

Segundo Jadhav et al. (1996), a oxidação lipídica pode estar relacionada com doenças coronarianas, aterosclerose, câncer e processos de envelhecimento. Porém, nem sempre os processos de oxidação lipídica são prejudiciais, já que seus produtos são importantes na reação em cadeia a partir do

ácido araquidônico (formação de prostaglandinas) e, portanto, na resposta inflamatória (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

2.1.3.1 Efeitos biológicos dos radicais livres

A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos, como ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta e cigarro (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Devido à sua alta reatividade, os radicais livres apresentam meia-vida razoavelmente curta em sistemas biológicos. Estudos utilizando sistemas-modelo e materiais biológicos *in vitro*, demonstram claramente que a reatividade dos radicais livres é capaz de causar distúrbios metabólicos e danificar a estrutura das membranas de várias formas (DESHPANDE; DESHPANDE; SALUNKHE, 1996).

As espécies radicalares estão envolvidas nos mecanismos de reações inflamatórias ou atuam como segundos mensageiros para manter diversas funções celulares. Assim, o equilíbrio entre a formação e a remoção de espécies radicalares no organismo deve ser regulado de forma que as reações e processos metabólicos dependentes das mesmas possam ocorrer em um nível adequado para a manutenção da fisiologia das células (HALLIWELL, 2006).

Os lipídios são provavelmente os mais susceptíveis da classe de biomoléculas atacadas pelos radicais livres. A destruição oxidativa (peroxidação lipídica) dos ácidos graxos poliinsaturados contidos nas membranas celulares é lesiva porque se processa como uma reação em cadeia perpetuadora (OLSZEWER, 1995).

A peroxidação lipídica é a maior fonte de produtos citotóxicos, como os aldeídos, produzidos pela decomposição de hidroperóxidos. Os principais ácidos graxos que sofrem peroxidação lipídica na célula são o linoléico, o araquidônico e o docosahexanóico, além de outros ácidos graxos poliinsaturados (ANDRADE Jr. et al., 2005; DESHPANDE; DESHPANDE; SALUNKHE, 1996).

2.1.3.2 Estresse oxidativo

O processo de oxidação lipídica está diretamente relacionado com a presença de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio incluem radicais livres, como o radical superóxido ($O_2^{\bullet}$), o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$), o radical peroxila ($RO_2^{\bullet}$), alcooxila ($RO^{\bullet}$), óxido nítrico ($NO^{\bullet}$), e espécies não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o oxigênio singlete (1O_2) (GÜLÇİN, 2006; MANCINI-FILHO, 2006).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são produzidas em condições fisiológicas normais do metabolismo aeróbico resultantes de diversos processos bioquímicos, como atividade de oxidases, cicloxygenases, lipoxigenases, presença de metais de transição no interior da célula e do sistema de transporte de elétrons, e também por macrófagos ativados (AMARAL, 2007).

Em condições normais, a concentração dessas espécies dentro das células é extremamente baixa pelo fato de existirem enzimas antioxidantes que as removem ou impedem a sua formação. Estes radicais tendem a serem eliminados do organismo pelo conjunto das enzimas glutathione peroxidase, glutathione reductase, superóxido dismutase e pela catalase (HÖEHR; ROVER Jr; VELLASCO, 2001).

A produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies através de fontes exógenas (ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, tabaco, solventes orgânicos, poluentes) gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, podendo resultar em morte celular. Este tipo de lesão oxidativa é definida como estresse oxidativo, e designa uma condição na qual ocorre um desequilíbrio entre as concentrações de espécies pró e antioxidantes (ARAÚJO et al., 2007; GÜLÇİN, 2006; HÖEHR; ROVER Jr; VELLASCO, 2001).

A situação de estresse oxidativo aumenta a produção de radical superóxido e peróxido de hidrogênio, que podem promover diretamente o dano celular. Estes produtos derivados do oxigênio podem também interagir na presença de metais de transição para formar radicais hidroxila altamente tóxicos e outras espécies oxidadas (YEN; DUH; TSAI, 2002).

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, tanto de origem endógena quanto exógena, na condição de estresse oxidativo, têm sido correlacionadas com um grande número de doenças, indicando que estas espécies não têm um papel etiológico na grande maioria dos estados patológicos, mas que participam diretamente dos mecanismos fisiopatológicos que determinam a continuidade e as complicações presentes nestes processos (AQIL; AHMAD; MEHMOOD, 2006; HÖEHR; ROVER Jr; VELLASCO, 2001).

As principais patologias e danos celulares causados pelas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são mostrados na Figura 1.

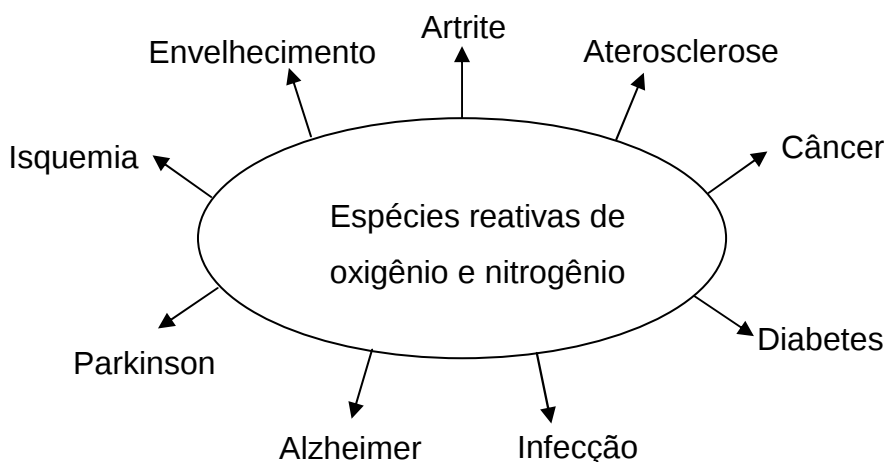


Figura 1: Patologias e danos celulares causados por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Fonte: adaptado de SHAHIDI; NACZK, 2004a

2.2 ANTIOXIDANTES

Os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparada a um substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação desse substrato de maneira eficaz (SHAMI; MOREIRA, 2004).

O uso de antioxidantes na indústria de alimentos e seus mecanismos de ação têm sido amplamente estudados. O retardamento das reações oxidativas por certos compostos foi primeiramente registrado por Berthollet, em 1797, e depois esclarecido por Davy, em 1817 (HUY, 1996).

Das centenas de compostos que têm sido propostos para inibir a deterioração oxidativa das substâncias oxidáveis, somente alguns podem ser usados em produtos para consumo humano. Na seleção de antioxidantes, são desejáveis as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%), ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento, compatibilidade com o alimento e fácil aplicação e estabilidade nas condições de processo e armazenamento. Deve-se também considerar os aspectos legais para o uso de antioxidantes em cada país, bem como a segurança alimentar (RAJALAKSHMI; NARASIMHAN, 1996; RAMALHO; JORGE, 2006).

De acordo com seu mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados como redutores da taxa de propagação de radicais livres (antioxidantes primários), quelantes de íons metálicos, sequestradores de oxigênio, que reagem com oxigênio em sistemas fechados (antioxidantes secundários) e como antioxidantes sinérgicos (Figura 2) (GORDON, 2001b; SHAHIDI, NACZK, 1995).

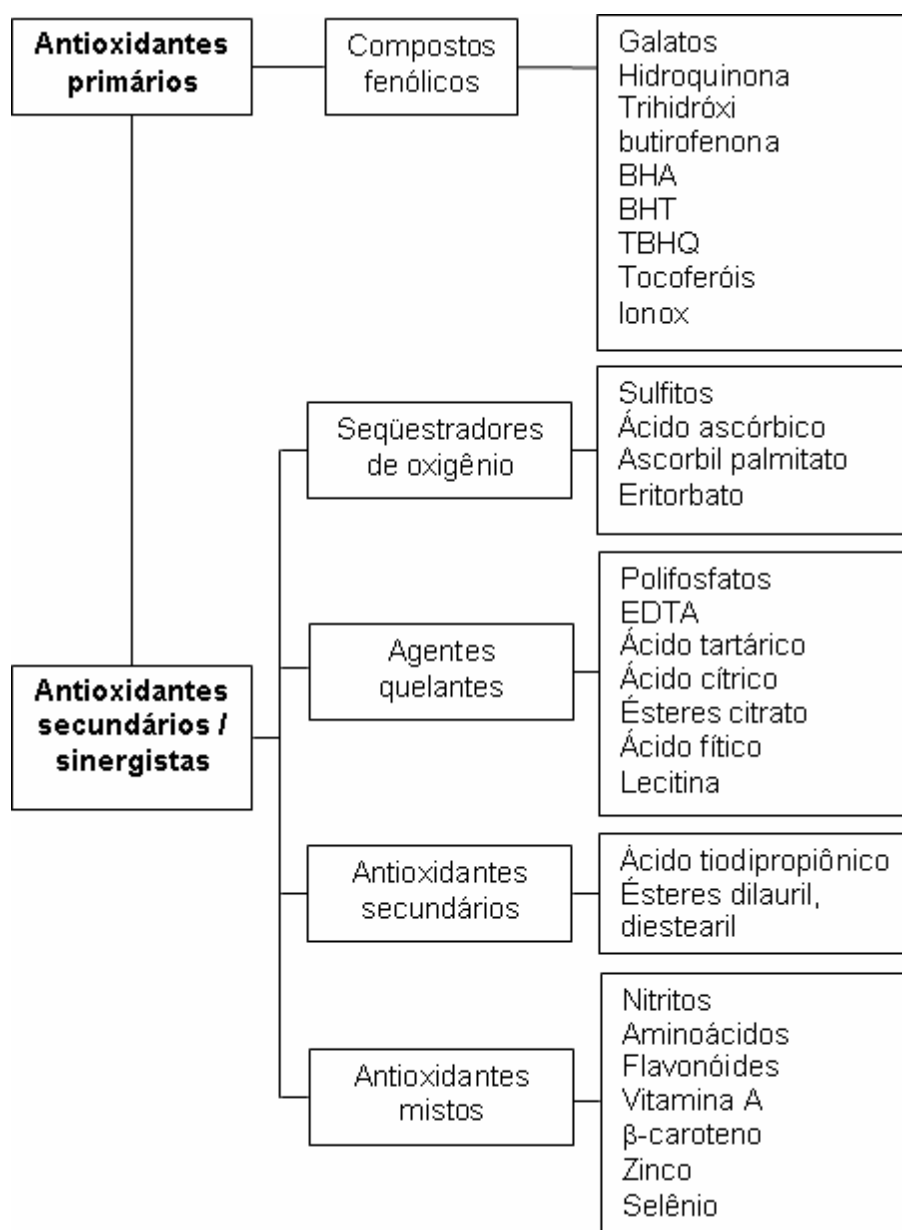


Figura 2: Classificação dos antioxidantes usados em alimentos

Fonte: Adaptado de RAJALAKSHMI; NARASIMHAN, 1996

Os antioxidantes primários interrompem a formação de radicais livres através da doação de hidrogênio ou de elétrons aos radicais livres, transformando-os em produtos estáveis (equações 1 e 2). Os antioxidantes primários incluem os compostos fenólicos sintéticos BHA (butil-hidróxi anisol), BHT (butil-hidróxi tolueno), TBHQ (terc-butil hidroquinona) e PG (propil galato), compostos fenólicos naturais, como flavonóides, ácidos fenólicos, eugenol, e os tocoferóis (vitamina E). Estes compostos são efetivos em baixas concentrações, e em concentrações elevadas

podem se tornar pró-oxidantes (RAJALAKSHMI; NARASIMHAN, 1996; RAMALHO; JORGE, 2006).



Onde:

ROO[•] e R[•]: radicais livres

AH: antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo

A[•]: radical inerte

Antioxidantes secundários podem atuar por meio de vários mecanismos. Os removedores de oxigênio são compostos que atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis, tornando-os, conseqüentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação. Os agentes quelantes/seqüestrantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica, devido à existência de um par de elétrons não compartilhado em sua estrutura. Os antioxidantes secundários ainda atuam na decomposição de hidroperóxidos em compostos estáveis, na absorção da radiação ultravioleta e na desativação do oxigênio singlete (GORDON, 2001b; RAJALAKSHMI; NARASIMHAN, 1996; RAMALHO; JORGE, 2006).

Os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada com estes. Eles atuam por diversos mecanismos, como por exemplo, doando hidrogênio ao radical fenóxi, regenerando o antioxidante primário. Portanto, antioxidantes fenólicos podem ser usados em baixas concentrações se um sinérgico é adicionado simultaneamente no alimento (RAJALAKSHMI; NARASIMHAN, 1996). Os absorvedores de oxigênio, como o ácido ascórbico, ascorbil palmitato, sulfitos e eritorbatos reagem com o oxigênio livre, removendo-o de sistemas fechados. O ácido ascórbico também atua como sinérgico com antioxidantes primários, especialmente os tocoferóis, regenerando sua atividade (GORDON, 2001b; RAMALHO; JORGE, 2006).

2.2.1 Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos BHA, BHT, TBHQ e PG são os antioxidantes mais empregados na indústria alimentícia por apresentarem alta estabilidade e baixo custo.

A estrutura fenólica destes compostos (Figura 3) permite a doação de um próton a um radical livre, regenerando, assim, a molécula e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Dessa maneira, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres e se estabilizam sem promover ou propagar reações de oxidação (RAMALHO; JORGE, 2006).

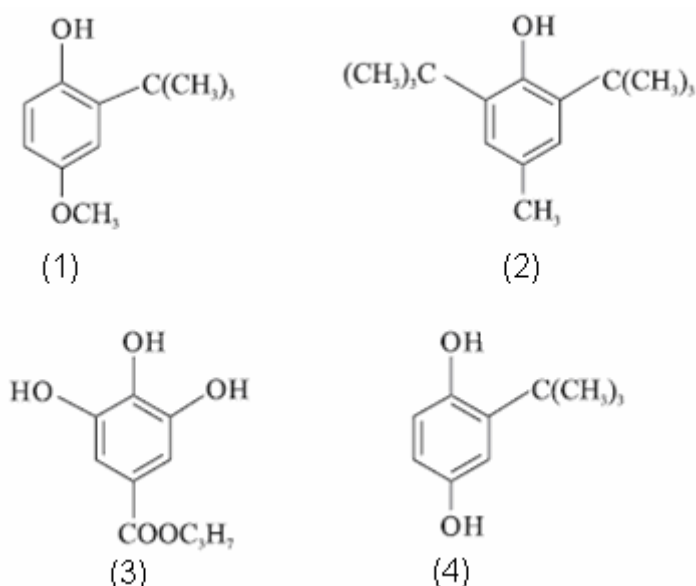


Figura 3: Estrutura química dos compostos BHA (1), BHT (2), PG (3) e TBHQ (4)
Fonte: RAMALHO; JORGE, 2006

O uso de antioxidantes sintéticos em alimentos tem sido gradativamente reduzido em razão de suspeitas sobre sua participação na promoção de efeitos deletérios ao organismo, relacionados ao seu metabolismo e possível absorção e acumulação no organismo e em tecidos (ABDALLA; ROOZEN, 1999).

Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais

(YANISHLIEVA; MARINOVA, 2003). Segundo Shahidi (2000), o BHT apresentou efeitos tóxicos para o fígado, pulmão, rins e afetou o ganho de peso em ratos. O BHA pode induzir hipertrofia hepática, redução do crescimento e desenvolvimento de câncer. A redução do nível de hemoglobina e a hiperplasia de células basais foram atribuídas ao uso de TBHQ (RAMALHO; JORGE, 2006).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, pesquisas têm sido dirigidas no sentido de encontrar produtos naturais com propriedades antioxidantes, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com o intuito de reduzir sua concentração nos alimentos.

2.2.2 Antioxidantes naturais

A preferência do consumidor por aditivos naturais tem estimulado a realização de estudos, visando à identificação de antioxidantes de fontes naturais para aplicação em produtos alimentícios. Assim, diversos trabalhos têm sido realizados para identificar a atividade antioxidante de extratos obtidos de especiarias, leguminosas, cereais e frutas.

É difícil definir o termo “antioxidantes naturais”, mas geralmente o termo refere-se a substâncias que ocorrem naturalmente e podem ser extraídas de tecidos animais ou vegetais. Os antioxidantes naturais são encontrados em praticamente todas as plantas, micro-organismos e até mesmo em tecidos animais. A maioria são compostos fenólicos e os grupos mais importantes são os tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001b).

O grupo tocoferol é um dos melhores antioxidantes naturais amplamente utilizados em alimentos. São formados de oito diferentes compostos pertencentes a duas famílias, tocóis e tocotrienóis, referidos como α , β , γ ou δ , dependendo do número e posição de grupos metil ligados ao anel (Figura 4). Nos tocóis, a cadeia lateral é saturada, enquanto que nos tocotrienóis ela é insaturada (AZZI; STOCKER, 2000; SHAHIDI; NACZK, 2004a). Os tocoferóis e tocotrienóis apresentam atividade antioxidante primeiramente devido ao hidrogênio fenólico na posição C-6. A vitamina E, ou α -tocoferol, apresenta atividade antioxidante superior

aos outros compostos pertencentes a este grupo, atuando na prevenção da oxidação lipídica de ácidos graxos poliinsaturados e de compostos lipídicos de células e de membranas (JOHNSON, 2001; SHAHIDI; NACZK, 1995).

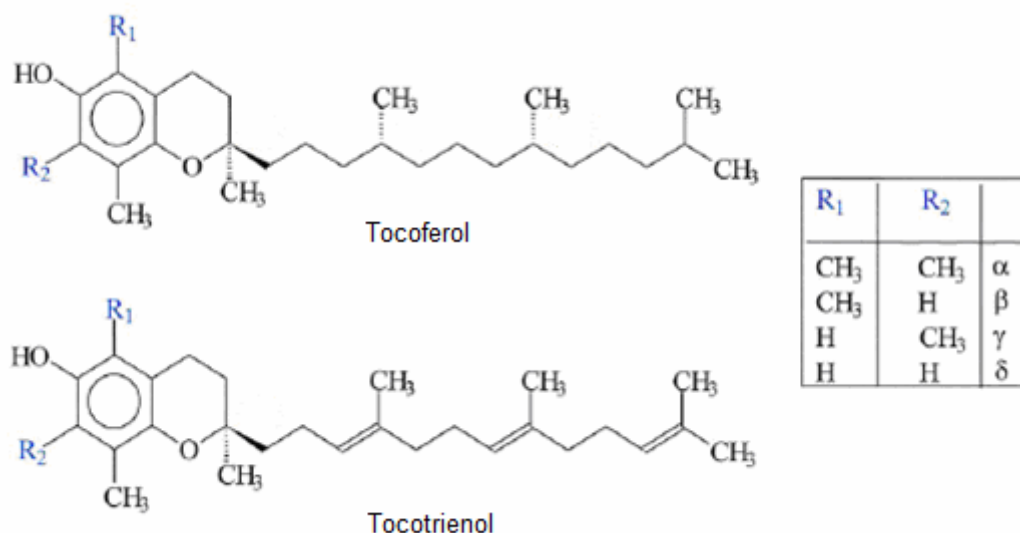


Figura 4: Estruturas químicas dos tocoferóis e tocotrienóis

Fonte: AZZI; STOCKER, 2000

Os flavonóides ocorrem na natureza como metabólitos secundários dos vegetais e são encontrados em praticamente todas as partes da planta. São caracterizados pela configuração C6-C3-C6 (Figura 5) e vários subgrupos são classificados com base nos grupos substituintes dos anéis presentes na estrutura. Essencialmente, a estrutura destes compostos consiste em dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia alifática de três carbonos (JOHNSON, 2001; RAJALAKSHIMI; NARASIMHAN, 1996).

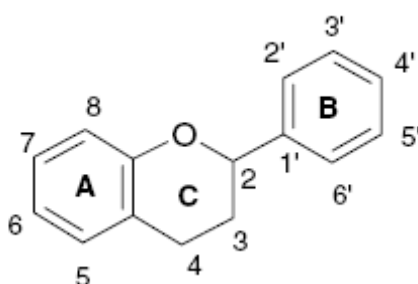


Figura 5: Estrutura básica de uma molécula flavonóide

Fonte: SAMMAN; BALASUNDRAM; SUNDRAM, 2006

Os maiores subgrupos dos flavonóides são flavonóis, antocianinas, flavonas, isoflavonas, catequinas e proantocianidinas (MADHAVI; SINGHAL; KULKARNI, 1996). Os flavonóides participam dos mecanismos de doação de hidrogênio, captura de radicais e como agentes quelantes (MADHAVI; SALUNKE, 1996).

2.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são antioxidantes primários que reagem como seqüestradores de radicais livres e bloqueadores de reações em cadeia (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004). São produtos do metabolismo secundário dos vegetais e constituem boas fontes de antioxidantes na dieta humana. Devido ao potencial carcinogênico das formas sintéticas, os antioxidantes fenólicos naturais apresentam-se como uma alternativa para minimizar ou retardar a deterioração oxidativa em alimentos, além de elevar o valor funcional do alimento (BOTSOGLOU et al., 2002).

Quimicamente, os compostos fenólicos compreendem um anel aromático, com um ou mais grupos hidroxila, formando desde moléculas simples a compostos altamente polimerizados (SHAHIDI; NACZK, 1995). Devido a esta grande diversidade estrutural, este grupo de compostos é comumente denominado “polifenóis”. Muitos dos compostos fenólicos de ocorrência natural estão presentes na forma conjugada com mono e polissacarídeos, ligados a um ou mais grupos fenólicos, e também podem ocorrer como derivados funcionais na forma de ésteres ou metil-ésteres (SAMMAN; BALASUNDRAM; SUNDRAM, 2006). A maioria dos compostos fenólicos é solúvel em água ou em solventes orgânicos (SHAHIDI; NACZK, 1995).

A efetividade dos antioxidantes naturais depende do envolvimento do hidrogênio fenólico nas reações de oxidação, da estabilidade do radical antioxidante formado durante as reações e das substituições químicas presentes na estrutura. Os grupos substituintes na estrutura são provavelmente a contribuição mais importante na habilidade dos antioxidantes naturais em participarem do controle das reações de oxidação e da formação de radicais estáveis (HALL III, 2001; SHETTY et al., 2004).

A substituição de átomos de hidrogênio nas posições *orto* e *para* por grupos alquila aumenta a densidade eletrônica do grupo OH por efeito indutivo, e deste modo, aumenta a reatividade para os radicais lipídicos (SHAHIDI; NACZK, 2004a, 1995). Os substituintes nucleofílicos, como os radicais metil, terc-butil e metóxi, aumentam a atividade antioxidante dos fenóis, enquanto os substituintes eletrofílicos, como os halogênios e grupos nitro, reduzem a atividade antioxidante (OHKATSU; KAJIYAMA, 2001).

O primeiro estudo cinético detalhado para atividade antioxidante dos compostos fenólicos foi conduzido por Boland e ten-Have (1947). Os antioxidantes fenólicos interferem na oxidação lipídica através da rápida doação de um átomo de hidrogênio aos radicais lipídicos (SHAHIDI; NACZK, 2004a). Os radicais fenóxi intermediários formados no processo oxidativo são relativamente estáveis, e por isso, os antioxidantes fenólicos são excelentes doadores de hidrogênio ou de elétron (SHAHIDI; NACZK, 2004a; SHAHIDI; LIYANA-PATHIRANA, 2005).

As propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos têm sido amplamente investigadas. Evidências científicas indicam que a ingestão diária de compostos fenólicos tem desempenhado um papel importante na redução do risco do desenvolvimento de várias doenças associadas ao estresse oxidativo, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, infecções e mal de Alzheimer (AKYON, 2002; MANACH et al., 2004).

Os efeitos benéficos dos compostos fenólicos para a saúde dependem de sua absorção e metabolismo, que por sua vez são determinados pela estrutura química, tamanho molecular e solubilidade (SAMMAN; BALASUNDRAM; SUNDRAM, 2006). A absorção e biodisponibilidade dos polifenóis no organismo dependem do seu metabolismo no intestino delgado, o qual é influenciado por fatores como tamanho molecular, lipofilicidade, solubilidade e pKa, assim como o tempo de trânsito gastrointestinal, permeabilidade da membrana e pH do lúmen (SHAHIDI; NACZK, 2004b). Somente os polifenóis não absorvidos no estômago e no intestino delgado e os metabólitos excretados de volta para o intestino delgado são degradados pela microflora do intestino (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

Os compostos fenólicos são encontrados principalmente em frutas, vegetais, chás, vinhos e em várias ervas. O conteúdo total de compostos fenólicos presentes nas plantas é influenciado por diversos fatores intrínsecos (gênero, espécie, cultivar) e extrínsecos (condições de cultivo, colheita, armazenamento) (SAMMAN; BALASUNDRAM; SUNDRAM, 2006). Na Tabela 1 encontra-se o conteúdo de compostos fenólicos totais em extratos aquosos de várias ervas.

Os antioxidantes fenólicos oriundos das plantas possuem grande relevância para aplicações nutricionais e terapêuticas. As plantas aromáticas têm sido amplamente utilizadas para aumentar a vida de prateleira dos alimentos e na

medicina tradicional como tratamento para várias doenças (ABDALLA; ROOZEN, 2001; SHETTY; McCUE, 2003).

Tabela 1: Compostos fenólicos totais em extratos aquosos de ervas

Nome comum	Nome científico	Fenólicos totais (mg GAE/g peso fresco)*
Sálvia	<i>Salvia officinalis</i>	1,34 ± 0,09
Hortelã Pimenta	<i>Mentha piperita</i>	2,26 ± 0,16
Orégano da Grécia	<i>Origanum vulgare</i> ssp. <i>hirtum</i>	11,80 ± 0,60
Manjerona	<i>Origanum majoricum</i>	11,65 ± 0,29
Capim-limão	<i>Melissa officinalis</i>	1,26 ± 0,04
Tomilho limão	<i>Thymus citriodorus</i>	1,78 ± 0,03
Orégano mexicano	<i>Poliomintha longiflora</i>	17,51 ± 0,22
Alecrim	<i>Rosemarinus officinalis</i>	2,19 ± 0,15

* Dados expressos em miligrama de ácido gálico (GAE) por grama de peso fresco

Fonte: adaptado de WANG; ZHENG, 2001

O efeito antioxidante de especiarias foi inicialmente evidenciado por Chipault et al. (1952) em 32 especiarias, das quais o alecrim e a sálvia foram consideradas as mais eficazes. Posteriormente, esta ação foi comprovada no orégano, no tomilho, no gengibre, na pimenta, na mostarda, na canela, no coentro, entre outros (MELO et al., 2003).

2.4 ESPECIARIAS

As especiarias da família *Lamiaceae* são muito bem reconhecidas pelas suas propriedades antioxidantes, especialmente alecrim, sálvia, orégano e tomilho (ABDALLA; ROOZEN, 2001). Pesquisas têm demonstrado que a atividade antioxidante destas especiarias se deve em grande parte à elevada concentração de compostos fenólicos, dentre os quais o ácido rosmarínico (Figura 6), um éster do ácido cafeico, parece ser o mais importante (WANG; PROVAN; HELLIWELL, 2004).

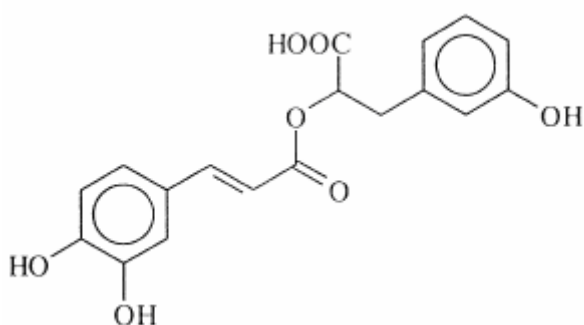


Figura 6: Estrutura do ácido rosmarínico
Fonte: YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001b

O ácido rosmarínico aparece como um componente importante nos extratos das especiarias da família *Lamiaceae* por possuir atividade antioxidante superior ao α -tocoferol e ao BHT (WANG; ZHENG, 2001). Segundo Shetty e McCue (2003), o ácido rosmarínico apresenta, além de propriedades antioxidantes, propriedades antiinflamatórias e propriedades potenciais antidiabéticas.

2.4.1 Sálvia (*Salvia officinalis* L.)

A sálvia é uma especiaria bastante utilizada como conservante de alimentos, especialmente carnes e queijos, como agente aromatizante em alimentos e perfumaria e na medicina tradicional no tratamento de várias doenças (TOPÇU, 2006). Pesquisas recentes têm demonstrado que o óleo essencial de sálvia pode

trazer benefícios para a memória, o que pode ser promissor para o tratamento do mal de Alzheimer (DURLING et al., 2007).

Os extratos de sálvia são muito bem reconhecidos devido às suas propriedades antioxidantes. A atividade antioxidante dos extratos de sálvia é atribuída principalmente à presença dos compostos carnosol, ácido carnósico e ácido rosmarínico (DURLING et al., 2007; HO et al., 1998). Os extratos de sálvia também contêm flavonóides, diterpenos e triterpenos, glicosídeos fenólicos e derivados de ácidos fenólicos que podem contribuir para a atividade antioxidante total (DURLING et al., 2007; HO et al., 1999b; NAKATANI; MIURA; KIKUZAKI, 2001, 2002). A concentração destes compostos nas folhas de sálvia depende de fatores genéticos, das condições ambientais e do estágio de desenvolvimento e crescimento da planta (ERIM; ÖZTEKIN; BASKAN, 2007; MIRJALILI et al., 2006).

Wang e Zheng (2001) verificaram que extratos de sálvia, analisados por HPLC, revelaram um grande número de flavonóides e ácidos fenólicos em concentrações significativas. Ácido rosmarínico (117,8 mg/100g peso fresco) e luteolina (33,4 mg/100g peso fresco) foram os constituintes fenólicos mais abundantes.

Cuvelier, Richard e Berset (1996) estabeleceram a correlação entre a atividade antioxidante e a composição dos extratos de sálvia e reconheceram que os compostos carnosol, ácido rosmarínico e ácido carnósico possuíam a melhor atividade antioxidante, seguidos pelo ácido cafeico.

2.4.2 Tomilho (*Thymus vulgaris* L.)

O tomilho é uma planta aromática com propriedades medicinais (HO et al., 1999a). Segundo Ho et al. (1999a), os extratos de tomilho possuem elevada atividade antioxidante e antimutagênica. Timol e carvacrol são os maiores componentes do óleo essencial de tomilho, e ambos mostram elevada atividade antioxidante e antimicrobiana (KÄHKÖNEN et al., 1999). De acordo com Ho et al. (1999a), o óleo essencial de tomilho também apresenta atividade antifúngica capaz de inibir o crescimento e a produção de aflatoxina de *Aspergillus parasiticus*.

Flavonóides e compostos bifenílicos (produtos resultantes da dimerização de timol e carvacrol) foram também reconhecidos como antioxidantes eficientes, inibindo a produção do ânion superóxido no sistema xantina/xantina oxidase e a peroxidação lipídica mitocondrial e microssomal (KÄHKÖNEN et al., 1999; WANG; ZHENG, 2001).

Segundo Wang e Zheng (2001) os compostos bifenílicos e os flavonóides isolados do tomilho apresentaram atividade antioxidante tão intensa quanto o BHT.

2.4.3 Alecrim (*Rosemarinus officinalis* L.)

O alecrim é uma das ervas mais utilizadas no processamento de alimentos. A primeira utilização de extratos de alecrim como antioxidante foi relatada por Rac e Ostric em 1955. Berner e Jacobson obtiveram uma patente em 1973 para produção de extratos de alecrim para uso como antioxidante, utilizando óleo como solvente (RAJALAKSHMI; NARASIMHAN, 1996; YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001b).

As propriedades antioxidantes do alecrim são muito bem reconhecidas. Ele é considerado um antioxidante lipídico e um quelante de metais, além de atuar na absorção de radicais superóxido (MADHAVI; SINGHAL; KULKARNI, 1996; SCHWARZ, 2002).

A atividade antioxidante dos extratos das folhas de alecrim se deve principalmente à presença dos diterpenos fenólicos carnosol e ácido carnósico. Outros diterpenos fenólicos como rosmanol, epirosmanol e metoxiepirosmanol estão presentes em quantidades menores e contribuem também para a atividade antioxidante dos extratos de alecrim (THORSEN; HILDEBRANDT, 2003).

Cavero et al. (2005) realizaram um estudo para avaliar a atividade antioxidante de extratos de alecrim obtidos via extração com fluido supercrítico. Segundo os autores, o composto mais abundante encontrado nos extratos de alecrim foi o ácido carnósico, perfazendo 34 a 78% do total dos compostos quantificados por HPLC. De acordo com este estudo, pôde-se estabelecer uma relação linear positiva entre a atividade antioxidante e a concentração de ácido

carnósico. Os resultados obtidos indicam ainda que a atividade antioxidante dos extratos de alecrim pode ser afetada, positiva ou negativamente, pela presença de outros compostos, derivados ou não do ácido carnósico.

2.4.4 Orégano (*Origanum vulgare*)

O orégano é muito utilizado como condimento e seu sabor e odor são muito apreciados em todo o mundo, além de possuir propriedades antimicrobianas e antioxidantes (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001b). Orégano desidratado, assim como os extratos obtidos por meio de solventes com polaridades diferentes (hexano, diclorometano, metanol), têm sido avaliados quanto à ação antioxidante em lipídios em sistemas modelo e em alimentos (MADHAVI; SALUNKE, 1996; YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001b).

Segundo Kulisic et al. (2004), os compostos presentes em maior quantidade no óleo essencial de orégano são os monoterpenos fenólicos carvacrol (32%) e timol (35%) e a atividade antioxidante desta especiaria é devida, principalmente, à presença desses compostos.

De acordo com Arcila-Lozano et al. (2004), os extratos de orégano têm se mostrado efetivos, e em alguns casos a níveis superiores aos exibidos pelo propil galato, BHT e BHA. Entretanto, sua aplicação industrial é limitada devido ao aroma e sabor que pode conferir aos alimentos.

O efeito positivo do orégano na saúde humana tem sido atribuído à sua atividade antioxidante tanto no óleo essencial quanto na fração fenólica solúvel (SHETTY et al., 2005). Kikuzaki e Nakatani (1988) isolaram cinco compostos fenólicos diferentes no extrato metanólico de folhas de orégano, sendo que o ácido rosmarínico estava presente em maior concentração. O ácido rosmarínico tem sido considerado um importante antioxidante, além de possuir propriedades antiinflamatórias.

Sahin et al. (2004) avaliaram a atividade biológica do óleo essencial e do extrato metanólico de *Origanum vulgare* ssp. *vulgare*. O estudo sugeriu que a espécie analisada possui compostos com atividade antimicrobiana e propriedades antioxidantes e pode ser usada para preservação e/ou aumento da vida-de-

prateleira de produtos crus ou processados, assim como em produtos farmacêuticos e em terapias naturais.

A avaliação da atividade antioxidante de extrato etanólico de *Origanum vulgare* por Tsimidou et al. (2002) indicou que este possui alta capacidade de absorção de radicais livres. Esta capacidade coincide com um alto conteúdo de compostos fenólicos, mas não é proporcional. Com o uso de cromatografia em camada delgada, foi verificado que o principal componente do extrato era o ácido rosmarínico, enquanto três diferentes bandas de flavonóides foram também identificadas. O estudo mostrou ainda que o extrato etanólico de *Origanum vulgare* inibiu 99,1% da atividade sequestrante do radical DPPH.

2.4.5 Manjerona (*Origanum majoricum*)

A manjerona é uma especiaria amplamente utilizada na medicina tradicional, assim como nas indústrias de alimentos e cosméticos. Esta especiaria apresenta propriedades carminativas, antiespasmódicas e diuréticas. A manjerona contém cerca de 3% de compostos voláteis, flavonóides, glicosídeos, taninos, esteróis e triterpenóides. Seus extratos mostraram possuir efeitos antioxidantes, antimicrobianos e antiinflamatórios (VÁGI et al., 2005).

Segundo Wang e Zheng (2001), os extratos de manjerona apresentaram elevada concentração de compostos fenólicos e atividade antioxidante superior ao α -tocoferol e ao BHA.

2.5 MANTEIGA

De acordo com a Portaria nº. 146, de 07 de março de 1996, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996), entende-se com o nome de manteiga o produto gorduroso obtido exclusivamente pelo batimento e malaxagem, com ou sem modificação biológica de creme pasteurizado derivado exclusivamente do leite de vaca, por processos tecnologicamente adequados. A matéria gorda da manteiga deverá ser composta exclusivamente de gordura láctea. Como ingredientes opcionais, podem ser adicionados cloreto de sódio na concentração máxima de 2 g/100 g de manteiga e fermentos lácticos, no caso de manteiga maturada.

A manteiga caracteriza-se por ser uma emulsão de água em óleo, consistência sólida, pastosa à temperatura de 20°C, de textura lisa uniforme, untosa, com distribuição uniforme de água (umidade). A cor deve ser branco amarelada, sem manchas ou pontos de outra coloração; sabor suave, característico, aroma delicado, sem odor e sabor estranhos (BRASIL, 1996).

A gordura láctea apresenta 98,3% de triglicerídios, 0,3% de diglicerídios, 0,03% de monoglicerídios, 0,1% de ácidos graxos livres, 0,8% de fosfolipídios, 0,3% de esteróis e traços de carotenóides e vitaminas lipossolúveis. Os ácidos graxos saturados de 4 a 18 carbonos constituem 70 – 75% do total de ácidos graxos. O ácido graxo saturado mais importante, do ponto de vista quantitativo, é o 16:0, perfazendo 25 – 30% do total, enquanto os ácidos 14:0 e 18:0 representam 10 – 13%. Os ácidos graxos insaturados correspondem a 25 – 30% do total de ácidos graxos. O ácido oléico (9c-18:1) é o principal ácido graxo *cis*-monoinsaturado, representando 15 – 21% do total. Existem aproximadamente 0,5% de ácido 11c-18:1, enquanto as proporções de outros isômeros *cis*-18:1 são pequenas. Outros ácidos *cis*-monoinsaturados aparecem em quantidades menores, mas significativas, a saber, 14:1 (1,0%) e 16:1 (1,5%). Os ácidos graxos poli-insaturados 18:2, 18:2 conjugado e 18:3 apresentam composição média de 1,5%, 1,2% e 1,0%, respectivamente (MacGIBBON; TAYLOR, 2006).

Embora a manteiga possua vida de prateleira relativamente longa (90 – 120 dias, 4°C), é um produto susceptível à oxidação lipídica. O desenvolvimento da rancidez oxidativa deve-se principalmente à oxidação dos ácidos graxos

insaturados, com a formação de peróxidos (OZKANLI; KAYA, 2007). Os principais produtos resultantes da decomposição dos hidroperóxidos são aldeídos saturados e insaturados, e em menor concentração, cetonas insaturadas, hidrocarbonetos saturados e insaturados e álcoois saturados e insaturados (O'CONNOR; O'BRIEN, 2006).

Vários fatores físicos, condições de processamento e armazenamento, constituintes químicos endógenos e exógenos e enzimas têm mostrado grande influência na taxa e extensão da oxidação lipídica na gordura láctea. Estes fatores incluem oxigênio, luz, íons metálicos, tocoferóis, carotenóides, tióis, proteínas e enzimas, produtos de reações de escurecimento, constituintes da membrana do glóbulo de gordura, temperatura de armazenamento e atividade de água. O balanço entre os fatores pró-oxidantes e antioxidantes é crítico para a estabilidade oxidativa da gordura láctea (O'CONNOR; O'BRIEN, 2006).

Wade, Al-Tahiri e Crawford (1986) relataram que o BHA e o BHT foram efetivos em retardar a oxidação da gordura láctea anidra, mas DL- α -tocoferol atuou como pró-oxidante.

Zegarska et al. (1996) avaliaram a atividade antioxidante de extrato etanólico de alecrim adicionado à manteiga. Os extratos foram adicionados nas concentrações de 1,0, 0,5 e 0,1%. As amostras com 1,0 e 0,5% de extrato sofreram alterações muito pequenas durante o armazenamento a 60°C, e o período de indução para as amostras adicionadas de 0,1% de extrato foi aproximadamente 3 vezes maior que o controle. O extrato etanólico de alecrim, nas concentrações testadas, aumentou a estabilidade oxidativa da manteiga na temperatura de 60°C.

Papadopoulou e Roussis (2008) mostraram que a N-acetil-cisteína e a glutatona apresentaram efeito antioxidante na manteiga durante os processos de armazenamento e cozimento.

Por outro lado, ainda existem poucas informações na literatura relacionadas ao aumento da vida de prateleira da manteiga com o uso de antioxidantes naturais ou sintéticos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Selecionar condimentos com alta atividade antioxidante para aplicação como agentes antioxidantes em manteiga.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as condições ótimas de extração de compostos fenólicos das especiarias *Rosemarinus officinalis* L. (alecrim), *Origanum vulgare* (orégano), *Salvia officinalis* L. (sálvia), *Thymus vulgaris* L. (tomilho) e *Origanum majoricum* (manjerona);
- Quantificar compostos fenólicos totais nos extratos alcoólicos e aquosos obtidos a partir das especiarias alecrim, orégano, sálvia, tomilho e manjerona;
- Determinar a atividade antioxidante nos extratos brutos das especiarias pelos métodos de inibição do radical DPPH, peroxidação lipídica do ácido linoleico e teste de FRAP;
- Avaliar a citotoxicidade e o efeito antioxidante do extrato alcoólico de *Rosemarinus officinalis* L. (alecrim) pelo método de redução do MTT;
- Avaliar a estabilidade oxidativa da manteiga adicionada de compostos fenólicos provenientes do extrato alcoólico de alecrim.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATÉRIAS-PRIMAS

As especiarias *Origanum vulgare* (orégano), *Rosemarinus officinalis* L.(alecrim), *Salvia officinalis* L. (sálvia), *Thymus vulgaris* L. (tomilho) e *Origanum majoricum* (manjerona) foram adquiridas no mercado local, em Londrina-PR, Brasil, e utilizadas parcialmente desidratadas (umidade 9,1%, 12,0%, 13,1%, 11,1% e 14,0% respectivamente).

A manteiga utilizada nos ensaios foi obtida através do batimento do creme de leite pasteurizado com 40% de gordura, à temperatura de 15°C. O batimento teve duração de 20 minutos, tempo necessário para ocorrer a inversão de fase (óleo em água para água em óleo), seguido de duas lavagens com água à temperatura de 4°C para remoção do leite residual. Após as lavagens, a manteiga foi submetida à malaxagem para facilitar a soldagem dos grãos, formando uma massa compacta e homogênea e pulverizar finamente a fase aquosa. A manteiga foi caracterizada quanto à: umidade, lipídios e extrato seco desengordurado, de acordo com as metodologias da AOAC (1995).

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Produção dos extratos das especiarias

Os extratos foram obtidos através da extração com a combinação dos solventes etanol e água. Amostras de 10 g do material seco (folhas trituradas em moinho de martelos) foram extraídas com 100 mL de solvente, durante 2, 4 e 6 horas, à temperatura de 30°C, sob agitação constante, em incubadora refrigerada MARCONI. Após a extração, as amostras foram filtradas a vácuo e armazenadas

sob refrigeração (-18°C) e ao abrigo de luz. As extrações foram realizadas em duplicata (Figura 7).

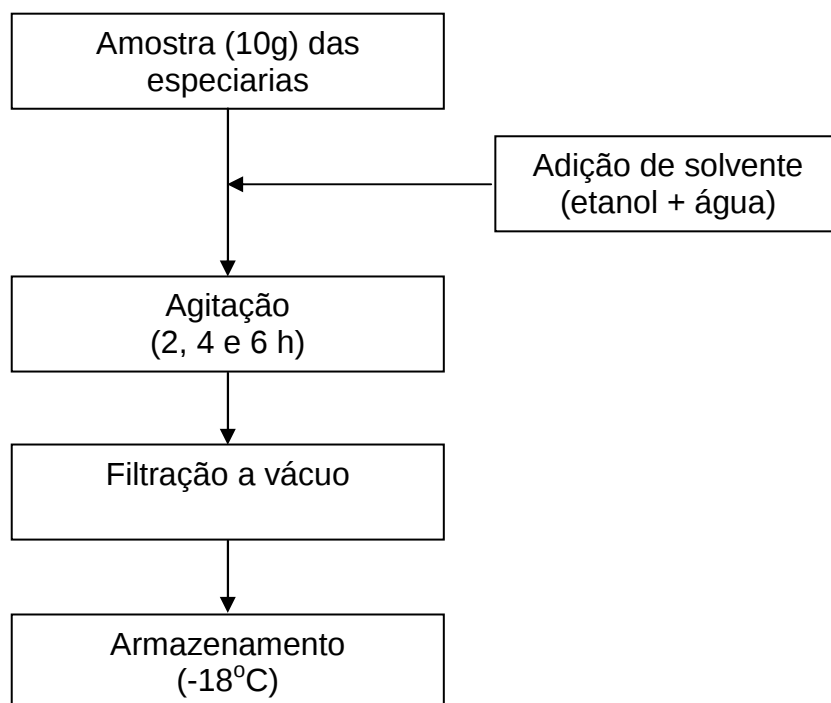


Figura 7: Fluxograma do processo de extração de compostos fenólicos das especiarias

O delineamento experimental foi planejado para avaliar o impacto de dois fatores (variáveis independentes), tempo de extração (2, 4 e 6 horas) e proporção entre os solventes etanol e água (0, 40 e 80% de etanol), na extração de compostos fenólicos (variável dependente) das especiarias. Os níveis das variáveis dependentes a serem testados foram estabelecidos com base em valores teóricos obtidos da literatura (Tabela 2) (CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005; SHETTY et al., 2005; TSIMIDOU et al., 2002). As condições ótimas de extração dos compostos fenólicos das especiarias foram estabelecidas com base em um planejamento fatorial 3^2 .

Tabela 2: Valores experimentais e níveis codificados das variáveis independentes, para o planejamento fatorial 3^2

Variáveis independentes		Codificação		
		-1	0	+1
Concentração de etanol (%)	X1	0	40	80
Tempo de extração (h)	X2	2	4	6

Após obtenção da resposta para cada ponto do planejamento, foi realizada análise estatística dos dados, utilizando-se o software *Statistic 5.0*. O comportamento do sistema foi descrito pelo polinômio de segunda ordem (Equação 3).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1 X_1 + \beta_{22} X_2 X_2 \quad (\text{Equação 3})$$

4.3 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999). Um mililitro de extrato foi adicionado a 1 mL de etanol 95%, 5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu 1N. Após 5 minutos, foi adicionado 1 mL de Na_2CO_3 5%, e a mistura reagente permaneceu em repouso durante 60 minutos, à temperatura ambiente. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada através de leitura de absorbância em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1240, a 725 nm, utilizando curva padrão de ácido gálico (10 – 100 $\mu\text{g/mL}$) em etanol 95%.

4.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.4.1 Sistema de inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

Para avaliar a capacidade dos extratos das ervas sequestrarem o radical do DPPH, foi utilizada a metodologia modificada de Cervato et al. (2000), de acordo com Shetty et al. (2005).

DPPH é um radical livre que quando dissolvido em etanol produz coloração azul-violeta. A perda de cor indica atividade sequestrante dos compostos antioxidantes presentes nos extratos. Três mililitros de DPPH 60 µM em etanol foram adicionados a 1 mL de extrato alcoólico e incubados à temperatura ambiente por 15 minutos. Foi realizada leitura de absorbância em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1240, a 517 nm e a atividade antioxidante foi calculada como a porcentagem de inibição do radical DPPH, de acordo com a equação 4. Como controle, foi utilizado 1 mL de etanol 95% em substituição aos extratos.

$$\% \text{ inibição} = \left(\frac{A_{517}^{\text{controle}} - A_{517}^{\text{extrato}}}{A_{517}^{\text{controle}}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 4})$$

4.4.2 Peroxidação lipídica do ácido linoléico

A peroxidação lipídica do ácido linoléico foi determinada através da medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando a metodologia modificada de McDonald e Hultin (1997), de acordo com Shetty et al. (2005).

Foi preparada uma emulsão através da homogeneização de 1% de ácido linoléico e 1% de Tween 40 em 100 mL de água destilada. 0,8 mL da emulsão foi adicionada em tubos contendo 0,2 mL de cada extrato, e os tubos foram incubados a 50°C por 10 horas. Um mililitro das misturas foi adicionado a 2,0 mL do reagente TBA (100 mL de solução estoque constituída de 15% de ácido

tricloroacético, 0,375% de ácido tiobarbitúrico e HCl 0,25M + 3 mL de solução 2% de BHT em etanol), agitadas energeticamente e deixadas em banho de água em ebulição por 15 minutos. Após resfriamento em água por 10 minutos, as soluções foram centrifugadas em centrífuga TECNAL CELM COMBATE por 15 minutos a 2000xg. Após 10 minutos, mediu-se a absorbância em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1240, a 532 nm. TBARS foi calculada através de curva padrão preparada com 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) e os resultados expressos em mol de malondialdeído/mL de amostra.

4.4.3 FRAP (poder antioxidante pela redução do ferro)

O poder antioxidante pela redução do ferro (FRAP) foi determinado de acordo com a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996) e Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000). O reagente de FRAP foi preparado na concentração de 10:1:1 com as soluções: tampão acetato de sódio 300 mM em pH 3,63; solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazine (TPTZ) 10 mM em ácido clorídrico 40 mM e solução de cloreto férrico 20 mM. Este reagente foi preparado no momento da análise. Como padrão foi utilizado o ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-carboxílico (TROLOX) na concentração de 1 mM. A leitura de absorbância foi realizada em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1240 a 593 nm, utilizando o reagente FRAP para zerar o equipamento. As leituras foram monitoradas durante 6 minutos a cada 15 segundos. A variação da absorbância entre o tempo 0 e 6 minutos foi calculada para cada amostra, sendo traduzida em um valor de FRAP por proporcionalidade com a da solução padrão testada em paralelo. O resultado foi expresso em μmol de equivalentes de TROLOX (valor de FRAP)/g de amostra.

4.5 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DO EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ALCOÓLICO DE ALECRIM PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO MTT

Para avaliação da citotoxicidade do extrato alcoólico de alecrim foram utilizadas células pancreáticas derivadas de insulinoma de rato, denominada linhagem RINm5F. Essas células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (GIBCO Invitrogen Life Technologies), contendo 11,1 mM de glicose, 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO Invitrogen Life Technologies), 50 U/mL de antibiótico penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Cutilab) e foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂ em estufa umidificada FISHER SCIENTIFIC – Isotemp. As células foram semeadas em microplacas de 96 cavidades em uma concentração inicial de 5x10⁴ células/cavidade e cultivadas por 24 horas, período necessário para a adesão celular. Após esse período, o meio de cultura de cada cavidade foi retirado e substituído por 200 µL de meio na ausência (controle/veículo) ou presença de diferentes concentrações do extrato alcóolico de alecrim (0; 5; 12,5; 25; 50; 250; 500 e 1000 µg/mL). As células foram cultivadas por 48 horas em estufa umidificada e a 37°C e 5% de CO₂. A citotoxicidade de diferentes concentrações do extrato foi avaliada pela redução do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]), de acordo com o método descrito por Mosmann (1983). Neste teste, o parâmetro avaliado foi a porcentagem de viabilidade celular através da equação 5:

$$\% \text{ viabilidade} = \left(\frac{A_{546}^{\text{amostra}}}{A_{546}^{\text{controle}}} \right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média de 8 amostras por grupo. Foram realizados dois experimentos independentes.

Para avaliar o efeito antioxidante do extrato alcoólico de alecrim foram utilizadas as concentrações de 50, 250 e 500 µg/mL de compostos fenólicos. As células foram submetidas ao estresse oxidativo na presença de 100 µM de peróxido de hidrogênio (agente oxidante) por um período de 60 minutos em estufa a 37°C.

Após o estresse, o meio foi retirado, as células foram lavadas uma vez com tampão PBS gelado e foi realizado o ensaio de redução do MTT para avaliação da viabilidade celular e possível capacidade protetora do extrato de alecrim.

4.6 ESTABILIDADE OXIDATIVA DA MANTEIGA

A avaliação da estabilidade oxidativa consistiu em adicionar à manteiga diferentes concentrações de compostos fenólicos provenientes do extrato alcoólico de alecrim (200, 300, 400, 500 e 1250 ppm) e submetê-la às temperaturas de 60 e 110°C, pelo método *Schaal Oven Test* descrito por Papadopoulos e Roussis (2008). As temperaturas de 60 e 110°C são comumente utilizadas nos ensaios de oxidação acelerada. A temperatura de 60°C simula o armazenamento em condições ambiente e pode ser correlacionada com o armazenamento refrigerado (4°C). O aquecimento a 110°C correlaciona-se com as condições de cocção. Os extratos foram adicionados na forma líquida à manteiga previamente fundida a 40°C. Amostras de manteiga (30 g) foram armazenadas em frascos de vidro abertos, de 80 mL de capacidade, em estufa com circulação e renovação de ar TECNAL TE-394/2, na ausência de luz. As amostras mantidas a 60°C foram armazenadas por 40 dias e as amostras mantidas a 110°C por 72 horas. Foram determinados o índice de peróxido (IP) e as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nos seguintes intervalos de tempo: a cada dois dias para as amostras armazenadas a 60°C e para as amostras armazenadas a 110°C, de duas em duas horas nas primeiras 12 horas, e de 12 em 12 horas no restante do período, totalizando 72 horas. As determinações foram realizadas em triplicata. Os controles consistiram de manteiga sem adição de antioxidantes e manteiga adicionada do antioxidante sintético BHT na concentração de 200 ppm (Tabela 3).

A concentração de BHT foi determinada de acordo com os padrões estabelecidos pelo *Codex Alimentarius* (CODEX STAN 191-1995).

Tabela 3: Delineamento experimental para avaliação da estabilidade oxidativa da manteiga

Tratamento	Compostos fenólicos (ppm)	Temperatura (°C)
1	200	60
2	300	60
3	400	60
4	500	60
5	1250	60
6	200	110
7	300	110
8	400	110
9	500	110
10	1250	110
Controle 1	BHT 200 ppm	
Controle 2	Manteiga sem adição de antioxidantes	

4.6.1 Índice de peróxido

Os produtos primários da oxidação foram determinados pela medida do índice de peróxido (IP) de acordo com AOCS, método Cd 8-53, 1996. A manteiga foi aquecida até a fusão (aproximadamente 60°C), com agitação lenta, em chapa de baixo aquecimento. Após a fusão, decantou-se a fase oleosa em um béquer e filtrou-se em papel de filtro Whatman nº. 4 para remoção da umidade. Aproximadamente 5g de manteiga foram pesados em erlenmeyer de boca esmerilhada e adicionados de 30 mL da mistura solvente ácido acético – clorofórmio (3:2 v/v) e 0,5 mL de solução de iodeto de potássio saturada. A mistura foi agitada por exatamente 1 minuto, com movimento rotatório. Após 1 minuto adicionou-se 30 mL de água destilada para parar a reação. A amostra foi titulada com solução padrão de tiossulfato de sódio 0,01N, usando como indicador 1 mL de solução de amido 1%. Os resultados foram expressos em miliequivalentes de oxigênio ativo/kg de amostra.

4.6.2 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (produtos secundários da oxidação) foram determinadas de acordo com a metodologia modificada de Papadopoulos e Roussis (2008) e Shetty et al. (2005). 1,5g de manteiga foram dissolvidos em 1,5 mL de clorofórmio em tubo de vidro com tampa. Adicionou-se 5 mL do reagente TBA (100 mL de solução estoque constituída de 15% de TCA, 0,375% de TBA e HCl 0,25M + 3 mL de solução 2% de BHT em etanol) e a amostra permaneceu em banho de água em ebulição por 15 minutos. Após resfriamento em água por 10 minutos, a amostra foi centrifugada por 15 minutos a 2000xg em centrífuga TECNAL COMBATE. Após 10 minutos, mediu-se a absorbância em espectrofotômetro UV-VIS Shimadzu 1240 a 532 nm. TBARS foi calculada através de curva padrão preparada com 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP) e os resultados expressos em mol de malondialdeído/g de amostra.

4.6.3 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicada e os resultados expressos como média $\pm$ erro padrão da média das repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de diferença de médias de Tukey, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CONDIÇÕES ÓTIMAS DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

De acordo com os resultados obtidos (Tabela 4, Figura 8), as condições experimentais ótimas para extração de compostos fenólicos foram 40% de etanol durante 4 horas para alecrim, orégano, manjerona e sálvia e 40% de etanol durante 6 horas de extração para o tomilho. Como não houve diferença significativa entre a concentração de compostos fenólicos nos tempos 4 e 6 horas para alecrim, orégano, manjerona e sálvia, foi determinado 4 horas como o tempo ótimo.

A eficiência na extração de compostos fenólicos é influenciada por múltiplos parâmetros, como temperatura, tempo de extração, polaridade do solvente, entre outros. Segundo Shahidi e Liyana-Pathirana (2005), a seleção de condições apropriadas é crucial para a extração de compostos fenólicos, já que essas condições variam de acordo com a natureza dos compostos fenólicos presentes nas diversas plantas.

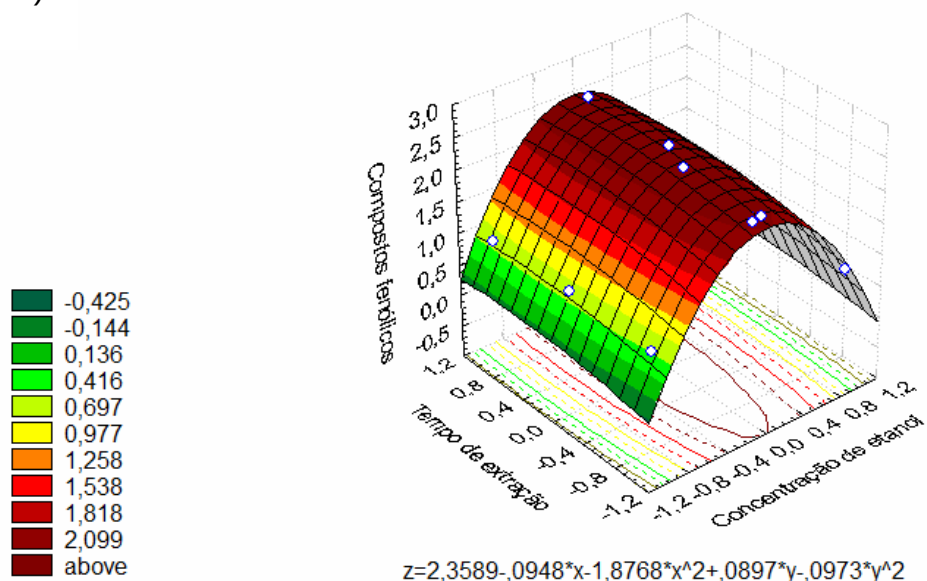
Tabela 4: Compostos fenólicos totais nos extratos das especiarias, para o planejamento fatorial 3²

	Concentração de etanol (%)	Tempo de extração (h)	Compostos fenólicos totais* (EAG/mL)**				
			Alecrim	Orégano	Manjerona	Tomilho	Sálvia
1	0	2	0,476 ^a	1,183 ^a	1,012 ^a	0,337 ^a	0,321 ^a
2	0	4	0,556 ^a	1,674 ^b	1,251 ^b	0,609 ^b	0,569 ^b
3	0	6	0,504 ^a	1,832 ^b	1,303 ^b	0,597 ^b	0,598 ^b
4	40	2	1,992 ^b	4,909 ^c	2,219 ^c	1,726 ^c	2,126 ^c
5	40	4	2,440 ^c	5,350 ^d	2,390 ^d	2,040 ^d	2,280 ^d
6	40	6	2,450 ^c	5,400 ^d	2,400 ^d	2,150 ^e	2,300 ^d
7	80	2	0,294 ^d	0,475 ^e	0,736 ^e	0,106 ^f	0,560 ^b
8	80	4	0,327 ^d	0,604 ^e	0,803 ^e	0,154 ^f	0,664 ^{b,e}
9	80	6	0,346 ^d	0,610 ^e	0,808 ^e	0,169 ^f	0,710 ^e

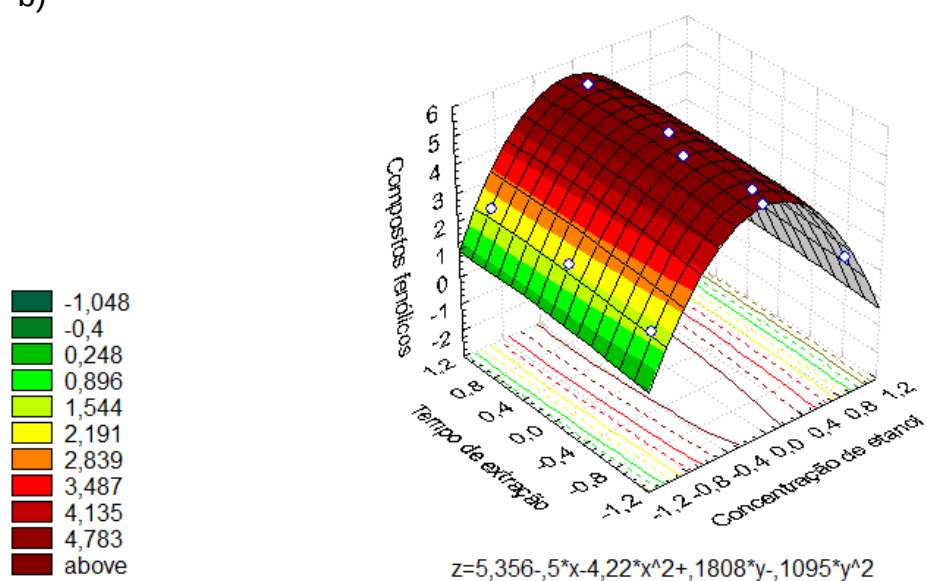
* Dados expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) por mililitro de extrato

** Médias seguidas de letras diferentes, na mesma coluna, diferem entre si ao nível de 5% (Tukey)

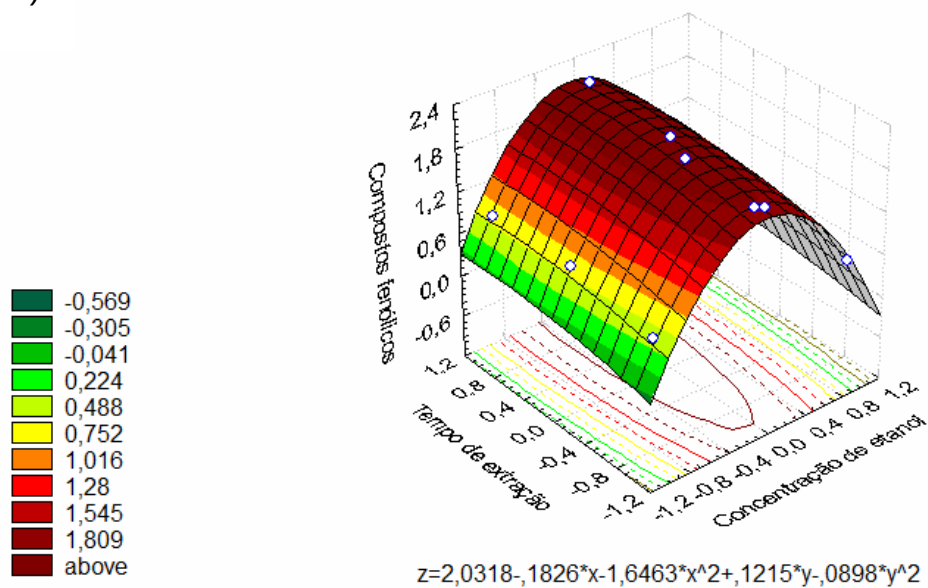
a)

Rosemarinus officinalis L.

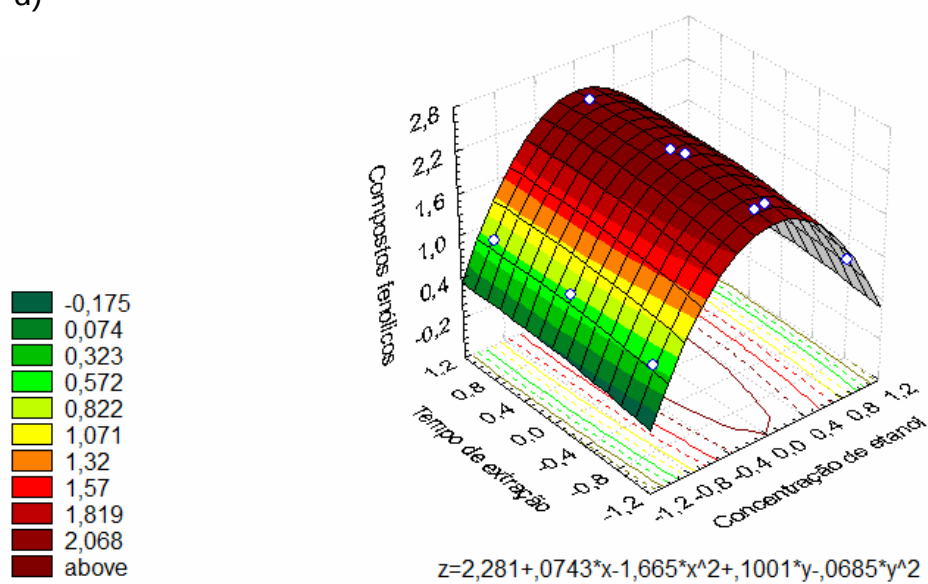
b)

Origanum vulgare

c)

Thymus vulgaris L.

d)

Salvia officinalis L.

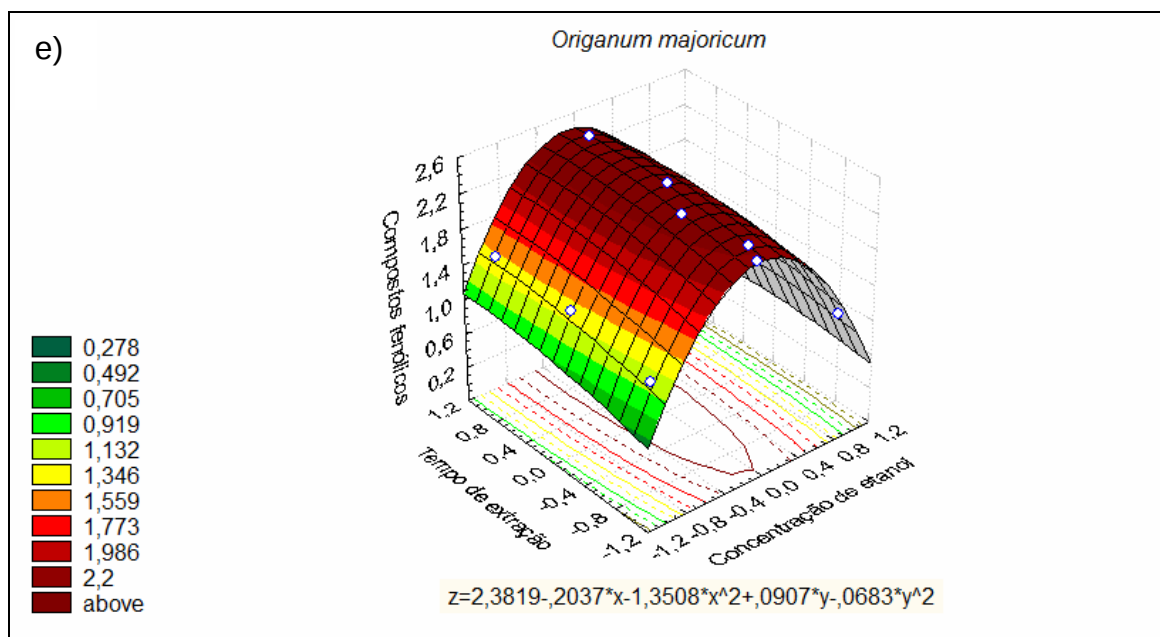


Figura 8: Resposta para os efeitos de concentração de etanol e tempo de extração sobre a concentração de compostos fenólicos totais das especiarias de acordo com metodologia de superfície de resposta: a) *Rosemarinus officinalis* L. (alecrim); b) *Origanum vulgare* (orégano); c) *Thymus vulgaris* L. (tomilho); d) *Salvia officinalis* L. (sálvia); e) *Origanum majoricum* (manjerona)

Através da análise dos efeitos (Tabela 5) para as especiarias orégano, manjerona e tomilho verificou-se que a concentração de compostos fenólicos foi favorecida pela redução da concentração de etanol (efeitos lineares negativos) e pelo aumento no tempo de extração (efeitos lineares positivos). Para o alecrim, a maior extração de compostos fenólicos foi favorecida pela redução da concentração de etanol e pela redução no tempo de extração. Os extratos de sálvia apresentaram comportamento distinto dos extratos das demais especiarias no que diz respeito à concentração de etanol, já que um aumento na concentração de etanol favoreceria a extração dos compostos fenólicos. Os resultados sugerem ainda que a resposta obtida (concentração de compostos fenólicos) com relação à variável concentração de etanol está próxima ao máximo, já que os termos quadráticos para esta variável foram significativos.

Tabela 5: Efeitos para os extratos das especiarias no planejamento fatorial 3²

	Alecrim		Orégano		Manjerona		Tomilho		Sálvia	
Fator	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p	Efeito	p
X1 (L) *	-0,1896	0,163	-1,000	0,001	-0,406	0,001	-0,365	0,010	0,149	0,012
X1 (Q)	1,8768	0,001	4,220	0,001	1,351	0,001	1,646	0,001	1,665	0,001
X2 (L) **	-0,1793	0,182	0,362	0,030	0,181	0,018	0,243	0,039	0,200	0,004
X2 (Q)	0,0973	0,369	0,109	0,314	0,068	0,171	0,089	0,226	0,068	0,077

* X1 → Concentração de etanol (%)

**X2 → Tempo de extração (h)

Os valores em negrito correspondem aos efeitos significativos a 5% de significância.

A concentração de compostos fenólicos obtida para os extratos alcoólicos de alecrim, manjerona e sálvia, nas condições ótimas de extração, não foi significativamente diferente ($p < 0,05$) (Tabela 6). O extrato alcoólico de orégano apresentou a maior concentração em compostos fenólicos, embora se saiba que a concentração não é o único fator a ser considerado quando se pretende avaliar o potencial antioxidante de uma matéria-prima. Muitas vezes, a composição em compostos fenólicos é mais significativa do que a concentração, no que diz respeito à atividade antioxidante. O extrato das folhas de alecrim apresenta elevada concentração de ácido rosmarínico, com propriedades biológicas bem reconhecidas (SHAHIDI; NACZK, 1995).

Tabela 6: Concentração de compostos fenólicos totais nos extratos alcoólicos de alecrim, orégano, manjerona, tomilho e sálvia, nas condições ótimas de extração.

Extrato alcoólico (EAG*/mL)**	
Alecrim	2,440 ^b
Orégano	5,350 ^a
Manjerona	2,390 ^b
Tomilho	2,150 ^c
Sálvia	2,280 ^{b,c}

* Dados expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) por mililitro de extrato

**Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si (Tukey, 5%)

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.2.1 Sistema de inibição do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)

O decaimento da absorbância dos extratos alcoólicos de alecrim, orégano, manjerona, tomilho e sálvia quando comparado à absorbância do controle (etanol 95%) pode ser interpretado como a porcentagem de seqüestro de radicais livres (Figura 9).

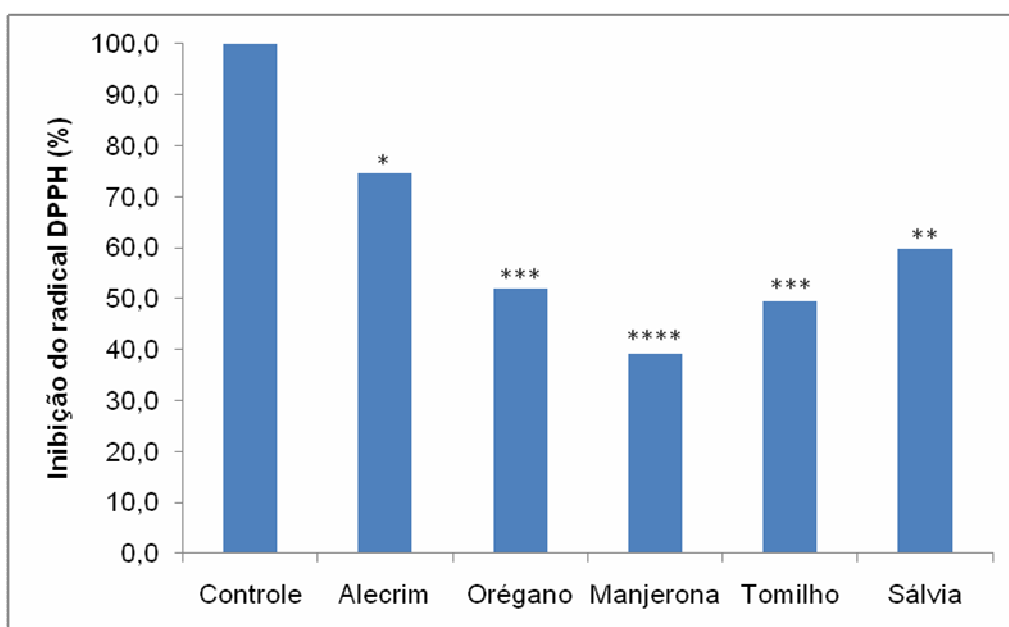


Figura 9: Inibição do radical DPPH em extratos alcoólicos de alecrim, orégano, manjerona, tomilho e sálvia.

* Tukey, 5%

O extrato alcoólico de alecrim apresentou a maior atividade antioxidante, inibindo 74,63% do radical DPPH, seguido do extrato de sálvia (59,75% de inibição). Entre os extratos alcoólicos de orégano e tomilho não houve diferença ao nível de 5% (Tukey) na inibição do radical DPPH (52,10 e 49,48% respectivamente). O extrato alcoólico de manjerona apresentou a menor atividade antioxidante, inibindo apenas 39,20% do radical DPPH.

Os resultados obtidos no ensaio utilizando o reagente Folin-Ciocalteu sugerem que a estrutura química dos compostos fenólicos individuais presentes nos

extratos estão mais relacionados à maior atividade antioxidante do que a concentração de fenólicos. Segundo Shetty et al. (2005) este fato pode indicar que uma concentração crítica de compostos fenólicos é suficiente para obter uma atividade antioxidante desejada e depois disso ocorre um efeito de saturação e a presença de fenólicos adicionais não aumenta a atividade antioxidante.

A alta atividade antioxidante do extrato alcoólico de alecrim é relacionada principalmente à presença dos diterpenos fenólicos ácido carnósico e carnosol, e do ácido rosmarínico. Nas folhas frescas de alecrim o ácido carnósico é o diterpeno fenólico encontrado em maior concentração. Durante a extração dos compostos fenólicos do alecrim, o ácido carnósico é parcialmente convertido em carnosol ou outros diterpenos, que posteriormente podem ser degradados produzindo outros diterpenos fenólicos com estrutura lactona ou compostos com estrutura desconhecida. Estes compostos são mais lipofílicos que o ácido carnósico, mas atuam também como antioxidantes. A atividade antioxidante desses produtos de degradação é relativamente alta em temperaturas similares às temperaturas de fritura. Quando comparados com outros antioxidantes, os diterpenos do alecrim exibem maior atividade antioxidante que muitos antioxidantes fenólicos comumente usados (NOGALA-KALUCKA et al., 2005). Segundo Cavero et al. (2005) existe uma correlação linear positiva entre a atividade antioxidante e a concentração de ácido carnósico, ou seja, quanto maior a concentração de ácido carnósico, maior a atividade antioxidante, avaliada pelo método de inibição do radical DPPH. Segundo os mesmos autores, a atividade antioxidante dos extratos de alecrim pode ser afetada, positiva ou negativamente, pela presença de outros compostos, derivados ou não do ácido carnósico.

5.2.2 Peroxidação lipídica do ácido linoleico

A peroxidação lipídica do ácido linoléico avaliada pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico baseia-se na reação do ácido tiobarbitúrico com os produtos de decomposição de hidroperóxidos, e um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malondialdeído, um aldeído de cadeia curta (BORGES; SILVA; FERREIRA, 1999). O controle, no qual a

produção de malondialdeído é máxima, foi utilizado para avaliar a redução percentual na produção deste composto, na presença dos extratos alcoólicos. A produção de malondialdeído não foi significativamente diferente ($p < 0,05$) na presença dos extratos alcoólicos de alecrim, manjerona e tomilho (Tabela 7, Figura 10). A maior redução percentual na produção de malondialdeído ocorreu na presença dos extratos alcoólicos de alecrim, manjerona e tomilho, os quais reduziram a produção de malondialdeído em 60,86; 60,80; e 56,64%, respectivamente (Tabela 7). Estes resultados indicam maior atividade antioxidante desses extratos quando comparados aos extratos de orégano e sálvia (redução de 44,98 e 51,60%, respectivamente, na produção de malondialdeído). Esses dados corroboram com os resultados obtidos no ensaio utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, reforçando a importância da natureza dos compostos fenólicos na maior atividade antioxidante.

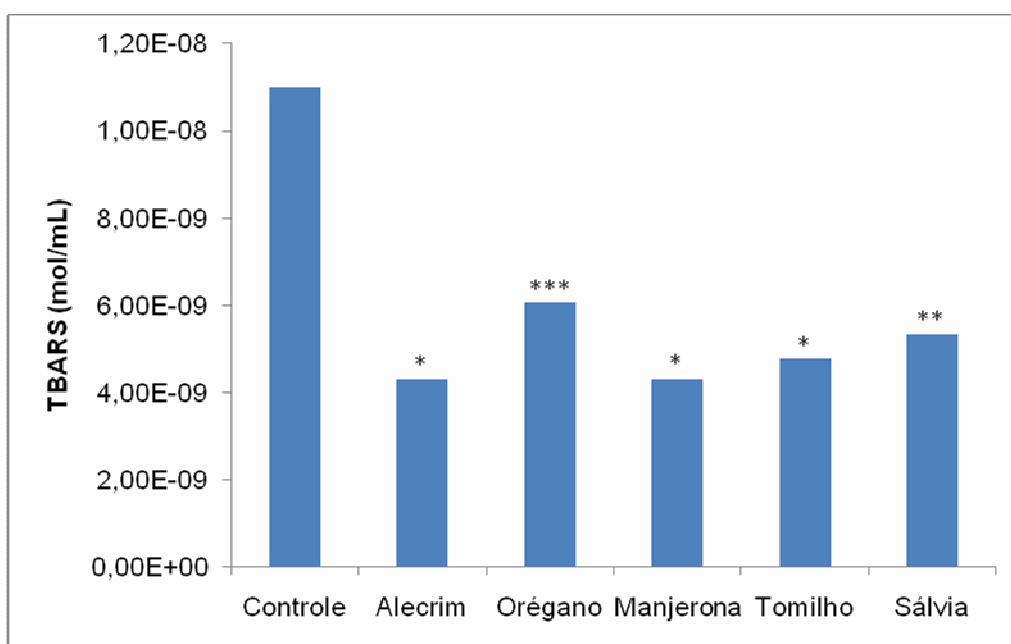


Figura 10: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) produzidas na presença dos extratos alcoólicos de alecrim, orégano, manjerona, tomilho e sálvia.

* Tukey, 5%

Tabela 7: Redução percentual na produção de TBARS na presença dos extratos alcoólicos das especiarias

	TBARS (mol/mL)*	Redução na produção de TBARS (%)
Controle	$1,10 \cdot 10^{-8} \text{ a}$	
Alecrim	$4,31 \cdot 10^{-9} \text{ d}$	60,86
Orégano	$6,06 \cdot 10^{-9} \text{ b}$	44,98
Manjerona	$4,32 \cdot 10^{-9} \text{ d}$	60,80
Tomilho	$4,77 \cdot 10^{-9} \text{ d}$	56,64
Sálvia	$5,33 \cdot 10^{-9} \text{ c}$	51,60

*Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si (Tukey, 5%)

Segundo Wang e Zheng (2001) o tomilho apresenta flavonóides e compostos bifenílicos resultantes da dimerização do timol e carvacrol (componentes do óleo essencial) e que apresentam comportamento antioxidante mais eficiente, quando comparado com o BHT. Wang e Zheng (2001) concluíram que os compostos fenólicos dos extratos de manjerona possuem efeito antioxidante comparável com α -tocoferol e BHA.

5.2.3 FRAP (poder antioxidante pela redução do ferro)

O teste de FRAP baseia-se no fato de que a habilidade de um composto em produzir Fe^{2+} a partir de Fe^{3+} define sua força antioxidante (GOULART et al., 2007; PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

De acordo com os resultados do teste de FRAP, nesse experimento, o extrato alcoólico de orégano apresentou o maior poder redutor, seguido dos extratos de alecrim, manjerona, tomilho e sálvia (Tabela 8).

A diferença encontrada no valor da atividade antioxidante para as amostras analisadas pode ser explicada não somente pela concentração de fenóis totais, mas também pela variação que ocorre nos compostos fenólicos individuais. As propriedades antioxidantes de compostos fenólicos únicos, dentro de uma mesma classe fenólica, podem variar de forma notável, de maneira que os mesmos níveis destes compostos não correspondam às mesmas atividades antioxidantes

(TSAO et al., 2005). Segundo Prior, Wu e Schaich (2005) o poder de redução parece estar relacionado com o grau de hidroxilação e com a extensão da conjugação nos polifenóis. A oxidação ou redução de radicais a íons bloqueia as reações radicalares em cadeia, e o poder redutor se reflete na habilidade dos compostos em modular *redox tone* no plasma e em tecidos, uma vez que íons metálicos atuam como propagadores das reações oxidativas.

Tabela 8: Valores de FRAP para os extratos alcoólicos de alecrim, orégano, manjerona, tomilho e sálvia

Extrato alcoólico	FRAP ($\mu\text{mol de TROLOX/g amostra}$)
Alecrim	89,620 ^b
Orégano	154,367 ^a
Manjerona	87,911 ^b
Tomilho	61,234 ^c
Sálvia	70,063 ^c

*Médias seguidas de mesmas letras não diferem entre si (Tukey, 5%).

5.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E DO EFEITO ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ALCOÓLICO DE ALECRIM PELO MÉTODO DE REDUÇÃO DO MTT

Compostos antioxidantes presentes em frutas, vegetais e especiarias podem oferecer muitos benefícios à saúde, como a proteção celular contra danos oxidativos. Porém, quando consumidos em doses elevadas, estes compostos podem não ser efetivos ou seguros, podendo apresentar efeito tóxico e possivelmente prejudicial à saúde humana. Frente a esta situação, torna-se fundamental o estudo da toxicidade e da atividade biológica destes compostos antioxidantes, a fim de garantir que a inclusão dos mesmos em um determinado alimento não apresente risco à saúde do consumidor.

Para avaliar o efeito antioxidante do extrato alcoólico de alecrim em células pancreáticas de ratos foi primeiramente definida a concentração de extrato que fornecesse pelo menos 90% de viabilidade celular. A citotoxicidade do extrato alcoólico de alecrim foi testada utilizando as concentrações de 1000, 500, 250, 50, 25, 12,5 e 5 µg/mL de compostos fenólicos. A partir deste ensaio foi verificado que não é indicado trabalhar com a concentração de 1000 µg/mL, uma vez que nesta concentração verificou-se uma viabilidade média de 79,14%, ou seja, abaixo de 90% (Figura 11). O'Brian, Aherne e Kerry (2007) avaliaram o efeito da toxidez de extrato comercial de alecrim com 7% de ácido rosmarínico (p/v) em células de adenocarcinoma de cólon de caucasianos e observaram que em concentrações superiores a 30 µg/mL houve redução progressiva na viabilidade celular.

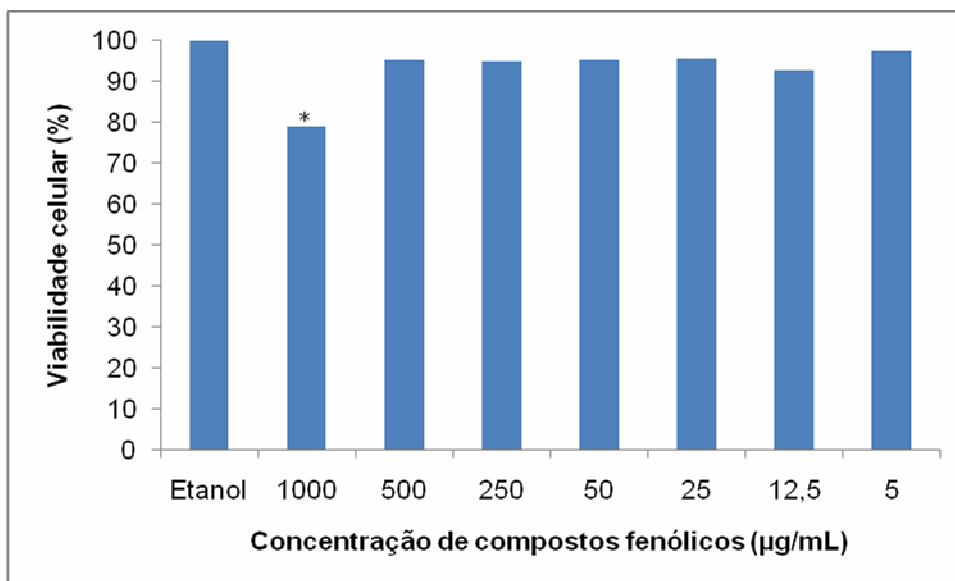


Figura 11: Citotoxicidade do extrato alcoólico de alecrim

* $p < 0,001$

O extrato alcoólico de alecrim apresentou uma atividade citoprotetora concentração-dependente entre 50 e 250 µg/mL. Nestas concentrações, a viabilidade celular foi de 84,75 e 93,13%, respectivamente. Entretanto, em concentração de 500 µg/mL, apresentou efeito pró-oxidante, potencializando o efeito do peróxido de hidrogênio e diminuindo ainda mais a viabilidade celular (65,19%) (Figura 12). Pesquisas têm mostrado que o efeito antioxidante do alecrim *in vitro* é devido à sua habilidade de atuar como agente redutor e sequestrador de radicais livres, impedindo a formação de O_2 singlete e complexando com íons metálicos pró-oxidantes. O efeito citoprotetor pode ser devido, em parte, à sua eficiência de complexação com radicais livres e poder de redução, como resultado dos seus constituintes fenólicos e/ou não-fenólicos (O'BRIAN; AHERNE; KERRY, 2007).

Lee et al. (2008) observaram efeito concentração-dependente na viabilidade de células de fibroblastos de pulmão de ratos chineses, linhagem V 79-4, submetidas ao estresse oxidativo com 300 µM de H_2O_2 na presença de extrato metanólico de alecrim. Neste estudo, observou-se efeito protetor progressivo entre 50 e 200 µg/mL de compostos fenólicos.

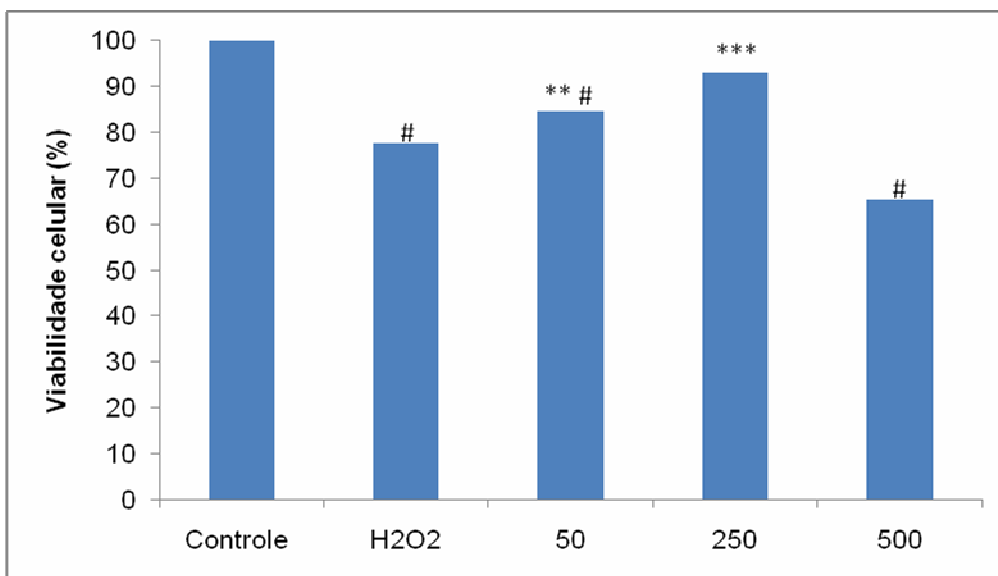


Figura 12: Efeito citoprotetor do extrato alcoólico de alecrim no ensaio de redução de MTT.

** p<0,01

*** p<0,001 comparação com o grupo controle com H_2O_2

p< 0,001 comparação com o grupo controle sem H_2O_2

Os resultados aqui obtidos sugerem que o uso do alecrim como antioxidante natural é seguro nas concentrações testadas neste trabalho e, segundo O`Brian, Aherne e Kerry (2007), devido às suas propriedades antioxidantes pode promover efeitos benéficos à saúde.

5.4 ESTABILIDADE OXIDATIVA DA GORDURA LÁCTEA (MANTEIGA) ADICIONADA DE EXTRATO ALCOÓLICO DE ALECRIM

Os principais fatores que afetam a estabilidade oxidativa da gordura láctea incluem a concentração de ácidos graxos saturados, a disponibilidade de oxigênio, a temperatura de armazenamento, luz, a presença de íons metálicos, especialmente cobre e ferro e a ocorrência natural de α -tocoferol. A gordura láctea tem se mostrado mais estável à oxidação do que alguns óleos vegetais, principalmente devido ao alto conteúdo de ácidos graxos saturados (KAYLEGIAN; LINDSAY, 1994).

A manteiga produzida apresentou $82,16\% \pm 0,28$ de lipídios, $2,55\% \pm 0,26$ de extrato seco desengordurado e $15,29\% \pm 0,03$ de umidade. De acordo com a Portaria nº. 146, de 07 de março de 1996, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1996), a manteiga deve apresentar no mínimo 82,0 % de matéria gorda, e no máximo 16,0% de umidade e 2,0% de extrato seco desengordurado.

A estabilidade oxidativa da manteiga foi acompanhada pela medida do índice de peróxido (produtos primários da oxidação) e das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (produtos secundários da oxidação) em intervalos de tempo regulares. O índice de peróxido (IP) é convencionalmente usado como medida dos produtos primários oriundos da deterioração oxidativa de óleos, gorduras e alimentos que possuam esses ingredientes em sua formulação. O teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) mede a formação de produtos secundários da oxidação, como aldeídos e compostos carbonílicos, que contribuem para o *off flavour* característico de produtos oxidados. A atividade de antioxidantes pode ser estimada pela determinação quantitativa dos produtos primários e secundários da oxidação (IQBAL; BHANGER, 2007). De acordo com os padrões da *International Dairy Federation* (IDF), o valor máximo permitido para o índice de peróxido na gordura láctea e derivados é de 0,2 mEq de oxigênio ativo/kg de gordura (KAYLEGIAN; LINDSAY, 1994). Já a Legislação Brasileira (BRASIL, 1996), estabelece que o limite máximo permitido para o índice de peróxido é 1,0 mEq de oxigênio ativo/kg de gordura.

As mudanças no índice de peróxido para as amostras submetidas às temperaturas de 110°C e 60°C respectivamente (Figuras 13 e 14, Tabelas 9 e 10), e os valores de TBARS para as amostras submetidas a 110°C e 60°C, respectivamente, (Figuras 15 e 16, Tabelas 11 e 12), apresentaram aumento em função do tempo de armazenamento e da temperatura.

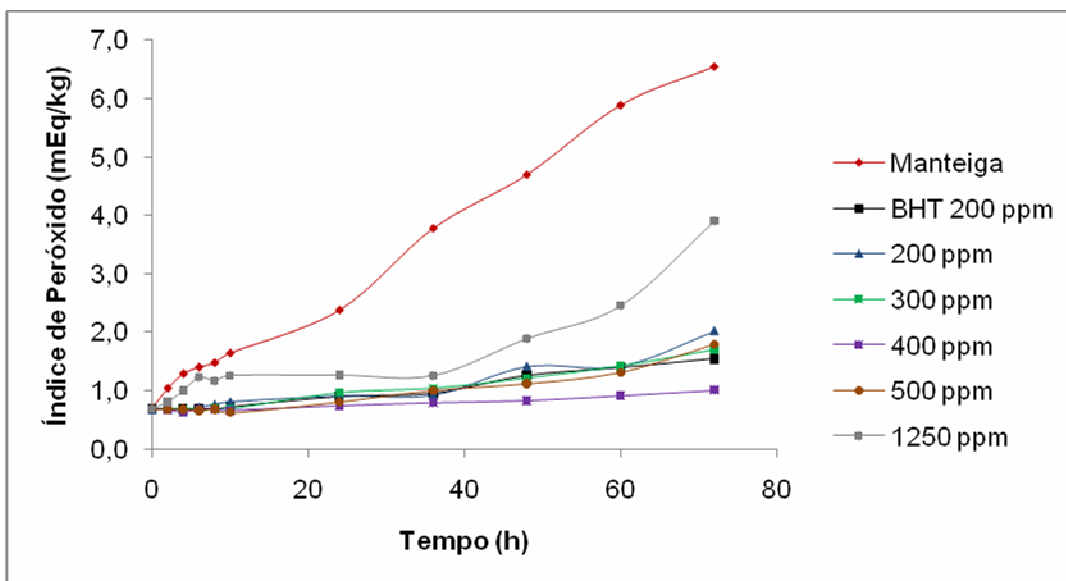


Figura 13: Variação do índice de peróxido da manteiga sem adição de antioxidantes, adicionada de BHT e de diferentes concentrações de compostos fenólicos do extrato alcoólico de alecrim em função do tempo de armazenamento, na temperatura de 110°C.

Tabela 9: Variação no índice de peróxido em função do tempo para as amostras de manteiga submetidas à temperatura de 110°C

Tempo (h)	Índice de peróxido (mEq/kg)						
	Controles	Compostos fenólicos (ppm)					
	Manteiga	BHT 200 ppm	200	300	400	500	1250
0	0,689 ^a	0,689 ^a	0,689 ^a	0,689 ^a	0,689 ^a	0,689 ^a	0,689 ^a
2	1,035 ^b	0,695 ^a	0,686 ^a	0,687 ^a	0,665 ^a	0,685 ^a	0,804 ^b
4	1,283 ^c	0,687 ^a	0,685 ^a	0,692 ^a	0,668 ^a	0,687 ^a	1,003 ^c
6	1,394 ^d	0,692 ^a	0,724 ^b	0,691 ^a	0,690 ^a	0,664 ^a	1,230 ^d
8	1,470 ^e	0,691 ^a	0,770 ^c	0,695 ^a	0,678 ^a	0,685 ^a	1,258 ^e
10	1,637 ^f	0,732 ^b	0,814 ^d	0,687 ^a	0,654 ^a	0,652 ^a	1,261 ^e
12	1,802 ^g	0,740 ^c	0,817 ^e	0,690 ^a	0,653 ^a	0,699 ^b	1,260 ^e
24	2,372 ^h	0,906 ^d	0,915 ^f	0,963 ^b	0,661 ^a	0,810 ^c	1,263 ^e
36	3,771 ⁱ	0,964 ^e	0,929 ^f	1,040 ^c	0,789 ^b	1,008 ^d	1,256 ^e
48	4,689 ^j	1,261 ^f	1,418 ^g	1,215 ^d	0,827 ^c	1,121 ^e	1,890 ^f
60	5,881 ^k	1,391 ^g	1,422 ^g	1,420 ^e	0,914 ^d	1,313 ^f	2,455 ^g
72	6,539 ^l	1,542 ^h	2,020 ^h	1,700 ^f	1,010 ^e	1,789 ^g	3,905 ^h

*Médias seguidas de mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si (Tukey, 5%).

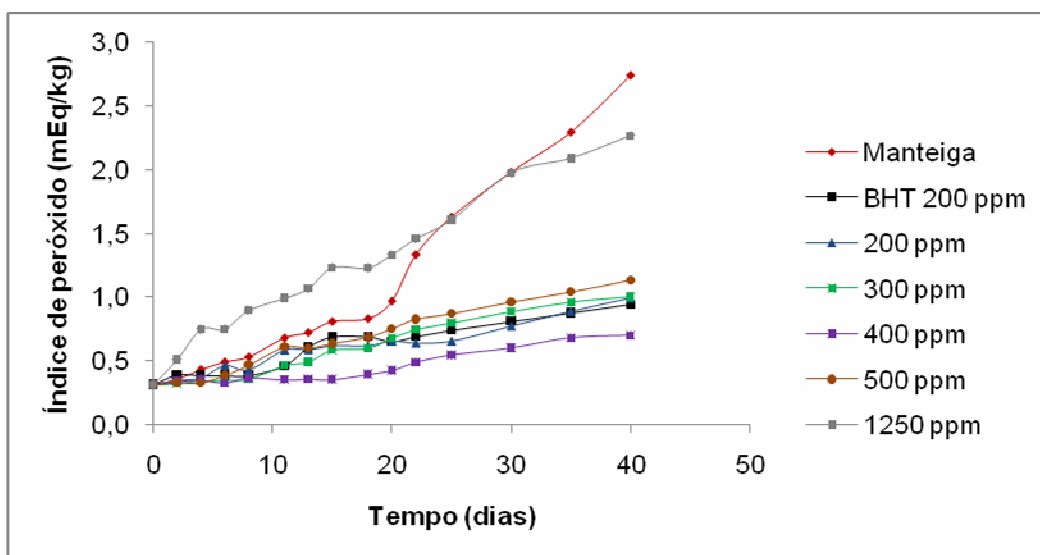


Figura 14: Variação do índice de peróxido da manteiga sem adição de antioxidantes, adicionada de BHT e de diferentes concentrações de compostos fenólicos do extrato alcoólico de alecrim em função do tempo de armazenamento, na temperatura de 60°C.

Tabela 10: Variação no índice de peróxido em função do tempo para as amostras de manteiga submetidas à temperatura de 60°C

Tempo (dias)	Índice de peróxido (mEq/kg)						
	Controles		Compostos fenólicos (ppm)				
	Manteiga	BHT 200 ppm	200	300	400	500	1250
0	0,324 ^a	0,324 ^a	0,324 ^a	0,324 ^a	0,324 ^a	0,324 ^a	0,324 ^a
2	0,360 ^{a,b}	0,393 ^b	0,351 ^b	0,325 ^a	0,331 ^a	0,330 ^a	0,511 ^b
4	0,435 ^{b,c}	0,387 ^b	0,369 ^b	0,346 ^{a,b}	0,340 ^a	0,330 ^a	0,749 ^c
6	0,495 ^{c,d}	0,386 ^b	0,468 ^c	0,351 ^{b,c}	0,339 ^a	0,389 ^b	0,751 ^c
8	0,535 ^d	0,388 ^b	0,433 ^d	0,360 ^c	0,359 ^b	0,469 ^c	0,899 ^d
10	0,684 ^e	0,463 ^c	0,589 ^e	0,464 ^d	0,353 ^b	0,612 ^d	0,993 ^e
12	0,727 ^e	0,609 ^d	0,591 ^e	0,492 ^d	0,359 ^b	0,603 ^d	1,067 ^f
14	0,813 ^f	0,690 ^e	0,620 ^e	0,586 ^e	0,355 ^b	0,638 ^e	1,233 ^g
16	0,835 ^f	0,691 ^e	0,622 ^e	0,600 ^e	0,395 ^c	0,689 ^f	1,230 ^g
20	0,973 ^g	0,694 ^e	0,659 ^f	0,679 ^f	0,427 ^d	0,754 ^g	1,335 ^h
22	1,336 ^h	0,692 ^e	0,642 ^f	0,745 ^g	0,490 ^e	0,829 ^h	1,459 ⁱ
25	1,632 ⁱ	0,741 ^f	0,658 ^f	0,798 ^h	0,547 ^f	0,872 ⁱ	1,608 ^j
30	1,984 ^j	0,810 ^g	0,775 ^g	0,886 ⁱ	0,601 ^g	0,964 ^j	1,975 ^k
35	2,297 ^k	0,878 ^h	0,891 ^h	0,961 ^j	0,681 ^h	1,042 ^k	2,090 ^l
40	2,742 ^l	0,946 ⁱ	0,995 ⁱ	1,003 ^k	0,700 ⁱ	1,136 ^l	2,268 ^m

*Médias seguidas de mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si (Tukey, 5%).

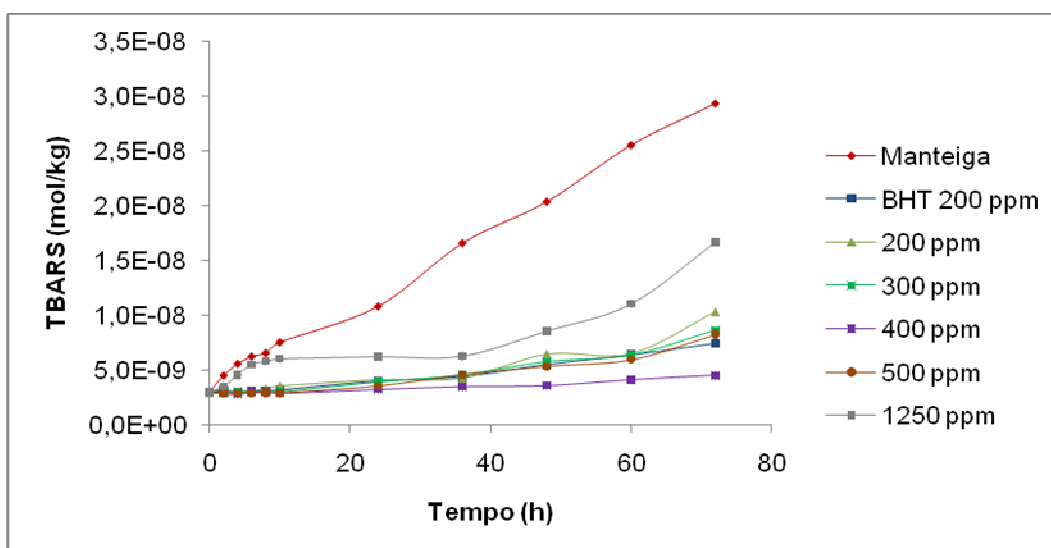
**Figura 15:** Produção de TBARS na manteiga sem adição de antioxidantes, adicionada de BHT e de diferentes concentrações de compostos fenólicos do extrato alcoólico de alecrim em função do tempo de armazenamento, na temperatura de 110°C.

Tabela 11: Produção de TBARS em função do tempo para as amostras de manteiga submetidas à temperatura de 110°C

Tempo (h)	TBARS (mol/kg)						
	Controles		Compostos fenólicos (ppm)				
	Manteiga	BHT 200 ppm	200	300	400	500	1250
0	2,996E-09 ^a	2,996E-09 ^a	2,996E-09 ^a	2,996E-09 ^a	2,996E-09 ^a	2,996E-09 ^a	2,996E-09 ^a
2	4,496E-09 ^b	3,122E-09 ^a	2,976E-09 ^a	2,976E-09 ^a	2,913E-09 ^a	2,955E-09 ^a	3,517E-09 ^b
4	5,579E-09 ^c	2,976E-09 ^a	2,955E-09 ^a	3,059E-09 ^a	2,851E-09 ^a	2,934E-09 ^a	4,559E-09 ^c
6	6,246E-09 ^d	3,101E-09 ^a	3,142E-09 ^b	3,038E-09 ^a	3,017E-09 ^a	2,913E-09 ^a	5,542E-09 ^d
8	6,558E-09 ^e	3,080E-09 ^a	3,351E-09 ^c	3,101E-09 ^a	3,059E-09 ^a	2,955E-09 ^a	5,808E-09 ^e
10	7,536E-09 ^f	3,184E-09 ^b	3,601E-09 ^d	3,017E-09 ^a	2,934E-09 ^a	2,913E-09 ^a	6,037E-09 ^e
12	7,540E-09 ^g	3,190E-09 ^c	3,631E-09 ^e	3,117E-09 ^a	2,964E-09 ^a	2,931E-09 ^b	6,077E-09 ^e
24	1,083E-08 ^h	3,996E-09 ^d	4,163E-09 ^f	3,892E-09 ^b	3,267E-09 ^a	3,559E-09 ^c	6,225E-09 ^e
36	1,662E-08 ⁱ	4,392E-09 ^e	4,309E-09 ^f	4,559E-09 ^c	3,517E-09 ^b	4,600E-09 ^d	6,287E-09 ^e
48	2,041E-08 ^j	5,517E-09 ^f	6,496E-09 ^g	5,767E-09 ^d	3,601E-09 ^c	5,371E-09 ^e	8,578E-09 ^f
60	2,559E-08 ^k	6,391E-09 ^g	6,558E-09 ^g	6,371E-09 ^e	4,121E-09 ^d	5,975E-09 ^f	1,106E-08 ^g
72	2,940E-08 ^l	7,453E-09 ^h	1,037E-08 ^h	8,661E-09 ^f	4,517E-09 ^e	8,287E-09 ^g	1,670E-08 ^h

*Médias seguidas de mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si (Tukey, 5%).

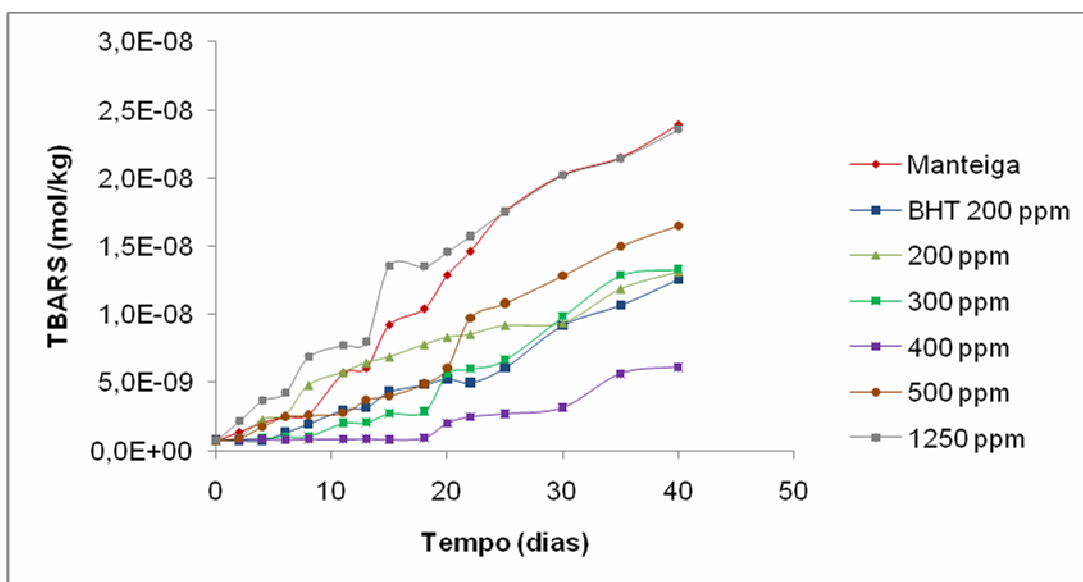
**Figura 16:** Produção de TBARS na manteiga sem adição de antioxidantes, adicionada de BHT e de diferentes concentrações de compostos fenólicos do extrato alcoólico de alecrim em função do tempo de armazenamento, na temperatura de 60°C.

Tabela 12: Produção de TBARS em função do tempo para as amostras de manteiga submetidas à temperatura de 60°C

Tempo (dias)	TBARS (mol/kg)						
	Controles		Compostos fenólicos (ppm)				
	Manteiga	BHT 200 ppm	200	300	400	500	1250
0	7,683E-10 ^a	7,683E-10 ^a	7,683E-10 ^a	7,683E-10 ^a	7,683E-10 ^a	7,683E-10 ^a	7,683E-10 ^a
2	1,393E-09 ^b	7,683E-10 ^b	9,557E-10 ^a	8,516E-10 ^b	8,099E-10 ^a	9,349E-10 ^b	2,164E-09 ^b
4	2,080E-09 ^b	7,683E-10 ^b	2,288E-09 ^b	9,349E-10 ^c	8,307E-10 ^a	1,789E-09 ^c	3,684E-09 ^c
6	2,518E-09 ^c	1,351E-09 ^b	2,622E-09 ^b	1,039E-09 ^d	7,891E-10 ^a	2,518E-09 ^d	4,267E-09 ^d
8	2,705E-09 ^d	1,976E-09 ^b	4,809E-09 ^c	1,081E-09 ^d	8,515E-10 ^a	2,601E-09 ^d	6,891E-09 ^e
10	5,704E-09 ^e	2,997E-09 ^b	5,767E-09 ^d	2,039E-09 ^e	8,307E-10 ^a	2,768E-09 ^d	7,745E-09 ^f
12	6,079E-09 ^e	3,184E-09 ^c	6,454E-09 ^e	2,080E-09 ^e	8,724E-10 ^a	3,746E-09 ^e	7,995E-09 ^f
14	9,245E-09 ^f	4,329E-09 ^d	6,891E-09 ^e	2,747E-09 ^f	8,099E-10 ^a	4,038E-09 ^f	1,358E-08 ^g
16	1,043E-08 ^g	4,829E-09 ^e	7,786E-09 ^f	2,872E-09 ^f	9,349E-10 ^a	4,913E-09 ^g	1,353E-08 ^g
20	1,289E-08 ^h	5,288E-09 ^f	8,328E-09 ^g	5,662E-09 ^g	2,018E-09 ^b	6,099E-09 ^h	1,458E-08 ^h
22	1,462E-08 ⁱ	4,996E-09 ^g	8,536E-09 ^g	6,016E-09 ^h	2,476E-09 ^c	9,765E-09 ⁱ	1,576E-08 ⁱ
25	1,755E-08 ^j	6,079E-09 ^h	9,182E-09 ^h	6,683E-09 ^j	2,705E-09 ^d	1,083E-08 ^j	1,755E-08 ^j
30	2,022E-08 ^k	9,182E-09 ⁱ	9,369E-09 ^h	9,849E-09 ^j	3,163E-09 ^e	1,285E-08 ^j	2,019E-08 ^k
35	2,149E-08 ^j	1,066E-08 ^j	1,187E-08 ^j	1,287E-08 ^k	5,642E-09 ^f	1,501E-08 ^k	2,145E-08 ^j
40	2,389E-8 ^m	1,254E-08 ^k	1,311E-08 ^j	1,333E-08 ^k	6,120E-09 ^g	1,653E-08 ^k	2,357E-08 ^m

*Médias seguidas de mesmas letras na mesma coluna não diferem entre si (Tukey, 5%).

Os compostos fenólicos reduziram a taxa de oxidação da manteiga nas duas temperaturas em relação à formação e decomposição de peróxidos.

Na temperatura de 110°C, observou-se um rápido aumento na produção de peróxidos na manteiga sem adição de antioxidantes e com 1250 ppm de compostos fenólicos. A presença do antioxidante sintético BHT garantiu estabilidade oxidativa de até 8 horas, e a partir deste tempo, observou-se aumento significativo na concentração de peróxidos. O maior efeito antioxidante foi atribuído à concentração de 400 ppm de compostos fenólicos, onde houve a menor formação de peróxidos. Nesta concentração, a manteiga permaneceu estável por 24 horas a 110°C, e em comparação ao BHT, aumentou o período de indução da oxidação em 16 horas. Compostos fenólicos em concentrações elevadas (1250 ppm) podem apresentar efeito pró-oxidante, devido principalmente à sua alta reatividade e participação nos processos de iniciação (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER,

2008). De acordo com Kaylegian e Lindsay (1994), os compostos fenólicos da classe dos tocoferóis apresentam propriedades antioxidantes em concentrações inferiores a 500 ppm, mas em concentrações elevadas (1000 ppm) podem apresentar características pró-oxidantes.

As amostras armazenadas a 60°C tiveram comportamento semelhante às aquelas armazenadas a 110°C. A manteiga sem adição de antioxidantes e adicionada de 1250 ppm de compostos fenólicos apresentou rápido aumento na produção de peróxidos. A adição de 400 ppm de compostos fenólicos aumentou a estabilidade oxidativa da manteiga em 4 dias (96 horas), quando comparada ao antioxidante sintético BHT na concentração de 200 ppm, indicando ser a concentração ótima de compostos fenólicos nas condições dos ensaios.

A produção de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) para as amostras armazenadas a 110 e 60°C seguiu a mesma tendência observada na formação de peróxidos. Observou-se a maior formação de produtos secundários da oxidação na manteiga sem adição de antioxidantes e adicionada de 1250 ppm de compostos fenólicos, a 110 e 60°C, resultado condizente com a maior produção de peróxidos. A adição de 400 ppm de compostos fenólicos levou à menor formação de compostos secundários da oxidação, já que nesta concentração a geração de peróxidos foi mínima.

Uma das consequências mais importantes decorrentes da oxidação da gordura láctea é a formação de *off flavours*. Este processo resulta em mudanças químicas complexas que aumentam a formação de compostos de degradação voláteis e não voláteis. Os aldeídos formados durante a oxidação são os principais responsáveis pelo *off flavour* característico associado à gordura láctea oxidada. Outros produtos resultantes da oxidação incluem cetonas, alcoóis, lactonas e hidrocarbonetos saturados e insaturados. Os termos comumente usados para descrever o *off flavour* da gordura láctea oxidada são *painty* (que cheira à pintura), *grassy* (odor de grama recém cortada), *tallow* (odor de sebo), *oily* (oleoso, cheiro de gordura), *cardboard* (papelão), *fishy* (de peixe), *metallic* (metálico), *mushroomy* (de cogumelo) e *cucumber- and melon-like* (como pepino e melão) (KAYLEGIAN; LINDSAY, 1994).

Os compostos fenólicos utilizados como antioxidantes eliminam, ou pelo menos interrompem, a deterioração de óleos e gorduras nos primeiros estágios, e assim retardam a instalação da reação, e descobriu-se que são eficientes somente

a partir de um período específico. Pode-se partir da hipótese de que os antioxidantes fenólicos inibem a peroxidação “à custa de sua própria bioatividade”, e assim se decompõem e se deterioram com o decorrer do tempo (ANWAR; BHANGER; KAZY, 2000). Diante desta perspectiva, somente aqueles antioxidantes que apresentam boa eficiência após períodos prolongados e condições drásticas, devem ser considerados (IQBAL; BHANGER, 2007; SHAHIDI; NACZK, 1995).

A alta capacidade antioxidante dos compostos fenólicos pode ser devida a inúmeros grupos ativos que podem atuar como antioxidantes e é possível que o aumento no efeito antioxidante seja atribuído ao sinergismo entre vários desses grupos ativos (KAYLEGIAN; LINDSAY, 1994). Os fenólicos são mais ativos quando presentes em misturas, como aqueles com atividade mais alta que facilmente sofrem oxidação, enquanto que os fenóis menos reativos regeneram os mais ativos. O ácido rosmarínico é mais polar que o ácido carnósico e o carnosol, principais compostos fenólicos encontrados no extrato alcoólico de alecrim, por isso, ele foi localizado principalmente na fase aquosa contínua. Os ácido carnósico e carnosol, com menor polaridade, foram localizados na interface água/óleo onde inativavam os radicais livres, evitando a decomposição do hidroperóxido (LEGARRETA et al., 2009).

As correlações encontradas entre os índices de peróxido e os valores de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Figura 17) reforçam a teoria de que a formação de produtos secundários da oxidação depende da taxa de formação de peróxidos, pois quanto maior a formação dos peróxidos, maior a concentração dos seus produtos de degradação, maiores responsáveis pelas alterações sensoriais e nutritivas de óleos e gorduras.

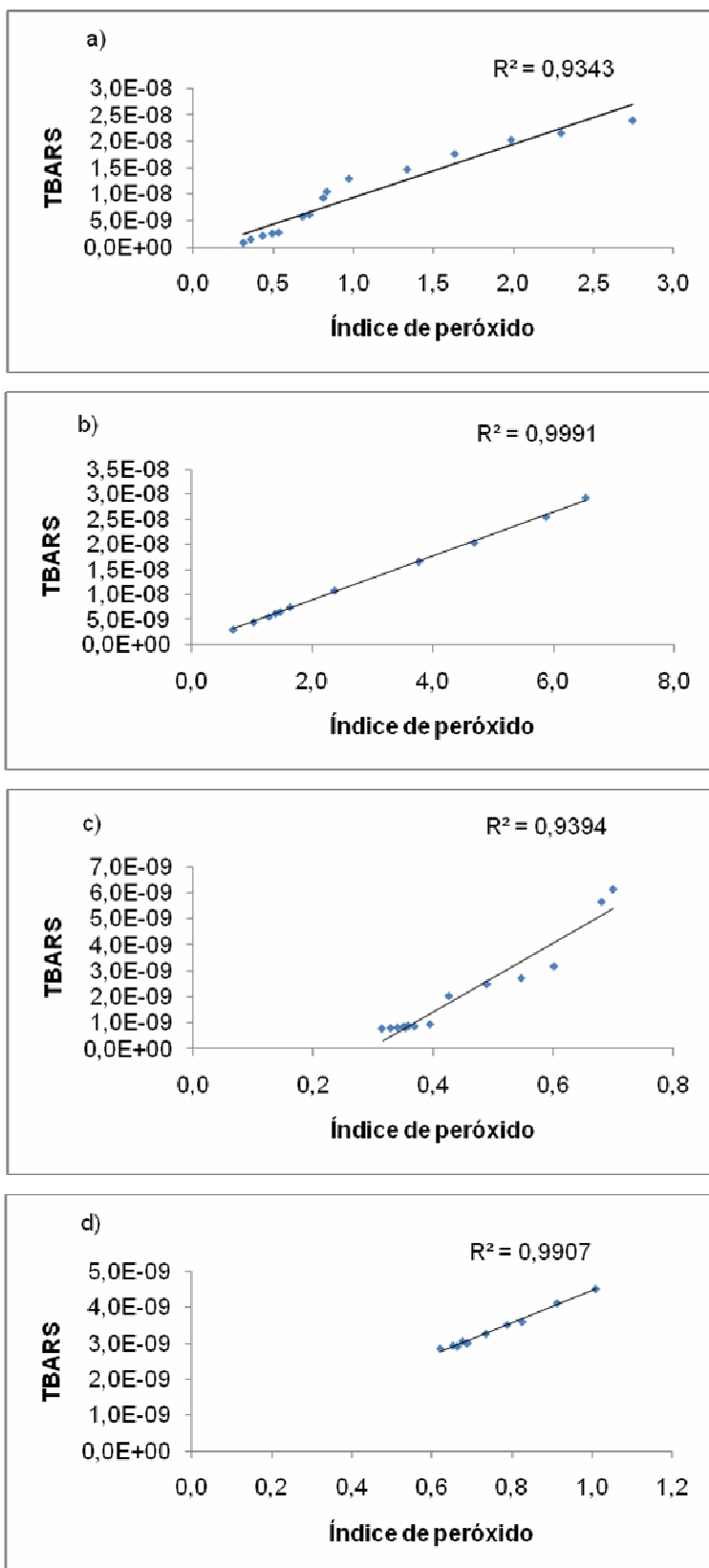


Figura 17: Correlações entre o índice de peróxido e os valores de decomposição (TBARS) de peróxidos: (a) manteiga 60°C; (b) manteiga 110°C; (c) manteiga adicionada de 400 ppm de compostos fenólicos de extrato alcoólico de alecrim à 60°C; (d) manteiga adicionada de 400 ppm de compostos fenólicos de extrato alcoólico de alecrim à 110°C.

Os íons metálicos Cu^{2+} e Fe^{3+} , presentes naturalmente no leite e em seus derivados, atuam como agentes pró-oxidantes da oxidação lipídica. Tanto a forma reduzida como oxidada desses íons podem decompor hidroperóxidos em radicais livres e em outros produtos de degradação, acelerando a taxa tanto de formação quanto de degradação de peróxidos. O potencial padrão de redução do Fe^{3+} comparado ao do Cu^{2+} sugere que o Fe^{3+} é um agente oxidante muito mais forte que o Cu^{2+} . Porém, o íon Cu^{2+} no leite é mais pró-oxidante que o ferro, sendo considerado o principal íon catalisador da oxidação da gordura do leite (O'CONNOR; O'BRIEN, 2006).

6 CONCLUSÃO

As condições ótimas de extração dos compostos fenólicos foram 40% de etanol durante 4 horas para alecrim, orégano, sálvia e manjerona, e 40% de etanol durante 6 horas para tomilho.

O extrato de alecrim apresentou maior atividade antioxidante na inibição do radical DPPH.

Não houve diferença significativa na atividade antioxidante entre os extratos de alecrim, manjerona e tomilho, avaliada pela peroxidação do ácido linoléico.

O extrato de orégano se destacou pelo maior poder antioxidante no método de redução do ferro (valor de FRAP).

Na avaliação da toxicidade do extrato alcoólico de alecrim *in vitro* observou-se uma atividade citoprotetora concentração-dependente entre 50 e 250 µg/mL. O uso do alecrim como antioxidante natural é seguro nas concentrações testadas.

A manteiga obteve maior estabilidade à oxidação, com a adição de extrato alcoólico de alecrim na concentração de 400 ppm nas temperaturas de 110°C e 60°C.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, A. E.; ROOZEN, J. P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. **Food Chemistry**, v. 64, p. 323-329, 1999.
- ABDALLA, A. E.; ROOZEN, J. P. The effects of stabilized extracts of sage and oregano on the oxidation of salad dressings. **Europe Food Research Technology**, v. 212, p. 551-560, 2001.
- AKYON, Y. Effect of antioxidants on the immune response of *Helicobacter pylori*. **Clinical Microbiology & Infection**, v. 8, n. 7, p. 438-441, jul. 2002.
- AMARAL, F. **Café (*Coffea arabica*, L) submetido a diferentes condições de torrefação: caracterização química e avaliação da atividade antioxidante e sensorial**. 2007. 130 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- ANDARWULAN, N.; SHETTY, K. Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and *Agrobacterium*-transformed roots of anise [*Pimpinella anisum* L.]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1776-1780, 1999.
- ANDRADE Jr., D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 31, n. 1, p. 60-68, jan/fev, 2005.
- ANWAR, F.; BHANGER, M. I.; KAZI, T. G. Activity of phenolic antioxidants on the storage ability of soybean cooking oil. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 8, p. 1333-1335, 2000.
- AOAC. **Official methods of analysis of AOAC international**. 17 ed. USA: AOAC International, 1995.
- AOCS. Official Methodos and recommended practices of the American oil chemist`s society Method Cd 8-53. In: GUNSTONE, F. **Peroxide value acetic acid-chloroform method**. 4 ed. Champaign, IL: AOCS Press, 1996.
- AQIL, F.; AHMAD, I.; MEHMOOD, Z. Antioxidant and free radical scavenging properties of twelve traditionally used Indian medicinal plants. **Turkish Journal of Biology**, v. 30, p. 177-183, 2006.
- ARAÚJO, M. E. M.; MATA, A. T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A. R.; SERRALHEIRO, M. L. M.; NOGUEIRA, J. M. F. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, v. 103, p. 778-786, 2007.
- ARCILA-LOZANO, C. C.; LOARCA-PIÑA, G.; LECONA-URIBE, S.; MEJÍA, E. G. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v. 54, n. 1, p. 100-111, 2004.

AZZI, A.; STOCKER, A. Vitamin E: non-antioxidant roles. **Progress in Lipid Research**, v. 39, p. 231-255, 2000.

BADI, H. N.; YAZDANI, D.; ALI, S. M.; NAZARI, F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products**, v. 19, p. 231-236, 2004.

BAST, A.; HAENEN, G. R. M. M.; DOELMAN, C. J. A. Oxidants and antioxidants: state of the art. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3, p. 2-13, 1991.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

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

BOLAND, J. L.; ten-HAVE, P. Kinetics in the chemistry of rubber and related materials; the inhibitory effect of hydroquinone on the thermal oxidation of ethyl linoleate. **Transactions of the Faraday Society**, v. 43, p. 201-204, 1947.

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

BOTSOGLOU, N. A.; CHRISTAKI, E.; FLETOURIS, D. J.; FLOROU-PANERI, P.; SPAIS, A. B. The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 62, p. 259-265, 2002.

BRASIL. Portaria nº. 146, de 07 de março de 1996. Aprova os Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade dos Produtos Lácteos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 11 de março de 1996, p. 3977, Seção 1.

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

CAVERO, S.; JAIME, L.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G.; IBAÑEZ, E. In vitro antioxidant analysis of supercritical fluid extracts from rosemary (*Rosemarinus officinalis* L.). **Europe Food Research Technology**, v. 221, p. 478-486, 2005.

CERVATO, C.; CARABELLI, M.; GERVASIO, S.; CITTERA, A.; CAZZOLA, R.; CESTARO, B. Antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extracts. **Journal of Food Biochemistry**, v. 24, p. 453-465, 2000.

CHIPAULT, J. R.; MIZUN, G. K.; HAWKINS, J. M.; LUNDBERG, W. O. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, v. 17, p. 46-55, 1952.

CHOE, E. Effects and mechanisms of minor compounds in oil on lipid oxidation. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 3 ed. USA: CRC Press, 2008. p. 449-474.

CODEx ALIMENTARIUS. **Codex general standard for food additives – Codex Stan 191-1995**. Disponível em: http://www.codexalimentarius.net/web/index_en.jsp. Acesso em 06 jul. 2008.

CUVELIER, M. E.; RICHARD, H.; Berset, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 73, p. 645-652, 1996.

DESHPANDE, S. S.; DESHPANDE, U. S.; SALUNKHE, D. K. Nutritional and health aspects of food antioxidants. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKE, D. K. **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. USA: Marcel Dekker Inc, 1996. p. 361-469.

DURLING, N. E.; CATCHPOLE, O. J.; GREY, J. B.; WEBBY, R. F.; MITCHELL, K. A.; FOO, L. Y.; PERRY, N. B. Extraction of phenolics and essential oil from dried sage (*Salvia officinalis*) using ethanol-water mixtures. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1417-1424, 2007.

ERIM, F. B.; ÖZTEKIN, N.; BASKAN, S. Determination of carnosic acid and rosmarinic acid in sage by capillary electrophoresis. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1748-1752, 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação de Medicina do Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

GIADA, M. L. R.; MANCINI-FILHO, J. Atividade antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos em alimentos. **Nutrire**, v. 28, p. 91-107, 2004.

GORDON, M. H. Measuring antioxidant activity. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical application**. USA: CRC Press, 2001a. p. 71-86.

GORDON, M. H. The development of oxidative rancidity in foods. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical application**. USA: CRC Press, 2001b. p. 7-21.

GOULART, M. O. F.; VASCONCELOS, S. M. L.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, M. S.; MANFREDINI, V.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, n. 30, v. 5, p. 1323-1338, 2007.

GÜLÇİN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicology**, v. 217, p. 213-220, 2006.

HALL III, C. Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources. In: POKORNY, J; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical application**. USA: CRC Press, 2001. p.159-209.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants: redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant Physiology**, v. 141, p. 312-322, jun., 2006.

HALLIWELL, B.; MURCIA, M. A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O. I. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 35, p. 7-20, 1995.

HO, C.; WANG, M.; KIKUZAKI, H.; LIN, C.; KAHYAOGU, A.; HUANG, M.; NAKATANI, N. Acetophenone glycosides from thyme (*Thymus vulgaris* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 1911-1914, 1999a.

HO, C.; WANG, M.; LI, J.; RANGARAJAN, M.; SHAO, Y.; LAVOIE, E. J.; HUANG, T. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 4869-4873, 1998.

HO, C.; WANG, M.; LI, J.; RANGARAJAN, M.; SHAO, Y.; LAVOIE, E. J.; ZHU, N. Antioxidative phenolic glycosides from sage (*Salvia officinalis*). **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 454-456, 1999b.

HÖEHR, N. F.; ROVER Jr, L. O.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

HUY, Y. H. Antioxidants: technical and regulatory considerations. In: _____. **Edible oil and fat products: products and application technology**. 5 ed. USA: John Wiley & Sons, Inc, 1996. p. 523-545.

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

JADHAV, S. J.; NIMBALKAR, S. S.; KULKARNI, A. D.; MADHAVI, D. L. Lipid oxidation in biological and food systems. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKE, D. K. **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. USA: Marcel Dekker Inc, 1996. p. 5-63.

JOHNSON, I. T. Antioxidants and antitumoral properties. In: POKORNY, J; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical application**. USA: CRC Press, 2001. p.100-123.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 3954-3962, 1999.

KAYLEGIAN, K. E.; LINDSAY, R. C. Raw materials for milkfat fractionation. In: _____. **Handbook of milkfat fractionation technology and application**. Champaign, Illinois: AOCS Press, 1994. p. 19-38.

KIKUSAKI, H.; NAKATANI, N. Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Origanum vulgare* L.). **Agricultural Biological Chemistry**, v. 53, p. 519-524, 1988.

KIM, H. J.; MIN, D. B. Chemistry of lipid oxidation. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 3 ed. USA: CRC Press, 2008. p. 299-320.

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

KULISIC, T.; RADONIC, A.; KATALINIC, V.; MILOS, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633-640, 2004.

LEE, C. Y.; YOO, K. M.; LEE, C. H.; LEE, H.; MOON, B. Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. **Food Chemistry**, v. 106, p. 929-936, 2008.

LEGARRETA, I. G.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E.; PONCE-ALQUICIRA, E.; JARAMILLO-FLORES, M. E. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. **Meat Science**, v. 81, n. 2, p. 410-417, 2009.

MacGIBBON, A. K. H.; TAYLOR, M. W. Composition and structure of bovine milk lipids. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Advanced dairy chemistry – lipids**. E ed. USA: Springer, 2006. p. 1-42.

MADHAVI, D. L.; SALUNKE, D. K. Toxicological aspects of food antioxidants. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKE, D. K. **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. USA: Marcel Dekker Inc, 1996. p. 267-359.

MADHAVI, D. L.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Technological aspects of food antioxidants. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKE, D. K. **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. USA: Marcel Dekker Inc, 1996. p. 159-265.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MANCINI-FILHO, J. Alimentos funcionais nas doenças cardiovasculares. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. **Alimentos funcionais**. Viçosa: UFV, 2006. 202 p.

McCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Lipids. In: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Food chemistry**. 4 ed. USA: CRC Press, 2007. p. 155-216.

MELO, E. A.; MANCINI FILHO, J.; GUERRA, N. B.; MACIEL, G. R. Atividade antioxidante de extratos de coentro (*Coriandrum sativum* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 195-199, dez. 2003.

MIRJALILI, M. H.; SALEHI, P.; SONBOLI, A.; VALA, M. M. Essential oil variation of *Salvia officinalis* aerial parts during its phenological cycle. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 42, n.1, p. 19-23, 2006.

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NAKATANI, N.; MIURA, K.; KIKUZAKI, H. Apianane terpenoids from *Salvia officinalis*. **Phytochemistry**, v. 58, p. 1171-1175, 2001.

NAKATANI, N.; MIURA, K.; KIKUZAKI, H.. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 50, p. 1845-1851, 2002.

NOGALA-KALUCKA, M.; KORCZAK, J.; DRATWIA, M.; LAMPSRT-SZCZAPA, E.; SIGER, A.; BUCHOWSKI, M. Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. **Food Chemistry**, v. 93, p. 227-235, 2005.

O'BRIAN, N. M.; AHERNE, S. A.; KERRY, J. P. Effects of plant extracts on antioxidant status and oxidant-induced stress in Caco-2 cells. **British Journal of Nutrition**, v. 97, n. 2, p. 321-328, 2007.

O'CONNOR, T. P.; O'BRIEN, N. M. Lipid oxidation. In: FOX, P. F.; McSWEENEY, P. L. H. **Advanced dairy chemistry – lipids**. 3 ed. USA: Springer, 2006. p. 557-600.

OHKATSU, Y.; KAJIYAMA, T. Effect of *para*-substituents of phenolic antioxidants. **Polymer Degradation and Stability**, v. 71, p. 455-452, 2001.

OLSZEWER, E. **Radicais livres em medicina**. São Paulo: Fundo Editorial BYK, 1995. 204p.

OZKANLI, O.; KAYA, A. Storage stability of butter oils produced from sheep's non-pasteurized and pasteurized milk. **Food Chemistry**, v. 100, n. 3, p. 1026-1031, 2007.

PAPADOPOULOU, D.; ROUSSIS, I. G. Inhibition of butter oxidation by N-acetyl-cysteine and glutathione. **European Food Research Technology**, v. 227, p. 905-910, 2008.

POKORNY, J. Introduction. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical application**. USA: CRC Press, 2001. p. 1-3.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

RAJALAKSHMI, D.; NARASIMHAN, S. Food antioxidants: sources and methods of evaluation. In: MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKE, D. K. **Food antioxidants – technological, toxicological and health perspectives**. USA: Marcel Dekker Inc, 1996. p. 65-157.

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

REISCHE, D. W.; LILLARD, D. A.; EITENMILLER, R. R. Antioxidants. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 3 ed. USA: CRC Press, 2008. p. 409-433.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, abr., 1997.

SAHIN, F.; GÜLLÜCE, M.; DAFERERA, D.; SÖKMEN, A.; SÖKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; ÖZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, p. 549-557, 2004.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; CIMINO, F.; ZIMBALATTI, V.; VENUTI, V.; SULFARO, V.; DE PASQUALE, A. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, v. 89, p. 549-554, 2005.

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

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, 130: 2073-2085, 2000.

SCHWARZ, K. Phenolic diterpenes from rosemary and sage. In: SHI, J.; MAZZA, G.; Le MAGUER, M. **Functional foods – biochemical and processing aspects**. USA: CRC Press, 2002. p. 189-211.

SHAHIDI, F. Antioxidants in food and food antioxidants. **Nahrung**, v. 44, n. 3, p. 158-163, 2000.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Antioxidant properties of food phenolics. In: _____. **Food phenolics: sources, chemistry, effects, applications**. USA: Technomic Publishing Company, Inc, 1995. p. 235-279.

SHAHIDI, F.; LIYANA-PATHIRANA, C. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 93, p. 47-56, 2005.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Antioxidant properties of food phenolics. In: _____. **Phenolics in food and nutraceuticals**. USA: CRC Press, 2004a. p. 403-441.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. Nutritional and pharmacological effects of food phenolics. In: _____. **Phenolics in food and nutraceuticals**. USA: CRC Press, 2004b. p. 331-402.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. N. Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. In: AKOH, C. C.; MIN, D. B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 3 ed. USA: CRC Press, 2008. p. 387-407.

SHAMI, N. J., MOREIRA, E. A. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, abr/jun, 2004.

SHETTY, K.; CHUN, S.; VATTEM, D. A.; LIN, Y. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 809-816, 2005.

SHETTY, K.; CORREIA, R. T. P.; McCUE, P.; MAGALHÃES, M. M. A.; MACÊDO, G. R. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 2167-2172, 2004.

SHETTY, K.; CURTIR, O. F.; LEVIN, R. E.; WITKOWSKY, R.; ANG, W. Prevention of vitrification associated with in vitro shoot culture of oregano (*Origanum vulgare*) by *Pseudomonas* ssp. **Journal of Plant Physiology**, v. 147, n. 3-4, p. 447-451, 1995.

SHETTY, K.; McCUE P. Phenolic antioxidant biosynthesis in plants for functional food application: integration of systems biology and biotechnological approaches. **Food Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 67-97, 2003.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.152-179, 1999.

SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M. N. Avaliação da vida-de-prateleira de bebidas lácteas preparadas com "fat replacers" (Litesse e Dairy-lo). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 24-31, 2002.

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

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

TOPÇU, G. Bioactive triterpenoids from salvia species. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 482-487, 2006.

TSAO, R.; YANG, R.; XIE, S.; SOCKOVIE, E.; KHANIZADEH, S. Which polyphenolic compounds contribute to the total antioxidant activities of apple? **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4989-4995, 2005.

TSIMIDOU, M.; EXARCHOU, V.; NENADIS, N.; GEROTHANASSIS, I. P.; TROGANIS, A.; BOSKOU, D. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from greek oregano, greek sage, and summer savory. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5294-5299, 2002.

VÁGI, E.; RAPAVI, E.; HADOLIN, M.; PERÉDI, K. V.; BALÁZS, A.; BLÁZOVICS, A.; SIMÁNDI, B. Phenolic and triterpenoid antioxidants from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 17-21, 2005.

VANNUCCHI H.; MOREIRA, E. A. M.; CUNHA, D. F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M. V. M.; BERNARDES, M. M.; JORDÃO Jr, A. A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 31, p. 31-44, jan/mar, 1998.

WADE, V.; AL-TAHIRI, R.; CRAWFORD, R. The auto-oxidative stability of anhydrous milk fat with and without antioxidants. **Milchwissenschaft – Milk Science International**, v. 41, p. 479-482, 1986.

WANG, H.; PROVAN, G. J.; HELLIWELL, K. Determination of rosmarinic acid and caffeic acid in aromatic herbs by HPLC. **Food Chemistry**, v. 87, p. 307-311, 2004.

WANG, S. Y., ZHENG, W. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.

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

YANISHLIEVA-MASLAROVA, N. V. Inhibiting oxidation. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical application**. USA: CRC Press, 2001a. p. 22-69.

YANISHLIEVA-MASLAROVA, N. V. Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. In: POKORNY, J; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food: practical application**. USA: CRC Press, 2001b. p. 210-263.

YEN, G.; DUH, P.; TSAI, H. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 79, p. 307-313, 2002.

ZAMBIAZI, C. Oxidation reactions of vegetable oils and fats. **Boletim SBCTA**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 1999.

ZEGARSKA, Z.; AMAROWICZ, R.; KARMAC, M.; RAFALOWSKI, R. Antioxidative effect of rosemary ethanolic extract on butter. **Milchwissenschaft – Milk Science International**, v. 51, n. 4, p. 195-198, 1996.