

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

ANGELA MARIA TRIBUZY DE MAGALHÃES CORDEIRO

DESENVOLVIMENTO DE BIOADITIVOS ANTIOXIDANTES
PARA OTIMIZAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE
ÓLEOS COMESTÍVEIS

JOÃO PESSOA - PB

2013

Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro

Desenvolvimento de bioaditivos antioxidantes para otimização
da estabilidade oxidativa de óleos comestíveis

João Pessoa - PB

2013

Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro

Desenvolvimento de bioaditivos antioxidantes para otimização
da estabilidade oxidativa de óleos comestíveis

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof.^o Dr. Antonio Gouveia de Souza

Coorientadora: Prof.^a Dra. Antônia Lúcia de Souza

João Pessoa - PB

2013

ANGELA MARIA TRIBUZY DE MAGALHÃES CORDEIRO

DESENVOLVIMENTO DE BIOADITIVOS ANTIOXIDANTES PARA OTIMIZAÇÃO DA
ESTABILIDADE OXIDATIVA DE ÓLEOS COMESTÍVEIS

Tese aprovada em 24 de maio de 2013.

BANCA EXAMINADORA

Prof.º Dr. Antonio Gouveia de Souza - PPGCTA/CT-DQ/CCEN/UFPB
Coordenador da Banca Examinadora

Prof.º Dr. Raul Rosenhain - ENGENHARIA QUIMICA - CT/UFPB
Membro externo

Prof.ª Dra. Neide Queiroz - CCEN/UFPB
Membro externo

Prof.ª Dra. Marta Suely Madruga – PPGCTA/CT/UFPB
Membro interno

Prof.ª Dra. Rita de Cássia R. do Egypto Queiroga - PPGCTA/CT/UFPB
Membro interno

Dedico:

Aos meus filhos, Franklin Marcelo e Pedro Henrique pelo sentido que dão em minha vida.

*A minha mãe, Maria Hercília pelo amor incondicional, por todo apoio, incentivo,
ensinamentos, compreensão, confiança, orações e pelos esforços
realizados para minha formação pessoal e profissional.*

A minha querida e amada vó Hilda (in memorium), minha Luz!

Agradecimentos

A Deus agradeço por tudo! Principalmente por ter me presenteado duas virtudes: a fé e a coragem, com os quais tenho conseguido superar as adversidades dessa vida.

A toda minha família, especialmente a minha mãe, aos meus filhos, aos meus irmãos Hilda e Marcellus, as minhas tias Imarita, Angelita, Nélia e Elizabeth pelo carinho, dedicação, incentivo e presença constante na minha caminhada. E também pela atenção da minha tia Imarita em me favorecer com os vegetais da região amazônica.

Ao Prof.^o Gouveia, orientador e coordenador do LACOM, pela agradável convivência, dedicação e apoio imensurável, pelo profissionalismo e por tornar possível a realização deste trabalho. Um grande amigo!

A minha co-orientadora, Prof.^a Antônio Lúcia pela orientação, confiança e bons momentos de descontração com sua irreverência.

A minha amiga Teta pela ternura, amizade, prazeroso convívio, solidariedade e apoio nos momentos difíceis durante os ensaios de bancada. Amigo verdadeiro é anjo, é paz, é tudo!

As amigas Neide e M^a Lúcia pelas sugestões, críticas e discussões, parcerias de pesquisa e, sobretudo pelos bons momentos de convivência.

Ao Prof.^o Soledade pela prontidão e valiosa contribuição nas traduções, revisões e sugestões.

Aos casais Raul & Nataly, Maristela & Anderson pela alegria de tê-los como amigos e parceiros de pesquisa.

As amigas Isnandia, Alcilene e Karol pela atenção, carinho e pelos bons momentos de convivência.

Aos professores, técnicos e secretários que fazem parte do PPGCTA e do LACOM, em especial as Prof^{as} Marta Suely, Rita de Cássia, Liliana, Iêda e Marciane, aos técnicos Evaneide e Gilvandro, e as secretárias Lindalva e Dalva, pelas contribuições diversas.

Aos colegas de disciplinas e laboratório, especialmente, Jaqueline, Claudinha, Ertha, Ruth, Kassandra, Alline, Poliana, Yuri, Valéria, Isabelle, Kátia, Andréa Suame, Sarah, Marco Aurélio, Marileide, Rebeca, Ielena, Yago, Pedro, Tiago, Raquel, Ana Flávia, Adervando, Alex, Arnáira, Laís, Guilherme, André, Márcia, Daniella, Rosa, Gabriel, Ricardo, Marcell, João, Jerffeson, Chico *et al.*, pelo agradável convívio.

Aos estagiários voluntários do Lacom, Marly, Malu, Philipe e Marco pela ajuda na etapa inicial desta pesquisa.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas pelo apoio e liberação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM pela bolsa concedida.

MUITO OBRIGADA!

***"Só existe uma coisa bela, suave, atraente, útil, luminosa:
o que Deus quer de ti no momento presente".***

Chiara Lubich

RESUMO

Óleos comestíveis são fontes importantes de energia, vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais. Entretanto, a natureza insaturada dos seus ácidos graxos os torna altamente suscetíveis a processos oxidativos, tornando necessário o uso de aditivos antioxidantes. As indústrias de oleaginosas utilizam os de natureza sintética, todavia existem várias restrições quanto ao uso destas substâncias, devido aos efeitos nocivos atribuídos à saúde humana. Por estas razões, este trabalho investigou o potencial antioxidante de 24 extratos vegetais: açafrão (*Crocus sativus* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), boldo-do-Chile (*Peumus boldus* Molina), chá branco (*Camellia sinensis* (L.) Kutntze), chá mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire), chá preto (*Camellia sinensis* (L.) Kutntze), chá verde (*Camellia sinensis* (L.) Kutntze), camomila (*Matricaria recutita* L.), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) DC), erva-cidreira (*Cymbopogon citratus*), coentro (*Coriandrum sativum* L.), cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*), erva-doce (*Foeniculum vulgare* (Mill.) Gaertn), manjerona (*Origanum majorana* L.), manjerição (*Ocimum basilicum*), orégano (*Origanum vulgare* L. ssp *Virens*), sene (*Cassia angustifolia*), barbatimão (*Stryphnodendron barbatimam* Mart.), chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus* Mitch.), jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tul.), guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), pau d'arco (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich.) e unha de gato (*Uncaria tomentosa*), através da determinação do conteúdo de fenólicos totais (CFT) (método Folin-Ciocateau) e da capacidade antioxidante aplicando os ensaios DPPH e FRAP. A análise Termogravimétrica (TG), pelos métodos dinâmicos e isotérmicos (110 °C) foi utilizada para avaliar a estabilidade térmica dos extratos vegetais e antioxidantes comerciais. Os óleos de milho, soja e girassol, constituídos de ácidos graxos insaturados, são muito utilizados na culinária brasileira. Assim, a ação antioxidante dos extratos (alecrim, camomila, coentro, erva-doce e sene) também foi investigada através do controle da estabilidade oxidativa de óleos vegetais comestíveis quando adicionados a estes, por meio dos métodos acelerados Rancimat, PetroOXY, PDSC e teste de estufa. O extrato de cravo exibiu o maior CFT e a melhor capacidade antioxidante pelo ensaio FRAP. Os extratos de jucá e barbatimão, oriundos da Região Amazônica, apresentaram altos CFT ($133,63 \pm 1,94$ e $147,37 \pm 1,99$ mg EAG/g de extrato) confirmando a excelente capacidade antioxidante pelos métodos empregados. O perfil termogravimétrico mostrou que os extratos unha-de-gato, açafrão, alecrim, chá branco e canela destacaram-se por apresentar boa resistência térmica, indicando que podem ser utilizados como aditivos antioxidantes em formulações que necessitem de aquecimento. O extrato de alecrim aditivado nos óleos vegetais exibiu um efeito protetor superior aos demais extratos antioxidantes testados, inclusive aos sintéticos BHT e TBHQ quando avaliados pelos métodos PDSC e PetroOXY e efeito semelhante ao do BHT pela técnica Rancimat. O extrato de cravo, embora seja um excelente antioxidante, não apresentou estabilidade térmica, com perda de massa de 81,4% na primeira etapa (28,1 a 266,7 °C), relativa à degradação do constituinte químico principal, o eugenol.

Palavras-chave: Antioxidantes naturais, Óleos comestíveis, Capacidade antioxidante, Estabilidade termo-oxidativa, Métodos acelerados, Termogravimetria.

ABSTRACT

Edible oils are important sources of energy, fat soluble vitamins and essential fatty acids. However, their unsaturated fatty acids nature makes them highly susceptible to oxidative processes, making necessary the use of antioxidant additives. Synthetic antioxidants are widely employed by the industry, although there are several restrictions due to their adverse effects on human health. For this reason, this study investigated the antioxidant potential of 24 plant extracts: saffron (*Crocus sativus* L), rosemary (*Rosmarinus officinalis*), boldo (*Peumus boldus* Molina), white tea (*Camellia sinensis* (L.) Kutntze), mate tea (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire), black tea (*Camellia sinensis* (L.) Kutntze), green tea (*Camellia sinensis* (L.) Kutntze), chamomile (*Matricaria recutita* L.), cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*), carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) DC), lemon balm (*Cymbopogon citratus*), coriander (*Coriandrum sativum* L.), clove (*Syzygium aromaticum*), fennel (*Foeniculum vulgare* (Mill.) Gaertn), marjoram (*Origanum majorana* L.), basil (*Ocimum basilicum*), oregano (*Origanum vulgare* L. ssp *Virens*), senna (*Cassia angustifolia*), barbatimão (*Stryphnodendron barbatimam* Mart.), chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus* Mitch.), juca (*Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tul.), guarana (*Paullinia cupana* Kunth), pau d'arco (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich.) and cat's claw (*Uncaria tomentosa*), by determining total phenolic content and antioxidant activity measured through the DPPH and FRAP assays. Thermogravimetric Analysis (TG), with both dynamic and isothermal (110 °C) analysis methods, was used to evaluate the thermal stability of the 24 plant extracts, as well as commercial antioxidants. Corn, soybean and sunflower oils, composed of unsaturated fatty acids, are widely used in Brazilian cuisine. Thus, antioxidant action of the extracts (rosemary, chamomile, coriander, fennel and senna) was also investigated by controlling the oxidative stability of edible vegetable oils when added to these, through the accelerated Rancimat methods, PetroOXY, PDSC and oven test. Clove extract showed the highest antioxidant capacity by FRAP assay and the best CFT. Extracts of juca and barbatimao, both from the Amazon Region, showed high TFC (133.63 ± 1.94 and 147.37 ± 1.99 mg GAE/g extract), confirming the excellent antioxidant capacity determined by the foregoing methods. The thermogravimetric profile of the extracts of cat's claw, saffron, rosemary, white tea and cinnamon stood out due to its good thermal resistance, indicating that may be used as antioxidant additives in formulations requiring heating. The rosemary extract applied to edible oils exhibited greater protective effect than other extracts tested, including the synthetic antioxidant BHT and TBHQ, when evaluated by the PDSC and PetroOXY methods. When the assessment was based on the Rancimat technique, its effect was similar to the one of BHT. Clove extract, although it is an excellent antioxidant, showed no thermal stability, with a mass loss of 81.4% in the first event (28.1 to 266.7 °C), due to the degradation of its main chemical constituent, eugenol.

Keywords: Natural antioxidants, Edible oils, antioxidant capacity, thermo-oxidative stability, accelerated methods, Thermogravimetry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A•	Radicais antioxidantes
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AH	Antioxidantes primários
ANOVA	Análise de variância
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
ASTM	<i>American Society for Testing and Materials</i>
AAT	Atividade Antioxidante Total
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
CE₅₀	Concentração eficiente para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH•
CG-EM	Cromatografia à Gás acoplada ao Espectrômetro de Massa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPPH•	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DTA	Análise Térmica Diferencial
DTG	Termogravimetria Derivada
EDTA	Etilenodiaminotetracético
EAG	Equivalente de ácido gálico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Etanol
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
IA	Índice de acidez
II	Índice de iodo
IP	Índice de peróxido
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LOOH	Hidroperóxidos de lipídios
LOXs	Lipoxigenases
MS	Metabólitos secundários
NBR	Normas brasileiras

•OH	Radical hidroxila
HPOIT / OIT	<i>Oxidative Induction Time</i> (Tempo de indução oxidativa)
OOT	<i>Oxidation Onset Temperature</i> (Temperatura de oxidação)
O₂^{•-}	Ânion radical superóxido
OSI	<i>Oil Stability Instrument</i>
PDSC	Calorimetria Exploratória Diferencial Pressurizada
PI	Período de Indução
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
PG	Propil galato
•ROO	Radical peróxido
RO•	Radical lipídico alcóxil
R•	Radicais livres ou uma espécie radicalar
¹Sen*-	Sensibilizante tripleto excitado
Sen	Sensibilizante
r	Coeficiente de correlação de <i>Pearson</i>
TBHQ	<i>Terc</i> -butil hidroquinona
TG	Análise Termogravimétrica
TPTZ	2, 4, 6 – Tri (2-piridil) – 1,3,5 - triazina
TROLOX	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico
ΔH	Variação de entalpia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da morfina (a), quinina (b) e cafeína (c)	25
Figura 2 – Estrutura química de um glicosinolato	25
Figura 3 – Estrutura química dos flavonóides	28
Figura 4 – Grupos dos flavonóides.	29
Figura 5 – Estrutura dos ácidos fenólicos	30
Figura 6 – Formação da cumarina (b) pela ciclização do ácido <i>o</i> -cumárico (a)	31
Figura 7 – Formação do ácido clorogênico	31
Figura 8 – Esquema da reação dos antioxidantes primários	32
Figura 9 – Mecanismo de ação dos antioxidantes na oxidação lipídica	34
Figura 10 – Estrutura do radical DPPH• e reação de estabilização com um antioxidante.	37
Figura 11 - Redução do complexo TPTZ com Fe ³⁺	37
Figura 12 - Esquema do mecanismo da auto-oxidação.	40
Figura 13 - Mecanismos da foto-oxidação, tipo I e tipo II	42
Figura 14 - Comparação entre os estágios de oxidação e os métodos acelerados de avaliação da estabilidade oxidativa	47
ARTIGO I	
Figure 1 – TG curves of the 24 plant extract	82
ARTIGO II	
Figure 1 – Structure of synthetic antioxidants	93
Figure 2 – TGA/DTA dynamic (a) BHA, (b) BHT, (c) TBHQ and (d) PG	93
Figure 3 – Isothermal TG curves of BHA, BHT and TBHQ	94
Figure 4 – Structure of antioxidants	94
Figure 5 – Curves TG/DTA dynamics of α -tocopherol	94
Figure 6 – Gallic acid (a) TGA/DTA dynamic and (b) isothermal TG curve	95
Figure 7 – Curves TG/DTA dynamics of caffeic acid (a) and ferulic acid (b)	96
Figure 8 – Structure of chelating agents	96
Figure 9 – Curves TG/DTA dynamic (a) citric acid, (b) ascorbic acid, (c) EDTA Isothermal TG curve (d) EDTA	96
ARTIGO III	
Figure 1 – PDSC curves of the samples of vegetable oils, with and without additives: a sunflower oil; b corn oil; c soybean oil	101

Figure 2 – TG/DTA curves and isothermal (110 °C) TG of the rosemary extract	102
Figure 3 – Peroxide values of the vegetable oils, with and without antioxidants for different storage times: a sunflower oil; b corn oil and; c soybean oil	102
Figure 4 – Values for conjugated dienes (CD) of the samples of stored vegetable oils in the oven tests: a sunflower oil; b corn oil and; c soybean oil	103
ARTIGO IV	
Figure 1 – Results for the Pearson correlation coefficient (a) TF x %OAA, (b) TF x IP, and (c) TF x OIT	108
Figure 2 – PDSC isotherm curves (T = 110 °C) of CSO, RSO, SSO, CHSO, FSO, COSO, and BSO	108
ARTIGO V	
Figure 1 – Oxidative stability of the vegetable oils by Rancimat method. (a) Rosemary extract; (b) TBHQ.	120
Figure 2 – Oxidative stability of the vegetable oils by the PetroOXY method. (a) Rosemary extract; (b) TBHQ.	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classe dos compostos fenólicos em plantas	26
ARTIGO I	
Table 1 – Common name, family, scientific name and plant parts tested in the 24 plant species.	74
Table 2 – Total Phenolic Contents (TPC) expressed in mg of GAE/g of plant extract and antioxidant capacity determined by the FRAP method expressed in mmol Fe ²⁺ /g of plant extract and EC ₅₀ (µg/ mL) utilizing the DPPH• radical method.	78
Table 3 – Analysis of the TG curves of the plant extracts, obtained in the non-isothermal mode.	83
Table 4 – Values obtained from DTA curves.	84
Table 5 – Analysis of the isothermal curves of the plant extracts, performed at 110 °C.	86
ARTIGO II	
Table 1 – Values obtained from dynamic and isothermal TG curves of synthetic antioxidants	94
Table 2 – Values obtained from DTA curves of synthetic antioxidants	94
Table 3 – Values obtained curves TG/DTA of natural antioxidants	95
Table 4 – Values obtained curves TG/DTA of Metal deactivators	95
ARTIGO III	
Table 1 – Vegetable oil samples used in the oxidative stability tests and oven tests	99
Table 2 – Fatty acid profile of the vegetable oils	100
Table 3 – Oxidative stability of the vegetable oils obtained by the PDSC method, expressed in terms of OIT	100
Table 4 – Values obtained curves TG/DTA of the rosemary extract	102
ARTIGO IV	
Table 1 – Total phenolics content and values of overall antioxidant activity (%OAA) utilizing the DPPH radical for the plant extracts	107
Table 2 – Evaluation of the oxidative stability for the soybean oil samples by the Rancimat and PDSC techniques	108
ARTIGO V	
Table 1 – Codes for the vegetable oil samples used in the oxidative stability tests performed by the Rancimat and PetroOXY methods	116
Table 2 – Fatty acid profile of the vegetable oils	118
Table 3 - Physico-chemical characterization of the vegetable oils	119

Table 4 - Average induction period (IP) values, obtained by the Rancimat method, of the vegetable oil samples with and without antioxidant additives	119
Table 5 - Average induction period (IP) values, obtained by the PetroOXY method, of the vegetable oil samples with and without the antioxidant additives rosemary extract and TBHQ	122

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 VEGETAIS COMO FONTE DE ANTIOXIDANTES	20
2.1.1 Origem dos antioxidantes vegetais	23
2.1.2 Classificação e mecanismos de ação dos antioxidantes	31
2.1.3 Métodos de avaliação da atividade antioxidante dos extratos vegetais	34
2.2 ESTABILIDADE DE ÓLEOS E GORDURAS	38
2.2.1 Oxidação lipídica	39
2.2.2 Métodos acelerados de avaliação da estabilidade oxidativa	43
2.3 ESTABILIDADE TÉRMICA POR TERMOGRAVIMETRIA - TG	48
3 MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 REAGENTES	49
3.2 ÓLEOS VEGETAIS	50
3.3 EXTRATOS VEGETAIS	50
3.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS	51
3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	52
3.6 PERFIL TÉRMICO DOS EXTRATOS VEGETAIS	53
3.7 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DOS ÓLEOS COMESTÍVEIS	53
3.8 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS VEGETAIS	55
3.9 MÉTODOS ACELERADOS DE AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA	56
3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	57
REFERÊNCIAS	58
4 RESULTADOS	69
4.1 ARTIGO I: Investigation of thermal behavior and antioxidant activity of plant extracts	70

4.2 ARTIGO II: Commercial antioxidants and thermal stability evaluations	92
4.3 ARTIGO III: Rosemary (<i>Rosmarinus officinalis</i>) extract: thermal study and evaluation of the antioxidant effect on vegetable oils	98
4.4 ARTIGO IV: Rancimat and PDSC accelerated techniques for evaluation of oxidative stability of soybean oil with plant extracts	105
4.5 ARTIGO V: Evaluation of the protective effect of rosemary extract on oxidative stability of vegetable oils using accelerated methods	111
5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	128
ANEXOS	129

1 INTRODUÇÃO

A industrialização de oleaginosas constitui uma das mais importantes atividades do agronegócio brasileiro, pois os óleos vegetais são amplamente empregados nas indústrias de alimentos, cosmética, farmacêutica, química e mais recentemente de biodiesel (AZAM; WARIS; NAHAR, 2005; CARLSSON, 2009).

Os óleos e gorduras são extremamente importantes na alimentação humana, pois além de fornecerem energia, são excelentes fontes de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais. Quando presentes nos alimentos conferem excelentes qualidades e aumento da palatabilidade (GERMAN, 1999; SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Entretanto, a natureza insaturada dos ácidos graxos os torna altamente suscetíveis a reações oxidativas que podem comprometer a estabilidade do óleo, causar a degradação dos ácidos graxos essenciais e modificações em suas características sensoriais com o surgimento de odores e sabores desagradáveis, afetando assim a qualidade nutricional além de originar compostos químicos de efeitos nocivos à saúde (RAMALHO; JORGE, 2006; SHAHIDI; ZHONG, 2010).

As indústrias de oleaginosas, no intuito de inibir ou retardar os processos oxidativos, têm utilizado com sucesso substâncias de ação antioxidante. Estas substâncias atuam quimicamente na inativação dos radicais livres, na formação de complexos com os metais de transição ou na redução dos hidroperóxidos (SHAHIDI, 2000).

Os antioxidantes sintéticos butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), *terc*-butil hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG) são largamente empregados na indústria (SHAHIDI, 2000, GUO et al., 2006) devido ao seu baixo custo e bom desempenho. Entretanto, a literatura tem reportado efeitos controversos quanto ao consumo destes aditivos para a saúde humana. Alguns estudos têm associado o consumo regular dos antioxidantes sintéticos com o desenvolvimento de alguns tipos de câncer (ITO et al., 1983; WITSCHI, 1986; WÜRTZEN, 1990). Todavia, existem relatos que discordam totalmente do efeito nocivo destas substâncias, atribuindo a elas, inclusive um efeito protetor (IVERSON, 1995; BOTTERWECK et al., 2000). O fato é que o uso de antioxidantes sintéticos é controlado ou até mesmo proibido em vários países (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2002; BRASIL, 2012).

Nos últimos anos tem crescido o interesse pela atividade antioxidante de extratos vegetais ou de substâncias isoladas de plantas, pois o consumo regular dos alimentos de

origem vegetal tem sido associado à prevenção de doenças degenerativas (WILLCOX; ASH, 2004; FU et al., 2011; HERVERT-HERNÁNDEZ et al., 2011).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural estão os ácidos fenólicos, flavonóides e carotenóides, normalmente encontrados em frutas, ervas, sementes de frutas cítricas e cereais. Estes compostos exercem efeito antioxidante *in vitro* e *in vivo*, prevenindo câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, além de proporcionarem um excelente fator de proteção na estabilidade oxidativa de matrizes lipídicas (SOARES, 2002; CAI et al., 2004; PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2005; YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNÝ, 2006; WOJDYŁO et al., 2007; FU et al., 2011).

Vários métodos têm sido empregados na avaliação do potencial antioxidante e na quantificação destes em extratos vegetais, assim como diferentes metodologias são usadas na avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. Uma associação entre estes métodos se faz necessária para uma avaliação eficiente do efeito protetor de um possível antioxidante.

Considerando a larga utilização industrial de óleos e gorduras e o potencial antioxidante de extratos vegetais junto às matrizes lipídicas, este trabalho relata o estudo da avaliação dos efeitos de extratos vegetais na estabilidade oxidativa de óleos comestíveis através de métodos acelerados de envelhecimento.

1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver bioaditivos antioxidantes de fontes vegetais para aplicação em óleos comestíveis.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos etanólicos das espécies vegetais: açafrão (*Crocus sativus* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), boldo (*Peumus boldus* Molina), chá branco (*Camellia sinensis* (L.) Kutntze), chá preto (*Camellia sinensis* (L.) Kutntze), chá verde (*Camellia sinensis* (L.) Kutntze), camomila (*Matricaria recutita* L.), canela (*Cinnamomum zeylanicum*), carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) DC), coentro (*Coriandrum sativum* L.), cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*), erva-cidreira (*Cymbopogon citratus*), erva-doce (*Foeniculum vulgare* (Mill.) Gaertn), erva-mate

(*Ilex paraguariensis* St. Hilaire), manjerona (*Origanum majorana* L.), manjeriço (*Ocimum basilicum*), orégano (*Origanum vulgare* L. ssp *Virens*), sene (*Cassia angustifolia*), barbatimão (*Stryphnodendron barbatimam* Mart.), chapéu de couro (*Echinodorus grandiflorus* Mitch.), jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tul.), guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), pau D'arco (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich.) e unha de gato (*Uncaria tomentosa*);

- Avaliar a estabilidade térmica dos extratos vegetais e antioxidantes comerciais por termogravimetria;
- Avaliar o potencial antioxidante dos extratos vegetais através da determinação do conteúdo de fenólicos totais e da capacidade antioxidante;
- Aplicar os extratos vegetais (alecrim, camomila, coentro, erva-doce e sene) como antioxidantes nos óleos comestíveis (girassol, milho e soja) e determinar a estabilidade oxidativa através de técnicas aceleradas;
- Correlacionar os efeitos antioxidante do extrato de alecrim nos óleos vegetais pelos métodos de oxidação acelerada Rancimat e PetroOXY.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 VEGETAIS COMO FONTES DE ANTIOXIDANTES

Os vegetais são tradicionalmente conhecidos como fontes de água, carboidratos, proteínas, vitaminas, minerais, micronutrientes essenciais, fibras dietéticas e óleos comestíveis necessários para a manutenção da vida, fornecem também outros compostos biologicamente ativos chamados de metabólitos secundários (MS), que são utilizados como agentes farmacêuticos, agroquímicos, aromas, corantes, biopesticidas e aditivos alimentares (RAO; RAVISHANKAR, 2002; HERVERT-HERNÁNDEZ et al., 2011).

Estes MS mais recentemente foram reconhecidos como importantes fontes de uma grande variedade de fitoquímicos que, individualmente ou em combinação, proporcionam benefícios à saúde e são utilizados no tratamento de doenças (SPERONI; SCARTEZZINI, 2000; MATKOWSKI, 2008; KIM; PARK; LIM, 2010; KRISHNAIAH et al., 2011).

Em consequência, estudos têm revelado que os efeitos de uma alimentação saudável com base na ingestão de vegetais e alimentos e bebidas deles derivados, tem sido inversamente associados com o índice de morbidade e mortalidade por doenças coronárias e degenerativas (LAMPE, 2003; WILLCOX; ASH, 2004; CURIN; ANDRIANTSITOHAINA, 2005; TANG et al., 2008).

A proteção que os vegetais: legumes, frutas, especiarias, ervas e seus extratos proporcionam contra doenças é atribuída aos diversos antioxidantes neles contidos como tocoferóis, carotenóides e compostos fenólicos ou polifenóis, incluindo os ácidos fenólicos, flavonóides e isoflavonas, taninos hidrolisáveis, ligninas, cumarinas e antocianinas (KAHKONEN et al., 1999; ZHENG; WANG, 2001). Particularmente os polifenóis mostram efeitos protetores nos processos degenerativos do cérebro (CONTE; PELLEGRINI; TAGLIAZUCCHI, 2003) efeitos anti-inflamatório, anticancerígeno e antiaterogênico (KURODA; HARA, 1999; DELL'AGLI; BUSCIALA; BOSISIO, 2004).

Muitas especiarias são conhecidas pelas propriedades medicinais e efeitos benéficos sobre a saúde, tais como atividade antioxidante, ação estimulante digestivo, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antimutagênica e potencial anticancerígeno (PIZZALE et al., 2002; LAMPE, 2003; SRINIVASAN, 2005).

A família Lamiaceae, representada pelas ervas alecrim, sálvia, orégano e tomilho, é conhecida pelas suas propriedades antioxidantes atribuídas principalmente aos compostos fenólicos como o ácido rosmarínico, ácido caféico carnosol, rosmanol, ácido carnósico,

luteolina, catequina, campferol, timol e ácido *p*-coumárico (MIURA et al., 2002; PIZZALE et al., 2002; PUKALSKAS; BEEK; WAARD, 2005; SHAN et al., 2005; MAHMOUD; AL-SHIHRY; SON, 2005).

Vegetais crucíferos como brócolis, repolho, e couve-flor contêm isotiocianatos, que mostram atividade quimiopreventiva potente contra o cancro de bexiga, tanto *in vitro* como em estudos *in vivo* (TANG et al., 2008).

Outros estudos também mostraram que pimenta do reino, cravo, canela, salsa, amaranto, erva-cidreira, erva-doce, cebolinha e coentro possuem propriedades antioxidantes (ZHENG; WANG, 2001; GULCIN et al., 2004; MELO; MANCINI; GUERRA, 2005).

Um número considerável de estudos indica que juntos, os componentes ativos das frutas e legumes produzem um arranjo de antioxidantes que podem agir por diferentes mecanismos para conferir um sistema de defesa efetivo contra o ataque dos radicais livres (SHAHIDI, 1997), evitando que os radicais livres induzam doenças e resguardando os alimentos contra a deterioração oxidativa (LA VECCHIA; ALTIERI; TAVANI, 2001; FAIRFIELD; FLETCHER, 2002).

A formação de radicais livres pelas espécies reativas de oxigênio (ERO), de nitrogênio (ERN), entre outras espécies reativas é supostamente o fator de desencadeamento de doenças tais como o desenvolvimento de câncer e doenças coronárias. Os radicais livres formam-se em condições fisiológicas em proporções controladas pelos mecanismos de defesa das células. Entretanto em situações patológicas, a produção de radicais livres pode aumentar substancialmente e atacar biomoléculas, dentre as quais se destacam os lipídios, as proteínas ou o DNA propriamente dito (HALLIWELL, 1997), os quais podem ser preservados pela ação dos antioxidantes.

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que em pequenas concentrações, em comparação ao substrato oxidável, retardam ou previnem significativamente o início ou a propagação da cadeia de reações de oxidação. Estes compostos inibem não só a peroxidação dos lipídios, mas também, a oxidação de outras moléculas como proteínas, DNA, entre outras (HALLIWELL et al., 1995).

Os extratos vegetais de frutas, de sementes de frutas cítricas, de ervas e especiarias (YANISHLIEVA; MARINOVA; POKORNÝ, 2006), os cereais (PÉREZ-JIMÉNEZ; SAURA-CALIXTO, 2005) e seus subprodutos industriais são ricos em antioxidantes, como ácido ascórbico, cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (NACZK; SHAHIDI, 2003), tocoferóis e carotenoides, todos estes têm

demonstrado eficaz atividade antioxidante em sistemas modelos (WOLFE; WU; LIU, 2003; MANACH et al., 2004).

Dentre as várias classes de substâncias antioxidantes de fonte natural, os compostos fenólicos, nos últimos anos, têm recebido muita atenção, principalmente por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (SOARES, 2002). As principais fontes de compostos fenólicos são frutas cítricas (limão, laranja e tangerina), cereja, uva, ameixa, pera, maçã, tomate e mamão, assim como a pimenta verde, brócolis, repolho roxo, cebola e alho (ANGELO; JORGE, 2007).

Os compostos antioxidantes de fontes vegetais têm demonstrado, em experiências *in vitro*, proteger contra os danos da oxidação, principalmente pela sua propriedade redox, que atua na absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio singlete e tripleto, ou decompondo peróxidos (ZHENG; WANG, 2001).

Os antioxidantes naturais ocorrem em todas as plantas superiores, e em todas as partes da planta como nas cascas, talos, madeira, folhas, frutos, raízes, flores, pólen e sementes. Porém, são influenciados e sofrem modificações e variam consideravelmente dependendo de vários fatores. Os metabólitos secundários representam uma interface química entre a planta e o ambiente circundante, portanto, sua síntese é frequentemente afetada por condições ambientais como sazonalidade, ciclo circadiano, variações de temperaturas, umidade, pH e fertilidade do solo, bem como a idade e o desenvolvimento da planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

São relatadas variações no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, por exemplo, nos óleos essenciais, ácidos fenólicos, flavonóides, cumarinas, saponinas, alcalóides, taninos e glicosídeos cianogênicos, podendo alguns dos fatores citados acima apresentarem correlações entre si e não atuarem isoladamente, influenciando em conjunto no metabolismo secundário (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Em suma, cada vez mais se sustenta, em base científica, a tese de que as plantas e seus princípios ativos têm um papel importante na prevenção de doenças crônicas e degenerativas. Estes vários e potentes mecanismos de ação fazem dos MS, em especial os compostos fenólicos, alvos em busca de fitoquímicos benéficos à saúde e de fontes naturais de antioxidantes principalmente para minimizar o dano oxidativo das células vivas e prevenir a deterioração de alimentos, aumentando a vida de prateleira (YANISHLIEVA; MARINOVA, 2001; LIA et al., 2008; ANDRÉ et al., 2010; MAGANHA et al., 2010).

2.1.1 Origem dos antioxidantes vegetais

Ao longo do processo evolutivo, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa para sua sobrevivência. As rotas biossintéticas ou MS foram formas de proteção que as plantas desenvolveram para produção de substâncias nocivas e tóxicas aos inúmeros parasitas e predadores (WINK, 2003; VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

A natureza de uma forma geral, especialmente o reino vegetal é que tem contribuído de forma mais significativa para o fornecimento de MS, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamentos, corantes, cosméticos, *flavors*, fragrâncias, alimentos e agroquímicos (DIXON, 2001; PINTO et al., 2002).

Os MS têm múltiplas funções durante todo o ciclo de vida da planta e podem ser classificados como mediadores na interação da planta com seu meio ambiente, protegendo as plantas contra herbívoros e patógenos; funcionando como atrativos (aroma, cor, sabor) para polinizadores e; servindo como agentes de competição entre plantas e de simbiose entre plantas e microrganismos (BENNETT; WALLSGROVE, 1994; DEWIK, 2002).

Esses MS estão presentes em todas as plantas superiores, geralmente em uma elevada diversidade estrutural. Em regra, os MS numa mesma planta implicam em uma certa complexidade, não possuindo uma distribuição universal, sendo restritos a uma espécie vegetal ou a um grupo de espécies, ou ainda presentes em concentrações diversas, em função dos distintos estágios de desenvolvimento da planta (ALVES, 2001; WINK, 2003).

Três grupos distintos quimicamente dividem os MS vegetais: terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos (DEWIK, 2002; VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Os terpenóides constituem o maior grupo de produtos secundários, sendo derivados de unidades de isoprenos (cinco carbonos) e biossintetizados a partir de metabólitos primários por duas rotas diferentes, a do ácido malônico e a do metileritritol fosfato. Seu nome, deriva do fato de que os primeiros membros da classe foram isolados da terebentina (*terpentin* em alemão) (LICHTENTHALER, 1999; VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). Assim, são classificados em hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) (DEWIK, 2002).

Os monoterpenos como o limoneno, eugenol e o mentol, devido ao seu baixo peso molecular, se apresentam como substâncias voláteis sendo, portanto, denominados óleos essenciais. Dentre os diterpenos, a giberelina é importante hormônio vegetal responsável pela germinação de sementes, alongamento caulinar e expansão dos frutos de muitas espécies

vegetais. Do ponto de vista farmacológico destaca-se o taxol, como agente anticancerígeno e o forskolin, também chamado coleonol, composto utilizado no tratamento de glaucoma. Já as saponinas são uma classe importante de triterpenos que nas plantas desempenham um importante papel na defesa contra insetos e microrganismos (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Os tetraterpenos são compostos lipossolúveis, sendo os mais reconhecidos os carotenos e as xantofilas. Nas plantas, os carotenoides desempenham um importante papel, pois fazem parte das antenas de captação de luz nos fotossistemas. Além disso, esses compostos são importantes antioxidantes e dissipadores de radicais livres gerados pela fotossíntese e conferem às plantas cores amareladas, alaranjadas e avermelhadas (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). O β -caroteno e o licopeno são exemplos de carotenos, enquanto a luteína e a zeaxantina são xantofilas (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006), encontrados no mamão, damasco, pitanga, manga, laranja, batata doce, milho, abóbora, cenoura, tomate, salsa e espinafre (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

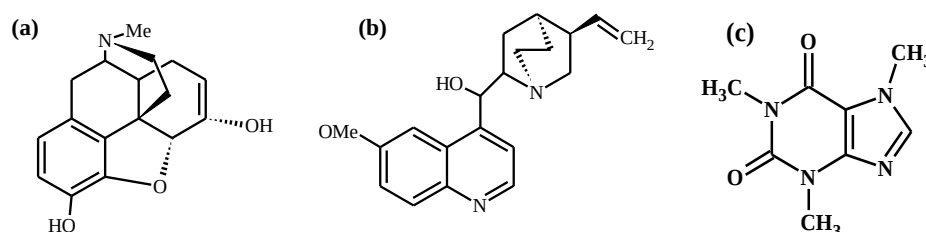
Estudos demonstram que tanto os carotenóides como a luteína e a zeaxantina proporcionam ação protetora contra o câncer (KIM; AHN; LEE-KIM, 2001). A luteína e a zeaxantina, que são amplamente encontradas em vegetais verde-escuros, parecem exercer uma ação protetora contra degeneração macular e catarata (LANDRUM; BONE, 2001). Por sua vez, o β -caroteno é consagrado como um potente antioxidante com ação protetora contra doenças cardiovasculares (OSGANIAN et al., 2003) e inúmeras aplicações no controle da oxidação de lipídios.

Uma grande variedade de MS vegetais possui em sua estrutura o nitrogênio, compreendendo os alcalóides e os glicosídeos cianogênicos. Os alcalóides são bases orgânicas cíclicas que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio no seu anel e são sintetizados principalmente a partir de aminoácidos (lisina, tirosina e triptofano) ou derivados destes (DEWICK, 2002). Essa classe de compostos de MS é famosa pela presença de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas largamente utilizadas como venenos ou alucinógenos (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010). A morfina, a quinina e a cafeína (Figura 1) são alguns dos principais representantes desta classe de MS.

A cafeína é um dos alcalóides com atividade biológica mais ingerida no planeta. Apresenta ação farmacológica variada provocando, dentre outros efeitos, alterações no sistema nervoso central, sistema cardiovascular e homeostase de cálcio. A cafeína, identificada como 1,3,7-Trimetilxantina, é encontrada em grande quantidade nas sementes de café (*Coffea sp.*), nas folhas de chá verde (*Camellia sinensis*), na erva-mate (*Ilex*

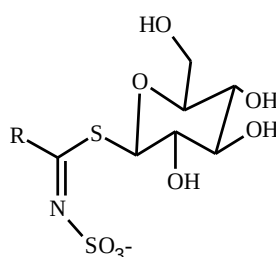
paraguariensis), no cacau (*Theobroma cocoa*) e no guaraná (*Paullinia cupana*) (MARIA; MOREIRA, 2007). Estudos apontam o efeito neuroprotetor da cafeína sobre a doença de Parkinson (PREDIGER, 2010, SANTOS et al., 2010).

Figura 1 – Estrutura química da morfina (a), quinina (b) e cafeína (c)



A presença do grupo sulfato na molécula dos glicosinolatos confere propriedades fortemente ácidas, responsável pelo odor e gosto característico de certos vegetais, como a couve, repolho, brócolis e rabanete (BENNETT; WALLSGROVE, 1994). Os glicosinolatos (Figura 2) e os metabólitos derivados de sua hidrólise exercem uma variedade muito ampla de atividades biológicas em plantas, animais e seres humanos, atuando como defensivos contra patógenos e herbívoros em plantas e na prevenção do câncer em humanos. Estudos epidemiológicos em humanos e em animais mostraram que a dieta rica em vegetais crucíferos resulta em redução da incidência de diversos tipos de câncer, especialmente de bexiga (SIVAKUMAR et al., 2007; TANG et al., 2008).

Figura 2 – Estrutura química de um glicosinolato



Os compostos fenólicos são constituintes ubíquos de plantas superiores encontrados tanto nas formas livres como complexados a açúcares e proteínas, em uma ampla gama de alimentos de origem vegetal, como frutas, legumes, cereais e leguminosas, e em bebidas de origem vegetal, tais como o vinho, chá e café (MANACH et al, 2004; CHEYNIER, 2005) e constituem um amplo e complexo grupo de fitoquímicos, com mais de 6000 estruturas

conhecidas (CROFT, 1998; LEE et al., 2005). Duas rotas metabólicas estão envolvidas na síntese de compostos fenólicos: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido mevalônico (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

Os fenólicos são essenciais no crescimento e reprodução dos vegetais, além de atuarem como agente antipatogênico e contribuírem na pigmentação, sendo responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa nos alimentos (ANGELO; JORGE, 2007). Quimicamente, os chamados compostos fenólicos são substâncias que possuem ao menos um anel benzênico/aromático no qual pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila, conferindo propriedades antioxidantes aos vegetais (SOARES, 2002).

A diversidade estrutural dos polifenóis se deve a grande variedade de combinações que ocorre na natureza, permitindo agrupá-los em diferentes classes de acordo com sua estrutura básica (Tabela 1), associação com carboidratos e formas polimerizadas (MANACH et al, 2004; FARAH; DONANGELO, 2006; ANGELO; JORGE, 2007), podendo ser classificados de acordo com o tipo de esqueleto principal (C6), que constituirá o anel benzênico e com a cadeia substituinte (Cn) (Tabela 1).

Tabela 1 – Classe dos compostos fenólicos em plantas

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzóicos	C6-C1
Ácidos fenilacéticos, acetofenol	C6-C2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C6-C3
Nafitoquinonas	C6-C4
Xantonas	C6-C1-C6
Estilbenzenos, antoquinonas	C6-C2-C6
Flavonóides	C6-C3-C6
Lignanas, neolignanas	(C6-C3) ₂
Ligninas	(C6-C3) _n
Taninos condensados	(C6-C3-C6) _n

Fonte: Angelo; Jorge (2007)

Segundo Ribèreau-Gayon (1968) os compostos fenólicos também podem ser classificados de acordo com a sua ocorrência reino vegetal, sendo classificados em: pouco distribuídos, polímeros e amplamente distribuídos.

Na família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza, conforme Soares (2002) encontra-se em número bem reduzido de plantas. Fazem parte deste grupo os fenóis simples (pirocatecol, hidroquinona, resorcinol) e os aldeídos derivados dos ácidos benzóicos (constituintes dos óleos essenciais), como a vanilina de reconhecido valor industrial.

Os polímeros não se apresentam na forma livre nos vegetais, são eles: os taninos e as ligninas. Os taninos são responsáveis pela sensação de adstringência nos alimentos e são classificados em taninos hidrolizáveis (ácido gálico) e taninos condensados (catequina e leucoantocianidina). As ligninas são polímeros complexos de grande rigidez que quando sofrem uma hidrólise alcalina libera grande variedade de compostos derivados dos ácidos benzóicos e cinâmico.

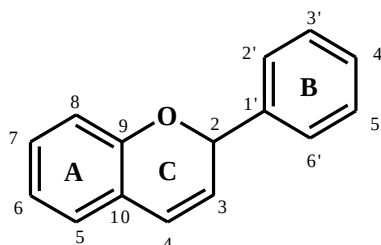
No grupo dos amplamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados em todo reino vegetal. São divididos em dois grandes grupos: os flavonóides e derivados e os ácidos fenólicos (ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados) e as cumarinas. Dentre estas classes, destaca-se a dos flavonóides e a dos ácidos fenólicos por serem largamente distribuídos na natureza e os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (SOARES, 2002).

Os flavonóides além da pigmentação em frutas, flores, sementes e folhas, também desempenham um papel fundamental na proteção contra agentes oxidantes (raios ultravioleta, poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos, entre outros) e atuam também como agentes terapêuticos em um elevado número de patologias, tais como doenças coronarianas e câncer (HERTOG et al., 1995; YOCHUM et al., 1999; WENZEL et al., 2000; NEUHOUSER, 2004). Sua capacidade de inibir a peroxidação dos lipídios, quelar metais e outros processos além de enfraquecer as espécies reativas de oxigênio (HEIM et al., 2002), cumprem importantes funções na sinalização entre plantas e microorganismos, na defesa como agentes antimicrobianos e na fertilidade de algumas espécies (WINKEL-SHIRLEY, 2001). Não podem ser sintetizados pelo organismo humano, sendo obtidos através da ingestão de alimentos que os contenham como as frutas, verduras, cerveja, vinho, chá verde, chá preto, cacau e soja. São formados pela combinação de derivados sintetizados a partir da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético (WINKEL-SHIRLEY, 2001).

A estrutura química dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e anel B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 3). As variações/substituições que ocorrem no anel C resultam em importantes classes de flavonóides como: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Por sua vez, as variações/substituições dos anéis A e B originam

diferentes compostos dentro de cada classe de flavonóides (ANGELO; JORGE, 2007; STALIKAS, 2007).

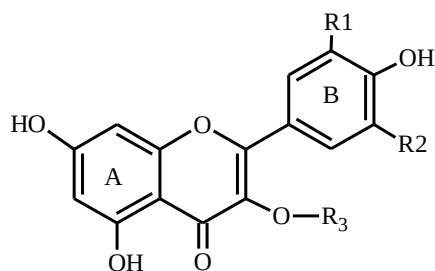
Figura 3 – Estrutura química dos flavonóides



A atividade biológica dos flavonóides e de seus metabólitos depende da sua estrutura química e dos vários substituintes da molécula, pelas reações de glicosilação, esterificação, amidação, hidroxilação, entre outras alterações que irão modular a polaridade, toxicidade e direcionamento intracelular destes compostos (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

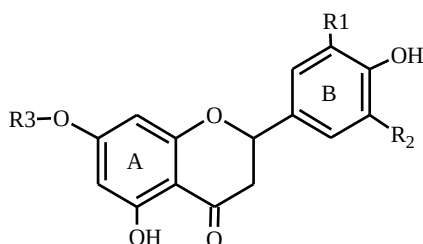
Em função da substituição e do nível de oxidação no anel C resultam importantes classes de flavonóides (ANGELO; JORGE, 2007) (Figura 4), como:

- Flavonóis - possuem um grupo carbonila na posição 4, um grupo hidroxila na posição 3, e uma ligação dupla entre os carbonos 2,3, como por exemplo a quercetina, a rutina e o Campferol;
- Flavonas - possuem um grupo carbonila na posição 4 e uma ligação dupla entre os carbonos 2,3, como por exemplo a apigerina e a luteolína;
- Flavanononas - possuem um grupo carbonila na posição 4, com por exemplo a hesperidina e a naringina;
- Flavanóis - possuem um grupo hidroxila na posição 3, como por exemplo, a catequina, a epigallocatequina e a epicatequina;
- Isoflavonóides - possuem um grupo carbonila na posição 4 e o anel B encontra-se ligado à molécula restante através do carbono 3, podendo ainda possuir uma ligação dupla entre os carbonos 2 e 3, como por exemplo a genisteína e o coumestrol;
- Antocianidinas - possuem um grupo hidroxila na posição 3 e duas ligações duplas, uma entre o átomo de oxigênio e o carbono 2 e outra entre os carbonos 3 e 4, como por exemplo a cianidina e a antocianina.

Figura 4 – Grupos dos flavonóides.

Flavonóis	R1	R2	R3
Quercetina	OH	H	H
Miricetina	OH	OH	H
Campferol	H	H	H
Rutina	OH	H	*

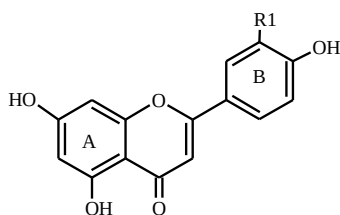
*Ramnospiranosídeo



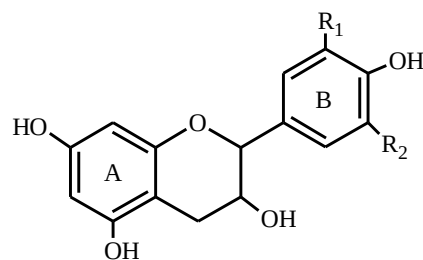
Flavanonas	R1	R2	R3
Naringina	H	H	*
Hesperidina	OH	H	* ¹

*Ramnoglicosídeo

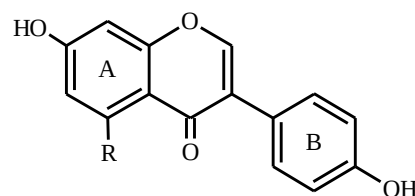
*¹ Rutinose



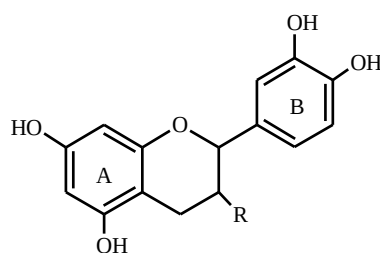
Flavonas	R
Apigenina	H
Luteolina	OH



Flavanóis	R1	R2
Catequina	OH	H
Epigallocatequina	OH	OH



Isoflavonas	R
Daidzeina	H
Genisteina	OH



Antocianidinas	R
Antocianina	*
Cianidina	OH

* glicosídeo

O grupo mais comum dos flavonóides pigmentados consiste nas antocianinas, as quais são responsáveis pela maioria das cores vermelha, rosa, roxa e azul observadas nos vegetais. As flavonas e flavonóis estão muito presentes em flores e nas folhas de todas as

plantas verdes. Dentre os flavonóis, o campferol, a quercetina e a miricetina são as mais comuns e no grupo das flavonas, mais frequentemente encontrados nos vegetais são a apigenina, luteolina e tricetina. O mel, própolis, uva, ameixa, morango vinho tinto, soja, chá verde, cacau e chocolate são excelentes fontes de flavonóides.

O termo “ácidos fenólicos”, em geral designa fenóis que possuem um ácido carboxílico funcional (Figura 5). São divididos, de acordo com Soares (2002), em três grupos, sendo o primeiro composto pelos ácidos benzóicos, o mais simples encontrado na natureza. Estes possuem sete átomos de carbono e apresentam grupo carboxílico ligado ao anel aromático. Destacam-se os ácidos protocatequínico, vanílico, siríngico, gentiíico, salicílico e gálico como os mais comuns. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos (derivados dos ácidos hidroxicinâmico), que possuem nove átomos de carbono (C6-C3), sendo os ácidos *p*-cumarico, caféico, ferúlico e sináptico os mais comumente encontrados no reino vegetal. E o terceiro grupo composto pelas cumarinas que são derivadas do ácido cinâmico pela ciclização da cadeia lateral do ácido *o*-cumárico (Figura 6).

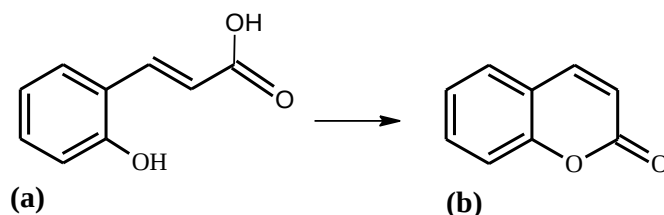
Figura 5 – Estrutura dos ácidos fenólicos



Ácidos fenólicos	Classe	R1	R2	R3	R4
Ácido gálico	Benzóico	na	na	OH	OH
Ácido protocatequínico	Benzóico	na	na	H	OH
Ácido clorogênico	Cinâmico	OH	*	na	na
Ácido vanílico	Benzóico	na	na	H	OCH ₃
Ácido caféico	Cinâmico	OH	H	na	na
Ácido siríngico	Benzóico	na	na	OCH ₃	OCH ₃
Ácido <i>p</i> -cumárico	Cinâmico	H	H	na	na
Ácido ferrúlico	Cinâmico	OCH ₃	H	na	na

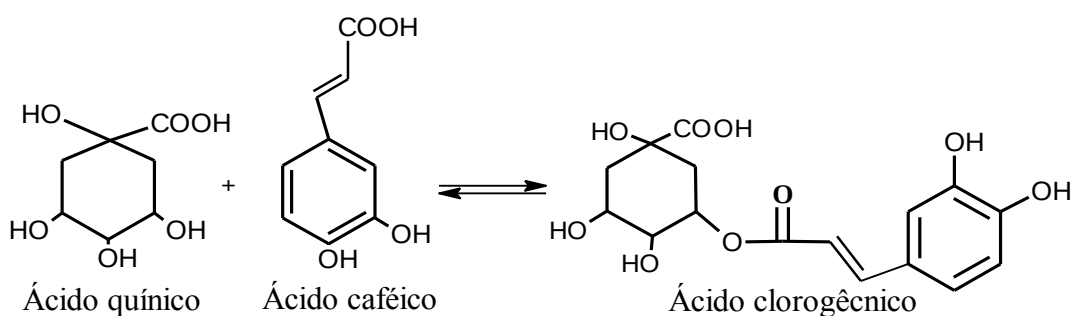
Legenda: na= não se aplica; *Ácido quínico.

Figura 6 – Formação da cumarina (b) pela ciclização do ácido *o*-cumárico (a)



Os ácidos fenólicos também se apresentam ligados entre si ou com outros compostos, como ocorre com o ácido caféico associado ao ácido quínico, originando o ácido clorogênico (Figura 7) (SOARES, 2002).

Figura 7 – Formação do ácido clorogênico



Os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são eficazes em prevenir a oxidação lipídica, pois funcionam como sequestradores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. No entanto, está comprovado que a estrutura química dos compostos fenólicos é responsável pelo potencial antioxidante/capacidade de atuar como sequestradores de radicais livres, pois o tipo de composto, o grau de metoxilação e o número de hidroxilas, bem como as posições destas são alguns dos parâmetros que determinam esta atividade antioxidante (MARINOVA; YANISHLIEVA, 1992).

2.1.2 Classificação e mecanismos de ação dos antioxidantes

Os antioxidantes representam uma classe de substâncias químicas com estruturas variadas e uma diversidade de mecanismos de ação. Podem estar presentes como constituintes

naturais dos alimentos ou podem ser adicionados intencionalmente para preservar os componentes lipídicos da deterioração (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

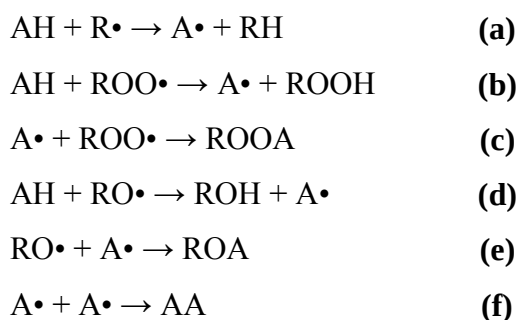
De acordo com o mecanismo de ação, os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários.

Os antioxidantes primários atuam retardando a oxidação lipídica, interrompendo a reação em cadeia através da doação de um átomo de hidrogênio aos radicais formados durante a fase de iniciação do processo oxidativo formando radicais mais estáveis. Os principais representantes desta classe de antioxidantes são os fenóis, como butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), que são sintéticos, e tocoferóis, que são naturais (SHAHIDI; ZHONG, 2005; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005; RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes primários (AH) reagem com os radicais livres (ROO• e R•) e converte-os em produtos mais estáveis, como mostrado na Figura 8, c e d. O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é abstraído pelos radicais livres com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas (Figura 8a). Os derivados fenólicos estabilizam o radical livre por deslocalização eletrônica no anel aromático (efeito de ressonância), interrompendo assim a propagação de reações radicalares oxidativas no meio (LITWINIENKO; KASPRZSYCKA-GUTTMAN; JAMANEK, 1999).

Os radicais peróxidos têm afinidades mais elevadas pelos AH do que os lipídios, reagindo predominantemente com os antioxidantes (Figura 8b), pois os radicais oriundos das moléculas de antioxidantes são relativamente estáveis e não possuem energia suficiente para reagir com o lipídeo.

Figura 8 – Esquema da reação dos antioxidantes primários



Os radicais antioxidantes são relativamente estáveis de modo que reagem com radicais peróxidos (•ROO) para interromper a propagação da cadeia, assim, eles inibem a

formação de peróxidos (Figura 8c). Além disso, a reação com os radicais alcóxil ($RO\bullet$) diminuem a decomposição de hidroperóxidos, considerados produtos nocivos (Figura 8d).

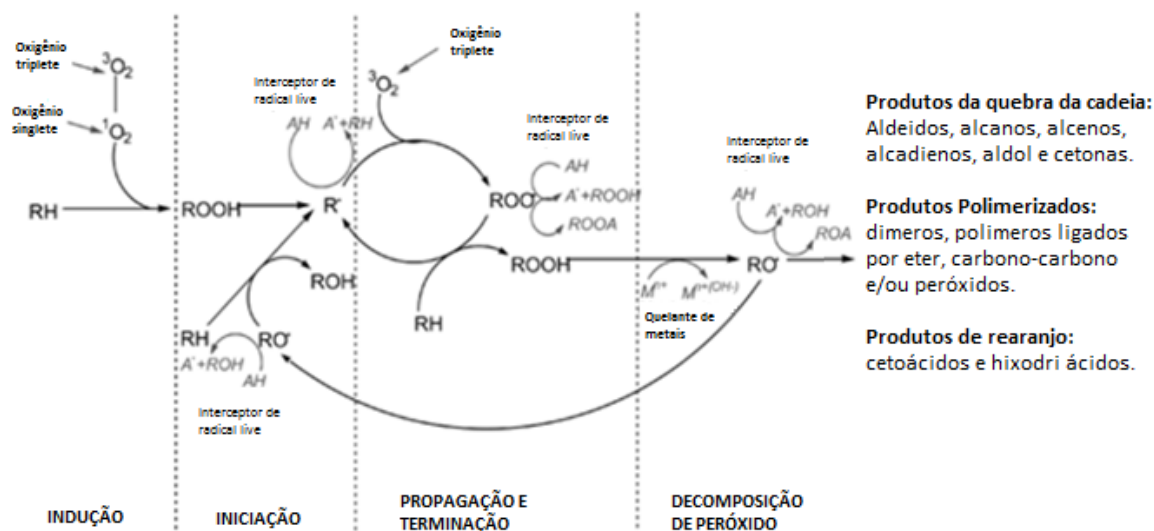
Os antioxidantes secundários retardam a taxa de oxidação através de vários mecanismos (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2001; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005). São compreendidos neste grupo:

- Agentes quelantes de metais - são antioxidantes que complexam com metais e atuam de forma preventiva, uma vez que não ocorre a interação com radicais, e inibem a decomposição do peróxido. Complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Múltiplos compostos de ácidos carboxílicos, tais como ácido cítrico, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e derivados de ácido fosfórico (polifosfatos e ácido fítico) são comumente utilizados para aumentar a vida útil de alimentos contendo lípidos, devido às suas propriedades quelantes de metais;
- Compostos que regeneram os antioxidantes primários - como o ácido ascórbico, que regenera o α -tocoferol;
- Compostos que decompõem os hidroperóxidos - como os fosfolipídios, que formam produtos finais estáveis; e
- Removedores de oxigênio - Como o oxigênio é essencial e é um catalizador no processo de auto-oxidação, substâncias como ácido ascórbico e palmitato de ascorbila atuam capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis, tornando-o, conseqüentemente, indisponível para atuar como propagador da auto-oxidação.

Os antioxidantes quando presentes nos óleos e gorduras podem atuar inibindo as reações de oxidação que conduzem a processos complexos de auto-oxidação, foto-oxidação e/ou oxidação enzimática. A Figura 9 ilustra os eventos possíveis que os antioxidantes primários e secundários podem interferir durante a auto-oxidação de lipídios.

Na reação de auto-oxidação os antioxidantes atuam prevenindo as reações oxidativas ou como bloqueadores de reações em cadeia, podendo ser doadores ou receptores de elétrons. Os doadores de elétrons competem com o lipídio pelo radical peroxil, resultando na diminuição da velocidade de reação. Já os receptores competem com o oxigênio tripleto pelo radical livre, reduzindo a formação do radical peroxil (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2001).

Figura 9 – Mecanismo de ação dos antioxidantes na oxidação lipídica



Fonte: Wanasundara; Shahidi (2005).

Na foto-oxidação, os carotenóides e os tocoferóis são capazes de inativar sensibilizadores fotoativados fisicamente absorvendo a sua energia, convertendo o oxigênio singlete a triplete. Enquanto que na oxidação enzimática, os flavonóides, ácidos fenólicos e galatos inibem a ação da lipoxigenase (POKORNY; YANISHLIEVA; GORDON, 2001).

Alguns antioxidantes exibem mais do que um mecanismo de atividade, portanto, referidos como multifuncionais. Os antioxidantes de fontes naturais estão muitas vezes presentes em combinações envolvendo muitos compostos diferentes. Cada composto pode estar presente juntamente com o(s) seu(s) precursor(es). Assim, o modo de ação de antioxidantes de fontes naturais pode ser variado e por isso envolver múltiplos mecanismos de ação (SHAHIDI, 2000).

2.1.3 Métodos de avaliação da atividade antioxidante dos extratos vegetais

Existem alguns métodos de avaliação da capacidade antioxidante com mecanismos de reação e formas de expressar resultados muito diferentes. Por sua vez, inúmeras são as aplicações (fisiologia, farmacologia, nutrição, agroquímica, cosmética e outras) tornando-se difícil escolher o método mais adequado, de modo a evitar equívocos na interpretação dos resultados.

Nesse sentido, é necessária a utilização de métodos distintos, com diferentes substratos e componentes, de forma a avaliar os diferentes efeitos antioxidantes (OLIVEIRA, VALENTIM, GOULART, 2009). Por isso dentre os diversos métodos existentes, deve-se avaliar qual é o mais adequado para o estudo com base em suas vantagens e desvantagens gerando, assim, um perfil do antioxidante, sem perder de vista a relação com a potencial aplicação do produto.

Segundo Oliveira et al. (2009) é necessário frisar que a comparação da capacidade antioxidante entre os diferentes métodos não é feita em valores absolutos, pois cada método tem sua própria escala de valores. Observa-se ainda que o estudo da capacidade antioxidante total é preferível, em vez da análise de antioxidantes isolados, uma vez que há dificuldade em medir cada antioxidante e, principalmente, devido à interação que existe entre eles.

A atividade antioxidante pode ser medida diretamente em sua capacidade de sequestrar radicais livres, ou indiretamente pelos efeitos do antioxidante no controle da oxidação. Entretanto, existem diferenças nos testes que medem a capacidade de sequestrar radicais, quanto aos tipos de radicais livres gerados, indicadores de oxidação escolhidos e métodos usados para a detecção e a quantificação. E os resultados desses testes podem ser expressos como porcentagem de inibição, redução da concentração do radical livre em 50%, tempo para redução dessa concentração a 50%, equivalente Trolox ou complexação com ferro (ANTOLOVICH et al., 2002; SÁNCHEZ-MORENO, 2002).

Para as medidas indiretas são empregados os testes que avaliam o estado de oxidação lipídica em amostras com e sem antioxidantes, e os resultados são expressos como efeito inibidor, como taxa de consumo de reagentes ou formação de produto. A atividade antioxidante também pode ser medida indiretamente pelo aumento da estabilidade oxidativa expresso como um índice antioxidante ou fator de proteção (ANTOLOVICH et al., 2002).

Diferentes métodos são utilizados para caracterizar a capacidade antioxidante de alimentos, entretanto, nenhum é completo (PRIOR et al., 2005). A literatura apresenta numerosos estudos sobre as propriedades antioxidantes de espécies vegetais realizadas utilizando diferentes métodos de ensaios (ZHENG; WANG, 2001; MIURA et al., 2002; NINFALI et al., 2005; WOOTTON-BEARD; MORAN; RYAN, 2011). No entanto, a grande variedade de sistemas de oxidação e formas de medir a atividade antioxidante dificulta a comparação dos resultados dos diversos estudos (SHAN et al., 2005).

Dentre os diversos métodos e técnicas utilizados para a identificação e quantificação desses antioxidantes naturais podem ser citados a determinação dos compostos fenólicos totais, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), a Cromatografia à Gás acoplada

ao Espectrômetro de Massa (CG-EM), o método de redução do ferro⁺³ FRAP e o método de detecção de sequestradores de radicais livres, como o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•). Destes destacam-se os métodos de quantificação do conteúdo de fenólicos totais, DPPH e FRAP.

2.1.3.1 Conteúdo total de fenólicos por Folin-Ciocalteu

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, a que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu, desenvolvido por Singleton e Rossi (SINGLETON; ROSSI, 1965) figura entre as mais extensivamente utilizadas (NACZK; SHAHIDI, 2004; SHAN et al., 2005; OMONI; ALUKO, 2005; ROGINSKY; LISSI, 2005; SOUZA et al., 2007; LEE et al., 2008).

O reagente consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotunguístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação +6. O método baseia-se na redução dos ácidos em solução alcalina na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos. São formados os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, cuja coloração é medida espectrofotometricamente ($\lambda=765$), permitindo a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (IKAWA et al., 2003; NACZK; SHAHIDI, 2004). Para a quantificação é construída uma curva padrão onde o ácido gálico geralmente é o mais utilizado.

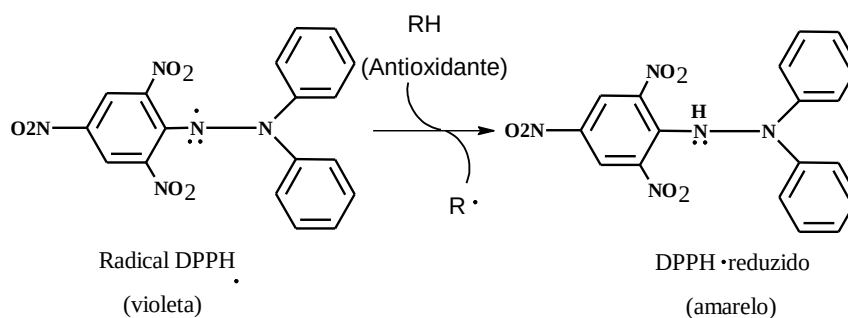
2.1.3.2 DPPH•

O método mais utilizado consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH• (SILVA et al., 2005; CAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005; LEE et al., 2008; GHASEMZADEH; JAAFAR; RAHMAT, 2011), de coloração púrpura que absorve no comprimento de onda a 515. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R•), o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (Figura 10).

A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (%AA) ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional, que corresponde à quantidade de DPPH• consumida pelo antioxidante. A utilização de várias concentrações da amostra é necessária para determinar a quantidade de

antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH• em 50% é denominada concentração eficiente (CE_{50}), também chamada de concentração inibitória (CE_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH• por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

Figura 10 – Estrutura do radical DPPH• e reação de estabilização com um antioxidante.

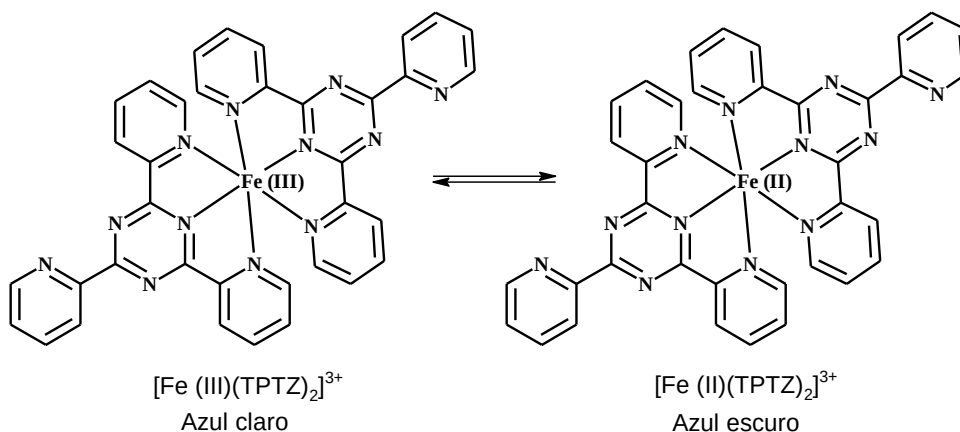


Fonte: Moon; Shibamoto (2009).

2.1.3.3 FRAP

O ensaio do FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) está baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} . Quando isso ocorre na presença de 2,4,6-Tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas, a redução é acompanhada pela formação de um complexo corado (azul intenso) com o Fe^{2+} , com absorção máxima a 593 nm (Figura 11).

Figura 11 - Redução do complexo TPTZ com Fe^{3+}



Fonte: Rufino et al. (2006).

2.2 ESTABILIDADE DE ÓLEOS E GORDURAS

A estabilidade oxidativa constitui o parâmetro global para avaliação da qualidade de óleos e gorduras e dos produtos que os contêm e consiste na resistência a alterações futuras (SMOUSE, 1995; ANTONIASSI, 2001).

Durante todas as fases de obtenção, processamento, distribuição, armazenamento e utilização os óleos e gorduras estão sujeitos a uma série de reações que podem levar a modificações de suas estruturas ocasionando a deterioração. A sua estabilidade à oxidação depende de uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos, incluindo a insaturação de seus ácidos graxos, presença de compostos não glicéridios (fosfolipídios, fitoesteróis, carotenóides, tocoferóis), condições ambientais, uso de antioxidantes, entre outros (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

A presença de ligações duplas na estrutura química dos óleos os tornam suscetíveis a processos oxidativos, causando a degradação dos ácidos graxos essenciais com surgimento de odores e de sabores desagradáveis, entre outras alterações que afetam a qualidade nutricional, a integridade e segurança dos alimentos, devido à formação de compostos tóxicos (RAMALHO; JORGE, 2006; SHAHIDI; ZHONG, 2010), os quais representam para a indústria ou consumidor, uma importante causa de depreciação ou rejeição.

A oxidação é um dos principais parâmetros que afetam a qualidade de óleos e gorduras e pode ocorrer através de diferentes vias como auto-oxidação, foto-oxidação, oxidação térmica, entre outras. A consequência da oxidação dos óleos e gorduras conduz à diminuição na vida útil e tem sido reconhecida como o grande problema na indústria de alimentos (JADHAV, 1996).

Para aumentar a estabilidade de óleos e alimentos gordurosos frente aos processos oxidativos, há necessidade de diminuir a incidência de todos os fatores que os favoreçam. Para isso, é preciso manter os níveis de energia, temperatura e luz, que são responsáveis pelo desencadeamento do processo de formação de radicais livres, remover possíveis traços de metais e fotossensibilizadores no óleo, evitar o contato com oxigênio e inativar enzimas. No entanto, todas essas medidas nem sempre são viáveis e muitas vezes, o caminho mais simples para reduzir a oxidação lipídica em alimentos gordurosos é a adição de antioxidantes (DECKER, 1998).

2.2.1 Oxidação lipídica

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

A oxidação é um fenômeno com implicação direta no valor comercial, valor nutritivo e tempo de vida útil de óleos e gorduras, e consequentemente de todos os produtos que os contêm como alimentos, cosméticos, fármacos, biocombustíveis, entre outros.

Os organismos vivos também sofrem com a oxidação durante o metabolismo aeróbico normal ou por exposição a agentes oxidantes. Os efeitos são destrutivos e tem sido associado à fisiopatologia de numerosas doenças e condições de saúde, incluindo aterosclerose, inflamações, cancro e envelhecimento (FLOYD; HENSLEY, 2002).

Os óleos e gorduras são susceptíveis a reações de oxidação na presença de sistemas catalíticos tais como luz, calor, enzimas, metais, metaloproteínas e micro-organismos, conduzindo a processos complexos de auto-oxidação, oxidação térmica, foto-oxidação e oxidação enzimática, a maioria dos quais envolvem radicais livres e/ou outras espécies reativas como intermediário (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

2.2.1.1 Mecanismos da oxidação

A auto-oxidação é o mais comum de todos os processos e é definido como um fenômeno espontâneo e inevitável dos óleos expostos ao oxigênio atmosférico através de uma reação em cadeia de radicais livres (ORDONÉZ, 2005; SHAHIDI; ZHONG, 2010).

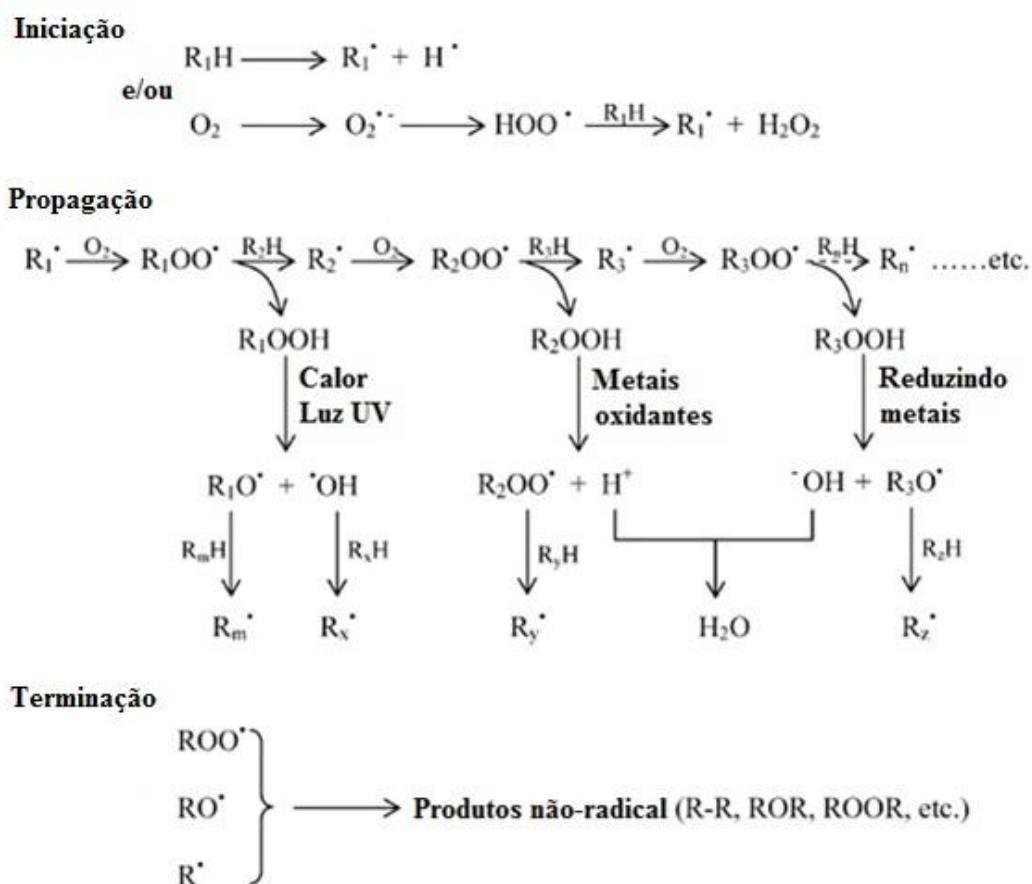
O processo pode ser acelerado em altas temperaturas resultando na oxidação térmica e consequente aumentos em ácidos graxos livres, compostos polares, formação de espuma, alterações na cor e viscosidade dos óleos.

A auto-oxidação dos óleos ocorre através de um mecanismo descrito por três etapas: iniciação, propagação e terminação (DE MAN, 1999; SCHAICH, 2005; SHAHIDI; ZHONG, 2010). A Figura 12 apresenta o esquema simplificado do mecanismo da auto-oxidação.

Segundo Schaich (2005) o processo de iniciação é bastante complexo e ainda não compreendido totalmente, no entanto, acredita-se que moléculas de ácidos graxos insaturados, na presença de sistemas iniciadores ou catalíticos perdem um átomo de hidrogênio e produzem radicais livres. A perda deste átomo de hidrogênio ocorre mais facilmente no carbono próximo a dupla ligação nos ácidos graxos olefínicos, devido à menor energia de

ligação C-H. Estes radicais livres gerados ao reagirem com o oxigênio formam peróxidos, que atuam como transportadores de uma reação em cadeia ao atacar uma nova molécula de ácidos graxos insaturados. Esta reação pode ser repetida inúmeras vezes durante a propagação até que nenhuma fonte de hidrogênio esteja disponível, ou a corrente seja interrompida, por exemplo, pela adição de um antioxidante (DE MAN, 1999).

Figura 12 - Esquema do mecanismo da auto-oxidação.



Fonte: Shahidi; Zhong (2010) com adaptações.

Os ácidos graxos insaturados, particularmente os ácidos oléico, linoléico e linolênico apresentam alta propensão à auto-oxidação, sendo a velocidade da reação aumentada pelo número de insaturações de cada molécula (PÈREZ-GALVES; MIGUÉZ-MOSQUEIRA, 2004).

Shahidi e Zhong (2010) explicam que o hidrogênio *bis*-alílico dos ácidos graxos poli-insaturados - PUFA requer uma menor energia de ativação para dar início à formação de radicais livres, seguido pelo hidrogênio alílico. Enquanto o hidrogênio alquil requer uma energia superior, sugerindo sua sensibilidade atenuada à oxidação.

Deste modo, a oxidação lipídica é um processo de autopropagação e autoaceleração. Contudo, a oxidação normalmente prossegue muito lentamente na fase inicial, até que atinja um aumento repentino após o período de indução. Sendo esta fase muito sensível a pequenas concentrações de componentes, que encurtam o período de indução, como os pró-oxidantes, ou que o prolongam, como os antioxidantes. Os íons metálicos são os mais importantes pró-oxidantes em alimentos, enquanto que os antioxidantes incluem compostos que sequestram os radicais, estimulam a quelação de metais ou agem através de outros mecanismos (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Os radicais lipídicos livres gerados durante a iniciação e propagação são estabilizados por ressonância, o que também leva a deslocar as duplas ligações, ocorrendo isomerização *cis* e *trans* (SHAHIDI; ZHONG, 2010), com predominância da *trans*, por ser mais estável (MCCLEMENTS; DECKER, 2010). Assim, são produzidos dienos e trienos conjugados devido ao rearranjo das ligações duplas interrompidas em PUFA, e são usados como um indicador de oxidação (SHAHIDI; ZHONG, 2005). Durante a propagação, hidroperóxidos lipídicos são produzidos como produtos primários de oxidação (Figura 12). Eles são instáveis e quebram uma vasta gama de produtos secundários da oxidação, incluindo aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos, ácidos orgânicos voláteis e compostos de epoxi, entre outros que são percebidos como *off-flavors*.

Paralelamente, os radicais lipídicos alcóxil ($\text{RO}\cdot$) peróxil ($\text{ROO}\cdot$), hidroxila ($\cdot\text{OH}$) e novos ($\text{R}\cdot$) são gerados a partir da decomposição dos hidroperóxidos, e continuam a participar na reação em cadeia de radicais livres (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) *in vivo*, como radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e hidroperóxila ($\text{ROO}\cdot$), causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas. Os EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolipídios e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno *bis-alílico*, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares (EL-AGAMEY et al., 2004; OMONI; ALUKO, 2005). Existem evidências de que as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e os radicais livres podem estar envolvidos em mais de cinquenta doenças. Já foi comprovado o papel de ambos no desenvolvimento da doença de Parkinson, acidente vascular cerebral, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, catarata e câncer (SHAHIDI, 2000; SHAHIDI; NACKZ, 2003).

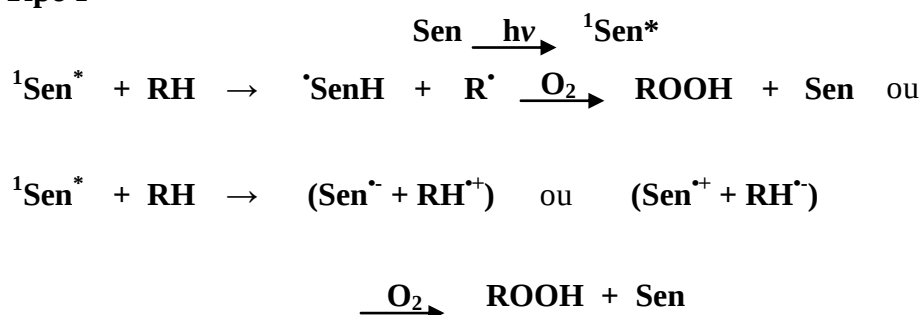
Na fase de terminação da oxidação, os radicais neutralizam-se mutuamente através de acoplamento radical-radical para formar produtos estáveis, como os polímeros. A presença destes nos óleos tem sido usada como indicador da qualidade de óleos de fritura

(MCCLEMENTS; DECKER, 2010). *In vivo*, a formação de polímeros durante a oxidação dos fosfolipídios da membrana podem também causar danos às membranas resultando na perda da função das organelas, podendo levar à morte celular (DOGE, 2002).

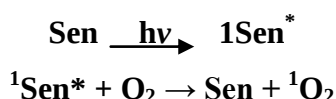
O mecanismo da foto-oxidação de óleos insaturados é induzido essencialmente pela radiação UV na presença de fotossensibilizadores como a clorofila, riboflavina, mioglobina e metais pesados, que são amplamente encontradas na natureza (SHAHIDI; ZHONG, 2010). Ou seja, a luz excita estes sensibilizadores para o estado tripleto, que promove a oxidação pelos mecanismos tipo I, a partir da excitação dos lipídios e tipo II, pela excitação do oxigênio (Figura 13). Ao contrário da auto-oxidação, não existe um período de indução (SCHAICH, 2005).

Figura 13 - Mecanismos da foto-oxidação, tipo I e tipo II

Tipo I



Tipo II



Fonte: Shahidi; Zhong (2010), com modificações

A foto-oxidação do tipo I é caracterizada pela transferência do átomo de hidrogênio ou pela transferência de elétrons entre um sensibilizante tripleto excitado e um substrato, como um ácido graxo poli-insaturado, produzindo radicais livres ou íons de radicais livres, prosseguindo idem ao mecanismo da auto-oxidação. Na foto-oxidação do tipo II ocorre a ativação do oxigênio singlete (${}^1\text{O}_2$), que é um estado animado de oxigênio tripleto (${}^3\text{O}_2$), gerado por meios químicos, fotoquímicos e enzimáticos, bem como por decomposição de hidroperóxidos (MIN; BOFF, 2002). O oxigênio singlete reage diretamente com as ligações duplas por adição, formando hidroperóxidos (Figura13) e que por degradação posterior originam múltiplos produtos intermédios da oxidação, seguindo o mecanismo da auto-

oxidação. É a maior espécie de oxigênio reativo (ROS) e participa do processo de oxidação em uma velocidade de 1500 vezes mais rápido do que o oxigênio tripleto (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Devido à expressiva velocidade das reações, a foto-oxidação é considerada significativa para as alterações de alimentos e de organismos biológicos exposto à luz solar e radiação UV. Os lipossomas e as membranas celulares submetidos à oxidação fotoquímica sofrem com numerosas desordens da pele como foto sensibilidade, foto envelhecimento e foto carcinogênese (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Diversos tecidos vegetais contêm enzimas conhecidas como lipoxigenases (LOXs). A oxidação por via enzimática ocorre pela ação desta enzima que atua sobre os ácidos graxos poli-insaturados (ácido linoleico e linolênico, e seus ésteres), catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada poli-insaturada. O resultado é a formação de peróxidos e hidroperóxidos com duplas ligações conjugadas, os quais podem envolver-se em diferentes reações degradativas, semelhantes às observadas para os processos de auto-oxidação, originando diversos produtos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; MCCLEMENTS; DECKER, 2010).

O processo de catálise enzimática decorre com maior especificidade quando comparado ao processo de auto-oxidação. Observa-se que a enzima lipoxigenase é capaz de cooxidar substratos (carotenóides, tocoferóis, clorofila, proteínas, etc.), sendo responsável pela iniciação de novos processos oxidativos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

2.2.2 Métodos acelerados de avaliação da estabilidade oxidativa

A estabilidade oxidativa é um dos mais importantes indicadores da manutenção da qualidade dos óleos vegetais (TAN; CHE MAN; SELAMAT, 2002) e para se avaliar a estabilidade ou a sua susceptibilidade a oxidação, o óleo ou gordura é submetido ao teste de oxidação acelerada, sob condições padronizadas, em que um ponto final é escolhido, correspondendo ao estado em que se observa sinais de deterioração oxidativa.

Para acelerar as reações de oxidação os testes compreendem elevação de temperatura, adição de metais, aumento da pressão de oxigênio, estocagem sob luz e agitação. Contudo, o aquecimento é o meio mais utilizado e eficiente (ANTONIASSI, 2001).

Com o intuito de prever a vida de prateleira de óleos e gorduras, os métodos acelerados de avaliação da estabilidade oxidativa surgiram como uma alternativa, pois o

acompanhamento das alterações ocorridas em condições normais de armazenamento consome muito tempo, visto que os fenômenos naturais de oxidação são processos lentos e utilizam grande quantidade de reagentes (ANTONIASSI, 2001), tornando inviável o controle de qualidade a nível industrial.

Os métodos disponíveis para verificar a oxidação dos óleos e gorduras comestíveis podem ser classificados em quatro grupos, em função da: absorção de oxigênio, perda de substratos iniciais, formação de hidroperóxidos como produtos da oxidação primária e formação de produtos da oxidação secundária (DOBARGANES; VELASCO, 2002).

As alterações ocorridas na amostra são monitoradas mediante análises do: índice de peróxidos, análise sensorial, determinação de dienos conjugados, valor de carbonila, análise de voláteis, entre outras, servindo como parâmetro para o período de indução que é definido como o tempo necessário para atingir uma mudança na taxa de oxidação ou nível de rancidez detectável (ANTONIASSI, 2001).

O período de indução ou índice de estabilidade oxidativa, obtido pelos métodos acelerados é um parâmetro comparativo muito utilizado e tem se mostrado de grande utilidade para comparar alterações na composição em ácidos graxos, efetuar controle de qualidade de processamento e de matéria-prima, eficiência da adição de antioxidantes, entre outros, proporcionando resultados mais rápidos, reduzindo o trabalho e o consumo de reagentes (ANTONIASSI, 2001).

2.2.2.1 Teste de estufa (Schaal)

Geralmente, o teste mais usado para avaliar a estabilidade dos óleos é o teste em estufa ('Schaal Oven Test') apesar do elevado consumo de reagentes e considerado tempo de análise (ABOU-GHARBIA; SHEHATA; SHAHIDI, 2000; ANGELO; JORGE, 2008; ZHANG et al., 2010; AHN; KIM; KIM, 2012).

No teste acelerado em estufa, as amostras são examinadas em intervalos de tempo regulares, avaliando-se o estado de oxidação do produto pela determinação do índice de peróxidos, índice de acidez, índice de iodo, análise sensorial, determinação de dienos e trienos conjugados, análise de voláteis, entre outros. No entanto, segundo ANTONIASSI (2001) não há uma padronização do ensaio quanto à quantidade de amostra, temperatura e recipientes a serem utilizados, além das diferenças na avaliação sensorial. Por outro lado, o método de estufa simula o menor grau de oxidação da amostra, apresentando correlação com o ensaio de vida útil (FRANKEL, 1993).

2.2.2.2 Rancimat

Os métodos automatizados foram desenvolvidos para acelerar ainda mais os resultados. O mais utilizado é o baseado no aumento da condutividade elétrica e utiliza os instrumentos comercialmente disponíveis, Rancimat da marca Metrohm (Suíça) ou OSI (Oil Stability Instrument) da marca Omniom (EUA) (IQBAL; HILL, 1994; BHANGER, 2007; ANGELO; JORGE, 2008; ARRANZ et al., 2008). É o método oficial para determinar a estabilidade oxidativa, recomendado pela American Oil Chemists' Society (AOCS, 2009) e amplamente utilizado na indústria oleoquímica.

Neste método, a análise baseia-se no registro das variações da condutividade da água deionizada, na qual se faz a coleta dos produtos voláteis oriundos da amostra (ANTONIASSI, 2001), principalmente o ácido fórmico, seguido do ácido acético e capróico (DEMAN et al., 1987). Estes compostos são obtidos após iniciação forçada da oxidação sob temperatura de 110 °C, sendo arrastados pelo fluxo de ar que passa através do óleo. Uma curva de condutividade elétrica ($\mu\text{s.cm}^{-1}$) em função do tempo (h) é gerada automaticamente pelo software que acompanha o equipamento. As projeções de retas passando pela linha de base e pela tangente, a partir do ponto de inflexão da curva se interceptam num ponto que corresponde na escala de tempo ao período de indução (ANTONIASSI, 2001).

Apesar das vantagens apresentadas pelo equipamento Rancimat, como a redução de tempo e consumo de reagentes, a limpeza da vidraria tem sido relatada como fator crítico para reprodutibilidade dos resultados. Para o equipamento OSI este ponto é positivo, pois faz uso de vidraria descartável (AKOH, 1994), porém compromete o custo da análise.

A determinação da estabilidade oxidativa pelo método de condutividade elétrica também foi adotado como oficial pela Japan Oil Chemists' Society. Apesar da padronização das condições pelos métodos oficiais, a maior parte dos resultados existentes na literatura não são comparativos devido à diversidade de condições utilizadas (ANTONIASSI, 2001).

2.2.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial Pressurizada – PDSC

A calorimetria exploratória diferencial pressurizada - PDSC é uma análise que mede a liberação de energia da reação de oxidação ao invés de qualquer produto químico específico de oxidação. É uma análise realizada diretamente na amostra usando um fluxo de calor

diferencial entre a amostra e o termopar de referência sob variação de temperatura e pressão (LEVY, 1970; DUNN, 2006).

A técnica PDSC tem a vantagem sobre o Rancimat por ser mais rápida e conter a pressão como uma variável a mais, possibilitando a execução do ensaio em temperaturas baixas e com pouca quantidade da amostra, além de alta reprodutibilidade e versatilidade, podendo ser aplicada a óleos de alta e baixa estabilidade oxidativa (KODALI, 2005).

A curva PDSC registra o fluxo de calor ($\text{mW} \cdot \text{mg}^{-1}$) em função do tempo (min) ou da temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Transições endotérmicas ou exotérmicas são caracterizadas como picos e sua área é proporcional à entalpia (ΔH), expressa em Joule por grama ($\text{J} \cdot \text{g}^{-1}$). As curvas PDSC não isotérmicas são úteis para analisar o perfil termodinâmico de uma amostra, ou seja, a temperatura de oxidação OOT (*Oxidation Onset Temperature*), enquanto a análise isotérmica determinar o tempo de indução oxidativa (do inglês, OIT - *Oxidative Induction Time*) (KODALI, 2005; MOTHÉ; AZEVEDO, 2009).

O tempo de indução oxidativa (OIT) obtido por esta técnica representa o tempo para a ocorrência de um pico exotérmico, característico da reação de oxidação, quando a amostra é submetida a uma pressão elevada de oxigênio a uma temperatura específica.

2.2.2.4 PetroOXY

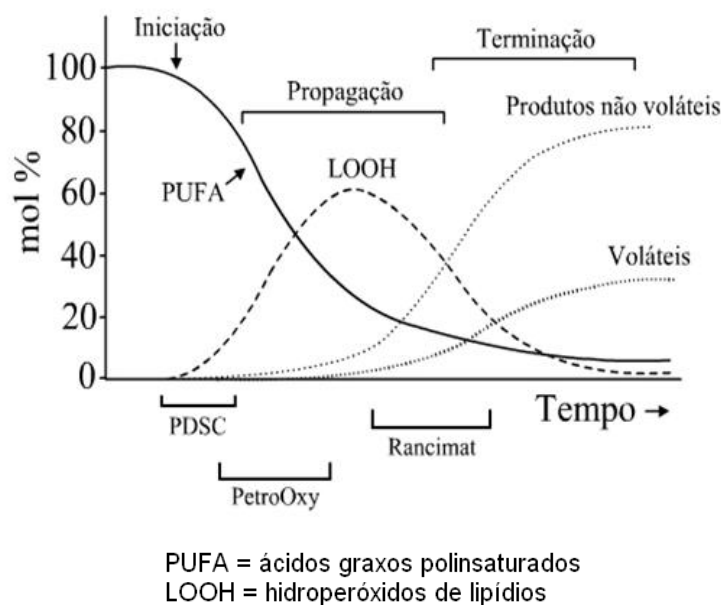
O PetroOXY é um método alternativo para avaliar a resistência a oxidação de óleos e gorduras. Foi recentemente desenvolvido para determinar a estabilidade oxidativa de biodiesel e suas blends (ASTM D 7545, 2012; ARAÚJO et al., 2009). O PetroOXY vem se destacando na pesquisa pois executa o ensaio em tempo reduzido, sendo de fácil manuseio e rápida limpeza, além de proporcionar uma boa reprodutibilidade. Possui uma pequena câmara de ensaio, hermeticamente fechada, onde uma amostra de 5 mL é aquecida em conjunto com oxigênio. A partir deste passo inicia um rápido processo de envelhecimento artificial da amostra, onde é observada uma queda de pressão no sistema. O consumo de tempo para a queda de pressão é diretamente relacionada com a estabilidade à oxidação e o resultado é expresso em período de indução, em horas (NEUMANN; JEBENS; WIEMBICKI, 2008).

Ao contrário do Rancimat, os resultados do método PetroOXY incluem todos os voláteis e produtos de oxidação não volátil, proporcionando assim uma análise completa de estabilidade da amostra oxidada (NEUMANN; JEBENS; WIEMBICKI, 2008).

O PDSC, juntamente com Rancimat e PetroOXY forma um conjunto de métodos acelerados que têm por finalidade estimar a vida de prateleira de óleos e gorduras. Cada

método acelerado determina estágios diferenciados da auto-oxidação. A Figura 14 apresenta um comparativo dos estágios de oxidação avaliados pelos métodos acelerados PetroOXY, Rancimat e PDSC.

Figura 14 - Comparação entre os estágios de oxidação e os métodos acelerados de avaliação da estabilidade oxidativa



Fonte: Gardner (1987), com adaptações

O gráfico apresenta um comportamento semelhante no início da curva para as técnicas PetroOXY e PDSC. Esta etapa é relativa às reações de formação de peróxidos, que levam ao pico exotérmico no PDSC, e ao consumo de oxigênio observado no PetroOXY. No método Rancimat, esta etapa mostra um valor menor de PI, pois a técnica é direcionada a determinar os produtos voláteis da oxidação, que ocorrem a partir da fase da propagação.

Alguns autores tentam estabelecer correlação entre os métodos de avaliação da estabilidade oxidativa, porém observa-se que há uma necessidade de padronização de metodologias e de condições operacionais.

Como o processo oxidativo é um fenômeno muito complexo com geração de diversos produtos finais, o grau de oxidação deve ser determinado em diferentes estados de desenvolvimento do processo oxidativo. Cada método fornece informações complementares sobre um estado particular do processo oxidativo, variável em função das condições aplicadas e dos substratos lipídicos usados, dos produtos primários e secundários gerados (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

O uso de dois ou mais métodos de avaliação de produtos de oxidação primária e secundária é altamente recomendado, pois cada método apresenta vantagens e desvantagens. Porém, nenhum método se correlaciona de um modo perfeito com as modificações sensoriais produzidas no decurso das reações de oxidação (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

2.3 ESTABILIDADE TÉRMICA POR TERMOGRAVIMETRIA - TG

A estabilidade térmica de um óleo, fármaco, antioxidante ou uma amostra qualquer é definida como a capacidade da substância em manter suas propriedades, durante o processamento térmico, o mais próximo possível de suas características iniciais.

A análise Termogravimétrica - TG é uma técnica analítica usada para determinar a estabilidade térmica de um material e sua fração de componentes voláteis através do monitoramento da mudança de massa que ocorre quando este é aquecido. A variação da massa é registrada em função do aumento da temperatura e sua derivada (DTG) mostra a mudança de declividade na curva original, indicativo das diferentes etapas no processo de decomposição térmica (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009).

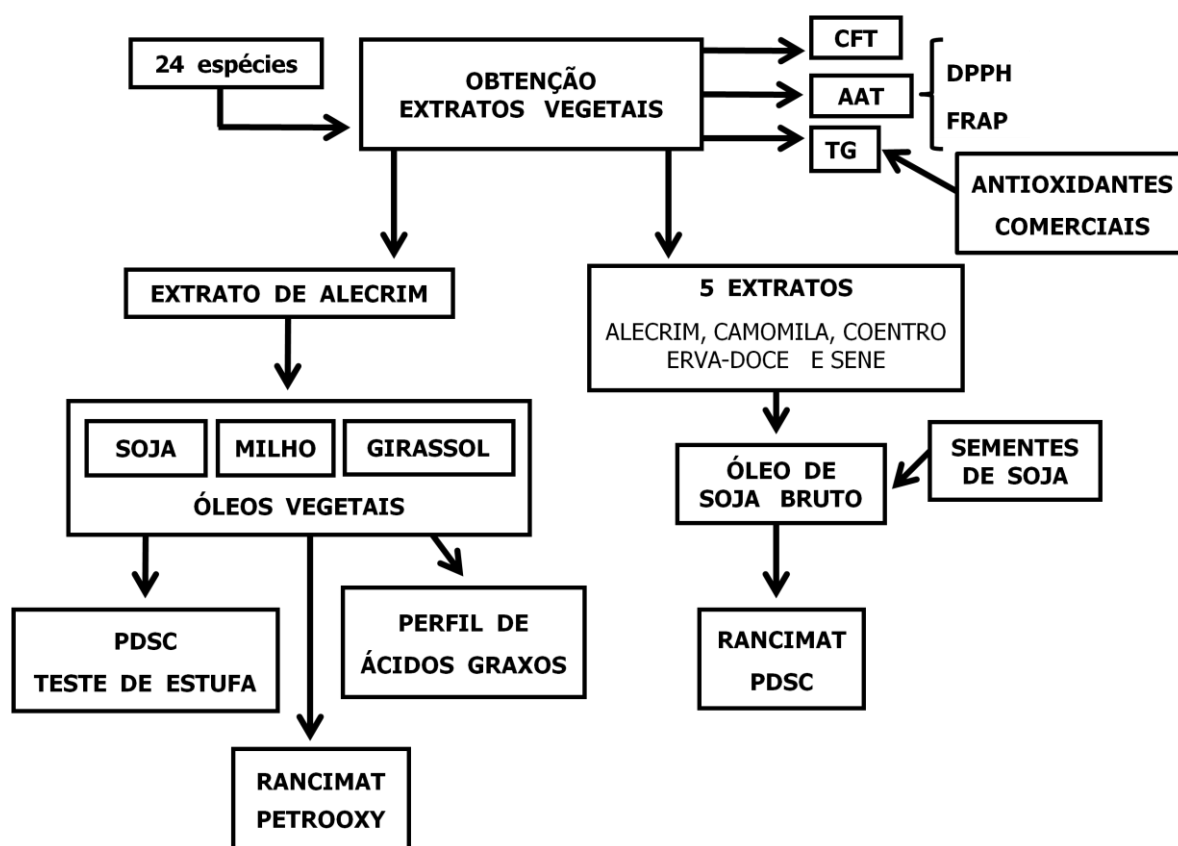
Esta técnica baseia-se no estudo da variação de massa de uma amostra, resultante de uma transformação física (sublimação, evaporação, condensação) ou química (degradação, decomposição, oxidação) em função do tempo ou da temperatura (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009). E têm sido usada para caracterizar matrizes oleosas (DINIZ et al., 2008; NETO et al., 2009) com intuito de investigar estabilidade térmica (FARIA et al., 2002; FONSECA; YOSHIDA, 2009), cinética da decomposição (SANTOS et al., 2002), efeitos de antioxidantes (VAN AARDT et al., 2004; ARORA; BAGORIA; KUMAR, 2010), adulterações de produtos (TORRECILLA et al., 2011), assim como também, caracterizar e determinar a estabilidade térmica, cinética de degradação e pureza de fármacos (BAZZO; SILVA, 2005; RODRIGUEZ et al., 2005) e substâncias antioxidantes (SANTOS et al., 2012), entre outras aplicações.

A curva DTA obtida mostra mudanças na amostra tais como fusão, solidificação e cristalização registradas sob a forma de picos, sendo a variação na capacidade calorífica da amostra notada como um deslocamento da linha de base. O uso principal da curva DTA é detectar a temperatura inicial dos processos térmicos e caracterizá-los qualitativamente como endotérmicos e/ou exotérmicos, reversíveis e/ou irreversíveis ou transições de primeira e/ou de segunda ordem (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os procedimentos e ensaios foram realizados no Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM), do Departamento de Química, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba (LACOM/DQ/CCEN/UFPB). O Fluxograma 1, apresenta as etapas das análises realizadas neste estudo.

Fluxograma 1- Etapas de realização das análises



3.1 REAGENTES

Os padrões de ácido ascórbico, ácido gálico, os antioxidantes sintéticos TBHQ (*terc*-butil-hidroquinona), BHT (butil-hidroxitolueno), BHA (butil-hidroxianisol), PG (propil galato), ácido caféico, ácido ferúlico, α -tocoferol e os reagentes TPTZ (92,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina), DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e TROLOX (ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os reagentes Folin-Ciocateau e heptadecanoato de metila foram da marca Merck e a água ultrapura do equipamento Purelab (Elga). Os reagentes cloreto de ferro hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), acetato de sódio trihidratado, carbonato de sódio e ácido gálico

foram adquiridos na Vetec Química Fina Ltda. Ácido cítrico foi obtido da cargil. Os gases (oxigênio, ar sintético e hélio) utilizados foram adquiridos da White Martins, Brasil (99,8% de pureza). EDTA e os demais reagentes e solventes, de grau analítico, obtidos da marca FMAIA (Brasil).

3.2 ÓLEOS VEGETAIS

As sementes de soja (*Glycine max*) e os óleos refinados de soja, milho (*Zea mays*) e girassol (*Helianthus annuus*) foram adquiridas no comércio de João Pessoa/PB. Segundo as especificações do fabricante as amostras de óleos refinados eram isentas de antioxidantes.

3.2.1 Obtenção do óleo de soja *in natura*

As sementes de soja foram prensadas mecanicamente a frio, com pressão máxima de aproximadamente 30 toneladas. O óleo bruto obtido foi filtrado a vácuo, acondicionado em recipientes de vidro âmbar, na presença do gás Nitrogênio no *head-space*, sob temperatura de ± 10 °C até o momento de sua utilização.

3.3 EXTRATOS VEGETAIS

Para obtenção dos extratos foram adquiridos 24 vegetais secos, em dois distintos comércios:

Em Manaus/AM foram adquiridas as cascas do barbatimão (*Stryphnodendron barbatimam* Mart.), as folhas do chapéu de couro (*Echinodorus grandiflorus* Mitch.), as vagens do jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart. Ex Tul.), o pó de guaraná (*Paullinia cupana* Kunth), as cascas do pau D'arco (*Tabebuia serratifolia* (Vahl) Nich.) e as cascas do tronco e das raízes da unha de gato (*Uncaria tomentosa*).

Em João Pessoa foram adquiridos os estigmas das flores, em pó, de açafrão (*Curcuma longa* L), as folhas de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), as folhas de boldo (*Plectranthus* Sp), as folhas e brotos de chá branco (*Camellia sinensis* (L.) Kutntze), as folhas de chá mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire), as folhas (jovens) do chá verde (*Camellia sinensis* (L.) Kutntze), as folhas (fermentadas) de chá preto (*Camellia sinensis* (L.) Kutntze), as flores de camomila (*Camomila recutita*), a casca, em pó, da canela (*Cinnamomum zeylanicum*), as folhas e hastes da carqueja (*Baccharis trimera* (Less.) DC), as folhas de erva-

cidreira (*Melissa officinalis*), as sementes de coentro (*Coriandrum sativum* L.), o botão floral do cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*), as folhas e sementes de erva-doce (*Foeniculum vulgare* (Mill.) Gaertn), as folhas de manjerona (*Origanum majorana* L.), as folhas de manjeriço (*Ocimum basilicum*), as folhas de orégano (*Origanum vulgare* l. ssp Virens) e as folhas de sene (*Cassia angustifolia*).

3.3.1 Obtenção dos extratos antioxidantes

Para obtenção dos extratos antioxidantes, os vegetais foram triturados e acondicionados, separadamente, em recipientes de vidro com tampa, imersos em etanol e agitados diariamente, permanecendo em temperatura ambiente por 15 (quinze) dias. Após este período seguiu-se de processo de filtração para remoção do material vegetal utilizando-se bomba a vácuo, ficando apenas o extrato, que a seguir foi concentrado em rotaevaporador sob pressão reduzida. Os extratos foram acondicionados em recipientes de vidro, protegidos com filme plástico e perfurados para eliminação do solvente remanescente. Após 24 horas, os extratos concentrados foram armazenados, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente até o momento de sua utilização. Cada extrato foi preparado na concentração de 1mg.mL^{-1} em etanol.

3.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS

A análise dos teores de fenólicos totais dos extratos vegetais foi realizada, em triplicata, pelo método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (ROSSI; SINGLETON, 1965), com modificações. Inicialmente, uma alíquota (alecrim, canela e orégano 30 μL , cravo 15 μL e demais extratos 50 μL) de cada extrato etanólico foi transferida para tubos de ensaio, os quais foram adicionados 60 μL do reagente Folin-Ciocalteu juntamente com uma alíquota de água destilada e agitada por 60 segundos. Em seguida foi adicionado uma solução de Na_2CO_3 a 15% e agitada novamente por mais 30 segundos. A mistura reacional foi deixada em repouso, 30 minutos, à temperatura de 45 °C, na ausência de luz. A leitura da absorbância a 760 nm foi registrada empregando-se um espectrofotômetro UV-vis da Shimadzu, modelo UV-2550. Uma curva padrão com ácido gálico (de 2,5 a 25 mg.L^{-1}) foi obtida nas mesmas condições. Os resultados foram expressos em mg de EAG (equivalente de ácido gálico) por g do extrato (mg EAG.g^{-1}).

3.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.5.1 Método de sequestro de radicais livres DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

A atividade antioxidante foi determinada através da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras em sequestrar o radical estável DPPH•, de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações de Silva et al. (2006). A partir de triagem preliminar quantidades apropriadas da solução de DPPH• ($23,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em EtOH) foram adicionadas às amostras do extrato afim de obter concentrações finais que variaram de 2,5 a $120,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em triplicata, alíquotas da amostra (1 mg.mL^{-1}) foram misturadas com etanol e $2.700 \mu\text{L}$ da solução de DPPH• ($23,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em EtOH). Após 30 minutos foi efetuada a leitura a 517 nm, em espectrofotômetro UV-vis da Shimadzu, modelo UV-2550. Uma curva controle utilizando ácido ascórbico foi preparada ($0,5$ a $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Os resultados foram expressos através da determinação da %AAT atividade antioxidante total (equação 1) e do valor da CE_{50} .

$$\%AAT = 100 \times \left(\frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right) \quad (1)$$

Onde $\text{Abs}_{\text{controle}}$ é a absorbância da solução etanólica do radical DPPH• e $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorbância do radical na presença do extrato ou do padrão ácido ascórbico.

Com os valores obtidos foi construído um gráfico %AAT *versus* concentração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O cálculo do CE_{50} foi obtido a partir da equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH•.

3.5.2 Método de redução do ferro – FRAP

O ensaio do FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*, em português significa Poder do Antioxidante em Reduzir o Ferro) é baseado na capacidade de um antioxidante em reduzir o Fe^{3+} para Fe^{2+} . Seguindo a metodologia de Benzie e Strain (1996), com algumas modificações, preparou-se a solução do reagente FRAP, combinando-se 25 mL de tampão acetato 0,3 M, uma alíquota de 2,5 mL da solução TPTZ a 10 mM e 2,5 mL de solução aquosa de cloreto férrico 20 mM. A partir das soluções dos extratos vegetais (1 mg.mL^{-1})

preparou-se em tubos de ensaio, três diluições diferentes, em triplicata, cada uma. Em ambiente escuro, adicionou-se 90 μL de amostra (diferentes diluições) em cada tubo e acrescentou-se 270 μL de água destilada. Em seguida adicionou-se 2,7 mL do reagente FRAP. Após homogenização, os tubos foram mantidos em banho-maria a 37 °C. O espectrofotômetro foi calibrado com o reagente FRAP e as leituras da absorbância foram realizadas após 30 minutos da mistura, em 595 nm. Uma curva controle utilizando sulfato ferroso foi preparada (500 a 2000 μM).

A partir da equação da reta do gráfico concentração (mg.L^{-1}) *versus* absorbância, (X vs Y) pode-se calcular a AAT, substituindo na equação da reta a absorbância equivalente a 1.000 μM do padrão sulfato ferroso. O valor obtido para o termo X corresponde à diluição da amostra (mg.L^{-1}) equivalente a 1.000 μM de sulfato ferroso. O resultado foi expresso em $\mu\text{mol sulfato ferroso.g}^{-1}$ de extrato.

3.6 PERFIL TÉRMICO DOS EXTRATOS VEGETAIS

As curvas termogravimétricas (TG/DTA) dos extratos vegetais foram obtidas em um analisador térmico simultâneo TG-DTA (marca Shimadzu, modelo DTG-60H) em atmosfera de ar sintético, com fluxo de 50 mL.min^{-1} , razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$, até 1000 $^{\circ}\text{C}$, utilizando cadinho de alumina e massa de aproximadamente 10 mg.

Os testes não-isotérmicos foram conduzidos usando cerca de 10 mg de amostra em um cadinho de alumina, em atmosfera de ar sintético com fluxo de 50 mL.min^{-1} , na razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ de 25-1000 $^{\circ}\text{C}$. Para os testes isotérmicos foram mantidas as mesmas condições de atmosfera e quantidade de amostra. Para o aquecimento seguiu uma programação de aquecimento inicial de 10 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$, mantida até que a temperatura atinja os 100 $^{\circ}\text{C}$, seguida por uma velocidade de 2 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$, até atingir 110 $^{\circ}\text{C}$.

3.7 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DOS ÓLEOS COMESTÍVEIS

3.7.1 Índice de acidez

Na determinação do índice de acidez foi utilizado o método NBR 11115 da ABNT (1998). Mediu-se 5 g de óleo em um erlenmeyer e adicionou-se 25 mL de etanol para

solubilização. Em seguida, foram adicionadas 2 gotas do indicador fenolftaleína e titulou-se com uma solução de KOH 0,1 mol L⁻¹, até atingir a coloração rósea. Uma prova em branco foi realizada nas mesmas condições descritas, sem a presença da amostra. O índice de acidez (IA) foi calculado de acordo com a Equação 2.

$$IA = \frac{(V_A - V_B) \times M \times 56,1}{P \text{ da amostra (g)}} \quad (2)$$

Em que: IA é o índice de acidez; M é a concentração da solução de KOH (mol L⁻¹); V_A é o volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_B é o volume de KOH gasto na titulação do branco (mL); P a massa da amostra (g) e 56,1 é a massa molecular de KOH.

3.7.2 Índice de iodo

Na determinação do índice de iodo foi utilizada a solução de Wijis de acordo com o método Cd 1-25 da AOCS (2009). 0,25 g de cada óleo foram medidos em erlenmeyer de 500 mL, seguido da adição de 10 mL de cicloexano. Adicionou-se 25 mL de solução de Wijs e, com o erlenmeyer fechado, agitou-se cuidadosamente com movimento de rotação para homogeneizar. Deixou-se em repouso ao abrigo da luz e à temperatura ambiente por 30 minutos. Adicionou-se 10 mL iodeto de potássio a 15% e 100 mL de água recentemente fervida e fria. Titulou-se com tiosulfato de sódio 0,1 mol.L⁻¹ até o desaparecimento da coloração escura. Adicionou-se 1 mL de solução indicadora de amido 1 % e continuou a titulação até o completo desaparecimento da cor cinza. Uma prova em branco foi realizada nas mesmas condições descritas, sem a presença da amostra. O índice de iodo foi calculado de acordo com a Equação 3.

$$II = \frac{(V_B - V_A) \text{ mL} \times M \text{ do Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}{P \text{ da amostra (g)}} \times 12,69 \quad (3)$$

Em que: V_B é o volume gasto na titulação do branco (mL); V_A é o volume gasto na titulação da amostra (mL); P é a massa da amostra (g); M é a concentração da solução de Na₂S₂O₃ (mol.L⁻¹) e 12,69 é o fator de correção.

3.7.3 Índice de peróxido

O índice de peróxido foi determinado pelo método Cd 8-53 da AOCS (2009). No procedimento foram dissolvidas 5 g das amostras de óleo em 30 mL de uma solução de ácido acético-clorofórmio (3:2 v/v), seguida da adição de 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio. A mistura foi deixada em repouso por exatamente um minuto e em seguida foram adicionados 30 mL de água recém fervida e 0,5 mL de solução de amido a 1 %. O iodo liberado foi titulado com solução de tiossulfato de sódio 0,01 N, até o clareamento total da solução. Uma prova em branco foi realizada nas mesmas condições descritas, sem a presença da amostra. Os cálculos foram feitos a partir da Equação 4:

$$IP = \frac{N \times (V_A - V_B) \times 1000}{P \text{ da amostra (g)}} \quad (4)$$

Em que: N é a normalidade da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$; V_A é o volume da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido pela amostra (mL); V_B é o volume da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumido pelo branco (mL) e P = massa da amostra (g).

3.8 PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS VEGETAIS

Os óleos refinados de soja, milho e girassol foram transesterificados com metanol seguindo método padrão 2.301 da IUPAC (1987).

As amostras de ésteres contendo padrão interno (heptadecanoato de metila, $c=5,0 \text{ mg.mL}^{-1}$) foram injetadas em triplicatas. Os ésteres foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a um espectrometro de massa (CG/EM) equipado com injetor *split*, modelo GCMS-QP2010 da marca Shimadzu, com amostrador automático; foi utilizada a coluna capilar Durabond – DB-23 (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) da J&W Scientific, fase estacionária de alta polaridade. O gás de arraste utilizado foi o hélio com vazão de 3 mL min^{-1} e volume de injeção de 1 μL com razão de *split* 1:37. A temperatura do detector MS foi de $230 \text{ }^\circ\text{C}$. A temperatura da coluna foi programada de 130 a $230 \text{ }^\circ\text{C}$ com taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$ até $200 \text{ }^\circ\text{C}$, mantida por 1 min, e em seguida aquecida até $230 \text{ }^\circ\text{C}$ com taxa de aquecimento de $3 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$.

A caracterização dos perfis dos ésteres foi feita por comparação do espectro de massa com os padrões existentes na biblioteca do software (Mass Spectral Database NIST/EPA/NIH).

3.9 MÉTODOS ACELERADOS DE AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA

3.9.1 Método Rancimat

Os ensaios de estabilidade oxidativa foram realizados em duplicata no equipamento 873 Biodiesel Rancimat da marca Metrohm utilizando a metodologia da AOCS Cd 12b-92 (2009). Neste método, 2 g da amostra são envelhecidas a 110 °C, sob fluxo constante de ar (10 L.h⁻¹). O resultado é expresso como período de indução (PI), determinado automaticamente a partir do ponto de inflexão da curva, pelo programa que acompanha o equipamento.

3.9.2 Calorimetria exploratória diferencial pressurizada – PDSC

As curvas PDSC das amostras foram obtidas em um calorímetro exploratório diferencial pressurizado acoplado a uma célula de pressão da TA Instruments, modelo DSC Q1000. Foram feitas análises nos modos: dinâmico e isotérmico. No modo dinâmico foi utilizado cadinho de platina e aproximadamente 10 mg da amostra, sob atmosfera de oxigênio com pressão inicial de 203 psi (aprox. 1400 kPa) e razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, no intervalo de temperatura de 25 a 600 °C. No modo isotérmico (110 °C) foram mantidas as mesmas condições de atmosfera, pressão e quantidade de amostra. Os valores são expressos em OOT, temperatura de oxidação, no modo dinâmico e HPOIT, tempo de indução oxidativa, no modo isotérmico.

3.9.3 PetroOXY

O equipamento PetroOXY, fabricado pela Petrotect é utilizado para determinação do período de indução de biodiesel. A similaridade entre óleos e biodiesel permite que este equipamento também possa ser empregado na avaliação da estabilidade oxidativa de óleos.

No procedimento foi utilizado um volume de aproximadamente 5 mL da amostra, sob pressão de oxigênio a 700 kPa, com a temperatura de 110 °C. Os ensaios foram realizados em duplicata e o resultado expresso em período de indução (h).

3.9.4 Teste de estufa (Schaal)

Os óleos de girassol, milho e soja foram submetidos ao teste de estufa durante o período de 29 dias na temperatura de 60 ± 5 °C, seguindo metodologia descrita por Hill (1994) com algumas modificações. O teste foi realizado utilizando-se recipientes de vidro contendo 35 mL de amostra, em duplicada. As amostras de óleo sem aditivos e com extrato vegetal na concentração de 2.000 mg.kg^{-1} , e TBHQ na concentração de 100 mg.kg^{-1} foram retirados nos intervalos de tempo 0, 7, 14, 21 e 28 dias.

As amostras foram devidamente codificadas e arrumadas na estufa conforme ordem de retirada, o que se deu a cada 7 (sete) dias. O acompanhamento do estado de oxidação das amostras foi avaliado pela determinação do índice de acidez, índice de peróxidos, índice de iodo, conforme item 3.7 e a determinação de dienos e trienos conjugados, por espectroscopia na região do ultravioleta-visível.

As medidas de absorbância na região de 190 a 400 nm foram obtidas empregando-se um espectrofotômetro UV-vis Shimadzu, modelo UV-2550, utilizando cela de quartzo com 1 cm de caminho óptico. As soluções de óleo foram preparadas em Isooctano na concentração de 1 mg.mL^{-1} .

3.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão. Para análise estatística dos resultados, utilizou-se análise de variância (ANOVA), o teste de Tukey para identificar diferenças significativas entre as médias ($p > 0.50$) e a correlação de Pearson ($p\text{-valor} < 0,05$). Os dados foram tratados no Programa Action 2.4 (ESTATCAMP, 2012).

REFERÊNCIAS

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Substâncias Graxas - Determinação do Índice de Acidez. **Método NBR 11115**, 1998.
- ABOU-GHARBIA, H. A.; SHEHATA, A. A. Y.; SHAHIDI, F. Effect of processing on oxidative stability and lipid classes of sesame oil. **Food Research International**, v.33, p.331-340, 2000.
- AHN, J.-H.; KIM, Y.-P.; KIM, H.-S. Effect of natural antioxidants on the lipid oxidation of microencapsulated seed oil. **Food Control**, v.23, p.528-534, 2012.
- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n.3, p.10-15, 2001.
- AKOH, C. Oxidative stability of fat substitutes and vegetable oils by the oxidative stability index method. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.71, n.2, p.211-216, 1994.
- AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. A. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoids as an alternative against hypovitaminosis A. **Revista de Nutrição**, v.19, n.2, p.233-243, 2006.
- ANDRÉ, C.; CASTANHEIRA, I.; CRUZ, J. M.; PASEIRO, P.; SANCHES-SILVA, A. Analytical strategies to evaluate antioxidants in food: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v.21, p.229-246, 2010.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Avaliação do óleo de girassol adicionado de antioxidantes sob estocagem. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n. 2, p.498-502, 2008.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.1, p.232-240, 2007.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Efeito antioxidante do extrato de coentro e do palmitato de ascorbila na estabilidade oxidativa do óleo de girassol. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.67, n.1, p.34-38, 2008.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v.127, p.183-198, 2002.
- ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v.19, n.2, p.353-380, 2001.
- AOCS, Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society: Fats, Oils and Lipid Related Analytical Methods. Champaign, USA, 6ed. AOCS Press, 2009.
- ARAÚJO, S. V.; LUNA, F. M. T.; ROLA JR, E. M.; AZEVEDO, D. C. S.; CAVALCANTE JR, C. L. A Rapid Method for Evaluation of the Oxidation Stability of Castor Oil FAME: Influence of Antioxidant Type and Concentration. **Fuel Processing Technology**. v.90, p.1272–1277, 2009.
- ARORA, S.; BAGORIA, R.; KUMAR, M. Effect of alpha-Tocopherol (Vitamin E) on the Thermal Degradation Behavior of Edible Oils. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.102, p.375-381, 2010.

ARRANZ, S.; CERT, R.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; CERT, A.; SAURA-CALIXTO, F. Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. **Food Chemistry**, v.110, p.985–990, 2008.

ASTM. American Society for Testing and Materials. Standard Test Method for Oxidation Stability of Middle Distillate Fuels-Rapid Small Scale Oxidation Test (RSSOT). **ASTM D7545-09**. West Conshohocken, PA, USA. 1996-2012.

AZAM, M. M.; WARIS, A.; NAHAR, N. M. Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. **Biomass & Bioenergy**, v.29, p.293-302, 2005.

BAZZO, G. C.; SILVA, M. A. S. Estudo termoanalítico de comprimidos revestidos contendo captopril através de termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.3, 2005.

BENNETT, R.N.; WALLSGROVE, R.M. Secondary metabolites in plant defence mechanisms. **New Phytologist**, v.127, n.44, p.617-633, 1994.

BENZIE, I. 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.

BOTTERWECK, A. A.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHN, R. A.; KLEINJANS, J.; VAN DEN BRANDT, P. A. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, n.7, p.599-605, 2000.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Res. N° 482/1999. Disponível: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/04_cns.pdf. Acesso: 16/05/2012.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v.74, p.2157-2184, 2004.

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.

CARLSSON, A. S. Plant oils as feedstock alternatives to petroleum – A short survey of potential oil crop platforms. **Biochimie**, v.91, p.665-670, 2009.

CHEYNIER, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, p.223S-229S, 2005.

CONTE, A.; PELLEGRINI, S.; TAGLIAZUCCHI, D. Effect of resveratrol and catechin on PC12 tyrosine kinase activities and their synergistic protection from beta-amyloid toxicity. **Drugs Under Experimental and Clinical Research**, v. 9, n.5-6, p. 243-55, 2003.

CROFT, K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals of the New York Academy of Science**, v.854, p.435-442, 1998.

CURIN, Y.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. **Pharmacological Reports**, v.57, p.97–107, 2005.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v.30, n.1, p.99-105, 2007.

DECKER, E. A. Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of food to maximize oxidative stability. **Trends in Food Science and Technology**, v.9, p.241-248, 1998.

DEMAN, J. M. **Principles of Food Chemistry**. Maryland, Editora Aspen, 1999.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 2 ed. England: John Wiley & Sons. 515 p. 2002.

DINIZ, Z. N.; BORA, P. S.; NETO, V. Q.; CAVALHEIRO, J. M. O. *Sterculia striata* Seed Kernel Oil: Characterization and Thermal Stability. **Grasas y Aceites**. v.59, p.160-165, 2008.

DIXON, R.A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v.411, p.843-847, 2001.

DOBARGANES, M. C.; VELASCO, J. Analysis of lipid hydroperoxides. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.104, p.420–428, 2002.

DOGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v.82, n.1, p.47-95, 2002.

DUNN, R. O. Oxidative stability of biodiesel by dynamic mode pressurized–differential scanning calorimetry (PDSC). **American Society of Agricultural and Biological Engineers**, v.49, n.5, p.1633-1641, 2006.

EL-AGAMEY, A.; LOWE, G. M.; MCGARVEY, D. J.; MORTENSEN, A.; PHILLIP, D. M.; TRUSCOTT, T. M.; YOUNG, A. J. Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.430, p.37-48, 2004.

ESTATCAMP. Action. Versão 2.4. Licença Pública geral. São Carlos: Estatcamp, 2012. Online at: <http://www.portalaction.com.br/>. Accessed 06.18.12

FAIRFIELD, K. M.; FLETCHER, R. H. Vitamins for chronic disease prevention in adults. **Journal of the American Medical Informatics Association**, v.287, n.23, p.3116-3126, 2002.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.18, n.1, p.23-36, 2006.

FARIA, E. A.; LELES, M. I. G.; IONASHIRO, M.; ZUPPA, T. O.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Estudo da Estabilidade Térmica de Óleos e Gorduras Vegetais por TG/DTG e DTA. **Eclética Química**, v.27, p.111-119, 2002.

FLOYD, R. A.; HENSLEY, K. Oxidative stress in brain aging. Implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. **Neurobiology of Aging**, v.23, n.5, p.795-807, 2002.

FONSECA, M. M.; YOSHIDA, M. I. Análise térmica do óleo de linhaça natural e oxidado. **Vértices**. v.11, p.61-75, 2009.

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

FU, L.; XU, B.T.; XU, X.R.; GAN, R.Y.; ZHANG, Y.; XIA, E.Q.; LI, H.B. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chemistry**, v.129, p.345-350, 2011.

GERMAN, J. B. Food processing and lipid oxidation. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 459, p. 23-50, 1999.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z. E.; RAHMAT, A. Effects of solvent type on phenolics and flavonoids content and antioxidant activities in two varieties of young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.7, p. 1147-1154, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n.2, p.374-381, 2007.

GULCIN, I.; SAT, I. G.; BEYDEMIR, S.; ELMASTAS, M.; KUFREVIOGLU, O. I. Comparison of antioxidant activity of clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) buds and lavender (*LaVandula stoechas* L.). **Food Chemistry**, v.87, p.393-400, 2004.

GUO, L.; XIE, M. Y.; YAN, A. P.; WAN, Y. Q.; WU, Y. M. Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC–MS. **Analitical and Bioanalitical Chemistry**, v. 386, p. 1881-1887, 2006.

HALLIWELL, B. Antioxidants and humam disease: a general introduction. **Nutrition Reviews**, v.55, n.1/2, p.44-52,1997.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, n. 10, p.572–584, 2002.

HERTOG, M. G.; KROMHOUT, D.; ARAVANIS, C.; BLACKBURN, H.; BUZINA, R.; FIDANZA, F.; GIAMPAOLI, S.; JANSEN, A.; MENOTTI, A.; NEDELJKOVIC, S.; et al. Flavonoid intake and longterm risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries study. **Archives of Internal Medicine**, v.155, n. 4, p.381-386, 1995.

HERVERT-HERNÁNDEZ, D.; GARCÍA, O. P.; ROSADO, J. L.; GOÑI, I. The contribution of fruits and vegetables to dietary intake of polyphenols and antioxidant capacity in a Mexican rural diet: Importance of fruit and vegetable variety. **Food Research International**, v.44, n.5, p.1182–1189, 2011.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.1, p.97-108, 2008.

IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. Utilization of Folin–Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 1811-1815, 2003.

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

ITO, N.; HIROSE, M.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H.; SHIRAI, T. TATEMATSU, M. Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. **Food and Chemical Toxicology**, v.24, p.1071–1082, 1986.

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry. **Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives**. Oxford, 7^a ed., Blackwell Scientific Publications, 1987.

IVERSON, F. Phenolic antioxidants – health protection branch studies on butylated hydroxyanisole. **Cancer Letters**, v.93, p.49-54, 1995.

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.; Salunkhe, D.K. (Eds.), **Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Prospectives**. New York, Editor Marcel Dekker, 1996.

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

KIM, M. K.; AHN, S. H.; LEE-KIM, Y. C. Relationship of serum α -tocopherol, carotenoids and retinol with the risk of breast cancer. **Nutrition Research**, v.21, n. 6, p.797-809, 2001.

KIM, M-B.; PARK, J.-S.; LIM, S.-B. Antioxidant activity and cell toxicity of pressurised liquid extracts from 20 selected plant species in Jeju, Korea. **Food Chemistry**, v.122, p.546–552, 2010.

KODALI, D. R. Oxidative stability measurement of high-stability oils by pressure differential scanning calorimeter (PDSC). *J Agric Food Chem*, V.53, N.20, P.7649-53, 2005.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and bioproducts processing**, v.89, p.217–233, 2011.

LA VECCHIA, C.; ALTIERI, A.; TAVANI, A. Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: A review of Italian studies. **European Journal of Nutrition**, v.40, p.261–267, 2001.

LAMPE, J. W. Spicing up a vegetarian diet: Chemopreventive effects of phytochemicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, p.579S- 583S, 2003.

LANDRUM JT, Bone RA. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.385, n.1, p.28-40, 2001.

LEE, Y.-C.; CHUAH, A. M.; YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; MATOBA, T. Antioxidant Activity of Traditional Chinese Medicinal Herbs. **Food Science and Technology Research**, v.14, n.2, p.205-210, 2008.

LEVY, P. Pressure Differential Scanning Calorimetry. **Thermochimica Acta**, v.1, p.429-439, 1970.

- LIA, H.-B.; WONGA, C.-C.; CHENGA, K.-W.; Chen, F. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. **LWT – Food Science and Technology**, v.41, n.3, p.385–390, 2008.
- LICHTENTHALER, H. K. The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. **Annual Review of plant physiology and plant molecular biology**, v. 50, p. 47-50, 1999.
- LITWINIENKO, G.; KASPRZYSZKA-GUTTMAN, T.; JAMANEK, D. DSC study of antioxidant properties of dihydroxyphenols, *Thermochimica Acta*, v.331, p.79-86, 1999.
- MAGANHA, E. G.; HALMENSCHLAGER, R. C.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P.; RAMOS, A. L. L. P.; SAFI, J. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. **Food Chemistry**, v.118, n.1 p.1–10, 2010.
- MAHMOUD, A.A.; AL-SHIHRY, S.S.; SON, B.W. Diterpenoid quinones from *Rosmarinus officinalis* L. **Phytochemistry**, v.66, p.1685-1690, 2005.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.79, p.727-747, 2004.
- MARINOVA, E. M.; YANISHLIEVA, N. V. Inhibited oxidation of lipids II: Comparison of the antioxidative properties of some hydroxy derivatives of benzoic and cinnamic acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.94, n.11, p.428-432, 1992.
- MATKOWSKI, A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants - A Review. **Biotechnology Advances**, v.26, n.6, p.548–560, 2008.
- MCCLEMENTS, D, J.; DECKER, E. A. LIPÍDEOS. IN: DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. Porto Alegre, Artmed, 2010.
- MELO, E. D.; MANCINI, J.; GUERRA, N. B. Characterization of antioxidant compounds in aqueous coriander extract (*Coriandrum sativum* L.). **LWT - Food Science and Technology**, v.38, p.15-19, 2005.
- MIN, D. B.; BOFF, J. M. Lipid Oxidation of Edible Oil. In Akoh, C. C.; Min, D. B. **Food Lipids**. New York, Editor Marcel Dekker, 2002.
- MIURA, K.; KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.1845-1851, 2002.
- MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidants assays for plant and food components. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.57, n.5, p.1655-1666, 2009.
- MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise Térmica de Materiais**. São Paulo, Editora Artliber, 2009.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, n.1-2, p.95- 111, 2004.

NETO, V. Q.; BORA, P. S.; DINIZ, Z. N.; CAVALHEIRO, J. M. O.; QUEIROGA, K.F. Dipteryx lacunifera Seed Oil: Characterization and Thermal Stability. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 6, p.1601-1607, 2009.

NEUHOUSER, M. L. Dietary flavonoids and cancer risk: evidence from human population studies. **Nutrition and Cancer**, v.50, n. 1, p.1-7, 2004.

NEUMANN, A.; JEBENS, T.; WIEMBICKI, V. A method for determining oxidation stability of petrodiesel, biodiesel, and blended fuels. **American Laboratory**, v. 40, p. 22–23, 2008

NINFALI, P.; MEA, G.; GIORGINI, S.; ROCCHI, M.; BACCHIOCCA, M. Antioxidant capacity of vegetables, spices, and dressings relevant to nutrition. **The British Journal of Nutrition**, v. 93, n. 2, p. 257-266, 2005.

OLIVEIRA, A. C. DE; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v.32, n.3, p.689-702, 2009.

OMONI, A.O.; ALUKO, R.E. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, p. 344-350, 2005.

ORDONEZ, J. A. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. v 1. Porto Alegre: Artmed, p. 33-49, 2005.

OSGANIAN, S. K.; STAMPFER, M. J.; RIMM, E.; SPIEGELMAN, D.; MANSON, J. E.; WILLETT, W. C. Dietary carotenoids and risk of coronary artery disease in women. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v. 77, n. 6, p. 1390-1399, 2003

OZAWA, C. C.; GONÇALVES, L. A. G. Oxidación lipídica y nuevos métodos analíticos de detección. **Aceites y Grasas**, v. 2, n. 6, p. 330-338, 2006.

PÉREZ-GALVÉS, A.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. A. Degradation, under non-oxygen mediated autooxidation, of carotenoid profile present in paprika oleoresins with lipid substrates of different fatty acid composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.632-637, 2004.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Literature data may underestimate the actual activity of cereals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n.12, p. 5036-5040, 2005.

PINTO, Â. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. DA S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. DE A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Supl.1, p. 45-61, 2002.

PIZZALE, L.; BORTOLOMEAZZI, R.; VICHI, S.; UBAREGGER, E.; CONTE, L. S. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.82, p.1645-1651, 2002.

POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food – Practical applications**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001. 288p.

PREDIGER, R. D. Effects of caffeine in Parkinson's disease: from neuroprotection to the management of motor and non-motor symptoms. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, Suppl 1, p.205-220, 2010.

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. 4290-4303, 2005.

PUKALSKAS, A., BEEK, T. A., WAARD, P. Development of a triple hyphenated HPLC-radical scavenging detection–DAD-SPE-NMR system for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts. **Journal of Chromatography A.**, v. 1074, n. 1-2, p. 81-88, 2005.

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

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G.A. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. **Biotechnology Advances**, v.20, p.101 – 153, 2002.

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

RIBÈREAU-GAYON, P. **Les composé phénoliques des végétaux**. França, Dunod, 1968.

RODRIGUES, P. O.; CARDOSO, T. F. M.; SILVA, M. A. S.; MATOS, J. R. Aplicação de Técnicas Termoanalíticas na Caracterização, Determinação da Pureza e Cinética de Degradação da Zidovudina (AZT). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 24, n. 3, p. 383-387, 2005.

ROGINSKY, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, v.92, p.235-254, 2005.

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

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

SANTOS, C.; COSTA, J.; SANTOS, J.; VAZ-CARNEIRO, A.; LUNET, N. Caffeine intake and dementia: systematic review and meta-analysis. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.20, p.187-204, 2010.

SANTOS, J. C. O.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G.; PRASAD, S.; SANTOS, A. V. Thermal Stability and Kinetic Study on Thermal Decomposition of Commercial Edible Oils by Thermogravimetry. **Journal of Food Science**, v.67, p.1393-1398, 2002.

SANTOS, N. A.; CORDEIRO, A. M. T. M.; DAMASCENO, S. S.; AGUIAR, R. T.; ROSENHAIM, R.; CARVALHO FILHO, J. R.; SANTOS, I. M. G.; MAIA, A. S.; SOUZA, A. G. Commercial antioxidants and thermal stability evaluations. **Fuel**, v.97, p.638-643, 2012.

SCHAICH, K. M. Lipid Oxidation:Theoretical Aspects. In **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. v. 1. Edible oil and fat products: chemistry, properties, and health effects. 6 ed, Ed.Fereidoon Shahidi, 2005.

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

SHAHIDI, F., NACKZ, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. 2 ed. CRC Press, 2003.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Antioxidants: Regulatory Status. In **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. v. 1. Edible oil and fat products: chemistry, properties, and health effects. 6 ed, Ed.Fereidoon Shahidi, 2005.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, v.39, p.4067-4079, 2010.

SHAN, B.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.20, p.7749-7759, 2005.

SILVA, C.G.; HERDEIRO, R.S.; C.J.; MATHIAS, A.D.; PANEK, C.S.; SILVEIRA, V.P.; RODRIGUES, M.N.; RENNO, D.Q.; FALCÃO, D.M.; CERQUEIRA, A.B.M.; MINTO, F.L.P.; NOGUEIRA, C.H.; QUARESMA, J.F.M. SILVA, F.S. MENEZES, E.C.A. ELEUTHERIO. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. **Pharmacological Research**, v.52, p.229-233, 2005.

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

SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; LINS, A. C. DA S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, E. M. S. DA; FREITAS, B. M.; SANTOS, F. DE A. R. DOS. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, n.19, p.507-511, 2006.

SINGLETON VL, ROSSI JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, n.3, p.144-158, 1965.

SIVAKUMAR, G.; ALIBONI, A.; BACCHETTA, L. HPLC screening of anti-cancer sulforaphane from important European Brassica species. **Food Chemistry**, v.104, p.1761-1764, 2007.

SMOUSE, T.H. Factors affecting oil quality and stability. In: WARNER, K.; ESKIN, N.A.M. **Methods to assess quality and stability of oils and fat-containing foods**. Champaign, IL, AOCS, 1995.

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

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R. VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SPERONI, E.; SCARTEZZINI, P. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. **Journal Ethnopharmacology**, v.71, p.23-43, 2000.

- SRINIVASAN, K. Role of spices beyond food flavoring: Nutraceuticals with multiple health effects. **Food Reviews International**, v.21, p.167- 188, 2005.
- STALIKAS, C. D. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v.30, p.3268-3295, 2007.
- TADIĆ, V. M.; JEREMIC, I.; DOBRIC, S.; ISAKOVIC, A.; MARKOVIC, I.; TRAJKOVIC, V.; BOJOVIC, D.; ARSIC, I. Anti-inflammatory, gastroprotective, and cytotoxic effects of sideritis scardica extracts. **Planta Medica**, v. 78, n. 5, p. 415-427, 2012
- TAN, C. P.; CHE MAN, Y. B.; SELAMAT, J.; YUSOFF, M. S. A. Comparative studies of oxidative stability of edible oils by differential scanning calorimetry and oxidative stability index methods. **Food Chemistry**, v. 76, n. 3, p. 385–389, 2002.
- TANG, L., ZIRPOLI, G. R., GURU, K., MOYSICH, K. B., ZANG, Y., MBROSONE, C. B., MCCANN, S. E. Consumption of raw cruciferous vegetables is inversely associated with bladder cancer risk. **Cancer Epidemiology Biomarkers e Prevention**, v. 17, n. 4, p. 938-944, 2008.
- TORRECILLA, J. S.; GARCIA, J.; GARCIA, S.; RODRIGUEZ, F. Application of lag-k autocorrelation coefficient and the TGA signals approach to detecting and quantifying adulterations of extra virgin olive oil with inferior edible oils. **Analytica Chimica Acta**, v. 688, n.2, p. 140-145, 2011.
- VAN AARDT, M.; DUNCAN, S. E.; LONG, T. E.; O'KEEFE, S. F.; MARCY, J.E.; SIMS, S. R. Effect of Antioxidants on Oxidative Stability of Edible Fats and Oils: Thermogravimetric Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 3, p. 587-591, 2004.
- VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado. (Documentos, 316). 2010.
- WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; SHAHIDI, F. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. v. 1. Edible oil and fat products: chemistry, properties, and health effects. 6 ed, Ed. Fereidoon Shahidi, 2005.
- WENZEL, U.; KUNTZ, S.; BRENDDEL, M. D.; DANIEL, H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. **Cancer Research**, v.60, n. 14, p. 3823-3831, 2000.
- WILLCOX J. K.; ASH, S.L.; CATIGNANI, G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. **Critical Reviews in Food Science Nutrition**, v.44, n. 4, p.275–295, 2004.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**, v. 64, n. 1, p. 3–19, 2003.
- WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiology**, v.126, n.2, p.485-493, 2001.
- WITSCHI, H. P. Enhanced tumor-development by butylated hydroxytoluene (BHT) in the liver, lung andgastrointestinal-tract. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 10-11, p. 1127-1130, 1986.

WOJDYŁO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, p. 940-949, 2007.

WOLFE, K.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant activity of apple peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 609-614, 2003.

Wootton-Beard, P. C.; Moran, A.; Ryan, L. 2011. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. **Food Research International**, v. 44, n.1, p. 217–224, 2011.

WÜRTZEN G. Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 28, n.11, p.743-745, 1990.

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

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

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

YOCHUM, L.; KUSHI, L. H.; MEYER, K.; FOLSOM, A. R. Dietary flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in postmenopausal women. **American Journal Epidemiology**, v.149, n. 10, p.943-949, 1999.

ZHANG, Y.; YANG, L.; ZU, Y.; CHEN, X.; WANG, F.; LIU, F. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 656–662, 2010.

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

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165-70, 2001.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos com o desenvolvimento desta pesquisa proporcionaram a elaboração de cinco artigos discriminados a seguir:

O artigo 1, intitulado “Investigation of thermal behavior and antioxidant activity of plant extracts”, será submetido ao periódico Food Chemistry, Qualis A1;

O artigo 2, intitulado “Commercial antioxidants and thermal stability evaluations”, publicado no periódico Fuel, Qualis A1 (interdisciplinar); A2 (química);

O artigo 3, intitulado “Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract: thermal study and evaluation of the antioxidant effect on vegetable oils”, publicado no periódico Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, Qualis B1;

O artigo 4, intitulado ‘Rancimat and PDSC accelerated techniques for evaluation of oxidative stability of soybean oil with plant extracts’, publicado no periódico Journal of Thermal Analysis and Calorimetry, Qualis B1;

O artigo 5, intitulado ‘Evaluation of the protective effect of rosemary extract on oxidative stability of vegetable oils using accelerated methods’, foi submetido ao periódico Food Research International, Qualis A2, sob revisão.

Investigation of thermal behavior and antioxidant activity of plant extracts

Angela M. T. M. Cordeiro^{1,2*}, Nataly A. Santos³, Maria L. Medeiros⁴, Raul Rosenhaim⁵, Luiz E. B. Soledade⁶, Antônia L. Souza⁷, Neide Queiroz⁷, Antônio G. Souza⁷.

¹Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Manaus - Zona Leste, Manaus, AM, Brazil.

²Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CT, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

³Departamento de Tecnologia Sucroalcooleira, CTDR, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

⁴Programa de Pós-Graduação em Química, CCEN, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

⁵Departamento de Engenharia Química, CT, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

⁶Campus de Pinheiro, Universidade Federal do Maranhão, Pinheiro, MA, Brazil.

⁷Laboratório de Combustíveis e Materiais – LACOM, Departamento de Química, CCEN, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil.

*Corresponding author: atribuzycordeiro@gmail.com

Fax: +55-83-32167441; Phone:+55-83-32167441

Abstract

The protection that plants and their extracts provide against diseases is attributed to the various antioxidants therein contained. Among the various classes of naturally occurring antioxidants, phenolic compounds have received much attention in recent years, especially for manifesting both *in vitro* and *in vivo* antioxidant effect, preventing degenerative diseases, as well as providing an excellent protection factor for the oxidative stability of lipid matrices. The effectiveness of antioxidants is impaired when they are subjected to high temperatures, as they can be removed by volatilization and / or decomposition. The thermogravimetry (TG) technique, employing both dynamic and isothermal (110 °C) analysis methods, was used to evaluate the thermal stability of 24 plant extracts. The total phenolic content (TPC) (Folin-Ciocateau method) and the antioxidant capacity (DPPH[•] and FRAP) of the plant extracts were also investigated. Clove extract exhibited the highest TPC and the best antioxidant capacity, as determined by the FRAP test. The extracts of juca and barbatimao, originated from the Amazon Region, presented high TPC (133.63 ±1.94 and 147.37 ±1.99 mg GAE/g extract), confirming their excellent antioxidant capacity, as for the methods employed. The TPC values of the plant extracts decreases in the following order: clove > barbatimao > juca > white tea > cinnamon > green tea > oregano > saffron > cat's claw > marjoram > boldo > rosemary > black tea > carqueja > mate > pau d'arco > basil > chamomile > lemon balm > senna > fennel > chapeu-de-couro > coriander > guarana. The high efficiency exhibited by these extracts is possibly related to the presence of phenolics in their composition and to the phenolic contents. The thermogravimetric profiles showed that the extracts of cat's claw, saffron, rosemary, white tea and cinnamom deserve be stressed as they present high thermal resistance, pointing out that they may be used as antioxidant additives in formulations that need to be heated. The clove extract, although it is an excellent antioxidant, did not show a good thermal stability, with a mass loss of 81.4% in the first step (28.1 °C – 266.7 °C), ascribed to the degradation of its main chemical component, eugenol.

Keywords: plant extracts, natural antioxidants, antioxidant activity, thermal stability.

1. Introduction

Plants are important sources of a wide variety of phytochemicals, which individually or in combination, provide health benefits and are used to the treatment of diseases (Krishnaiah et al., 2011; Kim et al., 2010; Tang et al., 2008; Curin and Andriantsitohaina, 2005; Lampe, 2003; Pizzale et al., 2002).

The active components of plants produce a variety of antioxidants that can act by different mechanisms to enable a defense system, which is effective against the attack of free radicals, avoiding that these induce diseases and protecting foods against oxidative deterioration (La Vecchia et al., 2001; Shahidi, 2000).

Among the various classes of naturally occurring antioxidants are phenolic acids, flavonoids and carotenoids normally found in fruits, herbs, seeds of citrus fruits and cereals (Oliveira et al., 2009; Shan et al., 2005; Zheng and Wang, 2001). These compounds exert *in vitro* and *in vivo* antioxidant effect, preventing cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases, as well as providing an excellent protection factor for the oxidative stability of lipid matrices (Cordeiro et al., 2013; Fu et al., 2011; Wojdyło et al., 2007; Yanishlieva et al., 2006; Chun et al., 2005; Cai et al., 2004).

The antioxidant activity of phenolic compounds is ascribed to their chemical structure and their reducing properties, which, acting from the beginning of the oxidative process and even during its propagation, are responsible for the neutralization or scavenging of free radicals and chelation of transition metals (Shahidi, 2000).

The efficiency of the antioxidants varies as a function of the chosen substrate and the processing and storage conditions (Moure, 2001). It is important to emphasize that the action of the antioxidants, in the majority of the substrates, decreases when these are submitted to thermal processes, when the antioxidants are applied in foods or when they are submitted to accelerated tests to evaluate their protection effect, as it is the case of the standardized Rancimat test (Augustin and Berry, 1983; Dobarganes et al., 1986; Cordeiro et al., 2012; Cordeiro et al., 2013). A study, recently undertaken by Santos et al. (2012), by means of the TG/DTA method, verified that the synthetic antioxidants TBHQ, BHA and BHT showed a low resistance, since they decompose at temperatures lower than 110 °C.

The thermal stability of a drug, antioxidant or any substance is considered as the ability of the sample to maintain its properties during the thermal processing, as close as possible to its initial characteristics. Thermogravimetry - TG – is an analytical technique used

to determine the thermal stability of a material and its fraction of volatile components by monitoring its mass change that takes place upon its heating (Mothé and Azevedo, 2009).

Based on the foregoing, it is clear the importance of analyzing the thermal stability of natural extracts in order to determine the temperature threshold for the protection of the antioxidant compound. Therefore, the present study aimed at evaluating the antioxidant potential and the thermal profile of 24 (twenty- four) extracts of plants commonly used in cooking and in phytotherapy.

2. Materials and methods

2.1 Materials and reagents

The standards of ascorbic acid, gallic acid, DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), TPTZ (2,4,6-tri(2-pyridyl)-s-triazine) and TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) were supplied by Sigma-Aldrich. The Folin-Ciocateau reagent was supplied by Merck. The reagents ferric chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), ferrous sulfate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) and sodium acetate trihydrate and sodium carbonate were provided by Vetec Química Fina Ltda. The gases (synthetic air and nitrogen) utilized were acquired from White Martins, Brazil. The remaining reagents and analytical grade solvents were obtained from FMAIA.

A total of 24 dried plants, including species from the Amazon Region were acquired from two different markets: Manaus – AM and João Pessoa –PB, both in Brazil. The scientific names and the plant parts tested are shown in Table 1.

2.2 Preparation of the antioxidant extracts

The 24 plant extracts were obtained using ethanol as the solvent, at room temperature. The dried herbs were separately conditioned in glass containers, immersed in ethanol, under daily stirring, remaining closed for 15 days at room temperature. Later, the extracts were vacuum filtered and the solvent removed under reduced pressure at 50 °C in a rotary evaporator. The plant extracts were conditioned in glass containers, protected from light, at room temperature, up to the moment of being used.

Table 1. Common name, family, scientific name and plant parts tested in the 24 plant species.

Common name	Family	Scientific name	Plant parts tested
Chapeu-de-couro*	Alismataceae	<i>Echinodorus grandiflorus</i> Mitch.	leaves
Coriander	Apiaceae	<i>Coriandrum sativum</i> L.	seeds
Fennel	Apiaceae	<i>Foeniculum vulgare</i> (Mill.) Gaertn	leaves and seeds
Mate	Aquifoliaceae	<i>Ilex paraguariensis</i> St. Hilaire	leaves
Chamomile	Asteraceae	<i>Matricaria recutita</i> L.	flowers
Carqueja	Asteraceae	<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC	leaves and stems
Pau-d'arco*	Bignoniaceae	<i>Tabebuia serratifolia</i> (Vahl) Nich.	barks
Juca*	Fabaceae	<i>Caesalpinia ferrea</i> Mart. Ex Tul.	Pods
Barbatimao*	Fabaceae	<i>Stryphnodendron barbatimam</i> Mart.	barks
Senna	Fabaceae	<i>Cassia angustifolia</i>	leaves
Saffron	Iridaceae	<i>Crocus sativus</i> L.	powdered stigmas of flowers
Rosemary	Lamiaceae	<i>Rosmarinus officinalis</i>	leaves
Marjoram	Lamiaceae	<i>Origanum majorana</i> L.	leaves
Basil	Lamiaceae	<i>Ocimum basilicum</i>	leaves
Oregano	Lamiaceae	<i>Origanum vulgare</i> L. ssp <i>Virens</i>	leaves
Boldo	Lamiaceae	<i>Peumus boldus</i> Molina.	leaves
Lemon balm	Lamiaceae	<i>Melissa officinalis</i>	leaves
Cinnamon	Lauraceae	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	powdered bark
Clove	Myrtaceae	<i>Syzygium aromaticum</i>	flower buds
Cat's claw*	Rubiaceae	<i>Uncaria tomentosa</i>	barks of trunks and roots
Guarana*	Sapindaceae	<i>Paullinia cupana</i> Kunth	toasted powdered seeds
White tea	Theaceae	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kutntze	leaves and buds
Green tea	Theaceae	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kutntze	young leaves
Black tea	Theaceae	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kutntze	fermented leaves

*Plants originated from Amazon Region.

2.3 Total phenolic content

The total phenolic content of each plant extract was determined, in triplicate, by the colorimetric method, utilizing the Folin–Ciocalteu reagent (Singleton and Rossi, 1965), with some modifications. All plant extract solutions were prepared in ethanol at a concentration of 1 mg/mL. In triplicate, aliquots of samples (15 µL for clove extract, 100 µL for coriander extract, 30 µL for rosemary extracts, cinnamon and oregano and 50 µL for the other extracts) were mixed with 60 µL of the Folin–Ciocalteu reagent, 180 µL of a 15% sodium carbonate solution and distilled water up to 3 mL. After 30 min, in a dark environment, at the temperature of 45 °C, the absorbance at 760 nm was measured by a Shimadzu, model UV-

2550, UV–Vis spectrophotometer. A gallic acid standard curve (from 2.5 to 25 mg/L) was obtained, using the same conditions. The results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE)/g of extract.

2.4 Radical-scavenging activity of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•) assay

The DPPH• assay was carried out according to methodology described by [Brand-Williams et al. \(1995\)](#), with some modifications. The scavenging activity of the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl - DPPH• - is one of the most used methods for the evaluation of antioxidant capacity. This radical is stable, with absorption in the 515–520 nm range, which easily undergoes reduction in the presence of antioxidants, with the corresponding decrease in absorption. The percent of the total antioxidant activity (%TAA), or the scavenging of free radicals activity, corresponds to the amount of DPPH• consumed by the antioxidant ([Frankel and Meyer, 2000](#)). Based on a preliminary screening study, appropriate amounts of DPPH• solution (23.6 µg/mL in EtOH) were added to the ethanolic sample solutions, aiming at obtaining final concentrations ranging from 2.5 to 500 µg.mL⁻¹. In triplicate, aliquots of samples from different predetermined concentrations were mixed with ethanol and 2,700 µL of the DPPH• solution. After 30 minutes, the reading was performed at 517 nm in a Shimadzu 2550 model UV-UV-vis spectrophotometer. The readings allowed plotting a graph of concentration (µg/mL) against %TAA (Eq. 1).

$$\%TAA = 100 \times \left(\frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} \right) \quad (\text{Eq. 1})$$

In which, $Abs_{control}$ is the absorbance of the DPPH• radical ethanol solution and Abs_{sample} is the sample absorption, in the presence of the DPPH• radical.

The results were expressed in terms of EC_{50} and the calculation was performed from the standard line equation, replacing the value of Y by 50%, for determining the sample concentration with the capacity to reduce 50% of DPPH•.

2.5 Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay

The ferric reducing power of plant extracts was determined using a modified version of the FRAP assay ([Benzie and Strain, 1996](#)). For the preparation of the FRAP reagent solution, 25 mL of 0.3 M acetate buffer solution were added to a 2.5 mL aliquot of a 10 mM TPTZ solution and to 2.5 mL of a 20 mM aqueous ferric chloride solution. 90 µL of each

sample at three different concentrations were homogenized with 2.7 mL FRAP reagent solution (freshly prepared) and 270 μ L of distilled water. The solutions were stirred in temperature-controlled water bath at 37 °C for 30 minutes. For the absorbance readings, the spectrophotometer was calibrated with FRAP reagent solution and they were performed at 595 nm in a UV-2550 model Shimadzu UV-vis spectrophotometer.

A control curve was prepared using a ferrous sulfate solution (500-2000 μ M). Total antioxidant activity can be calculated from the linear relationship of absorbance *versus* concentration (mg/L) (Y vs X), substituting in the line equation the absorbance equivalent to 1000 μ M of the ferrous sulfate standard solution. The value obtained for the term X corresponds to sample dilution (mg/L) equivalent to a 1.000 μ M of ferrous sulfate solution. The result is expressed in μ M ferrous sulfate/g of sample.

2.6 Thermal analyses

The thermogravimetric curves (TG/DTA) of the plant extracts were obtained in a model DTG-60H simultaneous thermal analyzer from Shimadzu. The non-isothermal tests were carried out using about 10 mg samples in an alumina pan and synthetic air atmosphere, with a flow rate of 50 mL/min, heating rate of 10 °C/min, and temperature range of 25–1.000 °C. The isothermal curves were obtained in a synthetic air atmosphere, using approximately 10 mg of sample in an aluminum pan, with a flow rate of 50 mL/min. The following heating schedule was used: an initial heating rate of 10 °C/min was maintained until the temperature reached 100 °C, followed by a heating rate of 2 °C/min until reaching 110 °C, at which point the isothermal test was performed.

3. Results and Discussion

3.1 Screening of 24 plant species for antioxidant capacity and total phenol content

The Total Phenolic Content (TPC) of the 24 plant extracts, evaluated by the Folin–Ciocalteu method, expressed as Gallic Acid Equivalent (GAE) per g of extract, showed values that ranged from 4.32 ± 0.22 to 193.63 ± 0.8 mg GAE/ g of extract (Table 2). Clove extract was the one that displayed the highest content of phenolic compounds, whereas guarana extract displayed the lowest content. The extracts of barbatimao, cinnamon, white tea, juca, green tea and oregano also presented total phenolic contents above 92 mg GAE/g of extract.

Extracts such as the ones from saffron, rosemary, boldo, marjoram and cat's claw revealed moderate values, and the remaining extracts disclosed values below 50 mg GAE/ g of extract. The TPC figures of the studied plant extracts decrease in the following order: clove > barbatimao > juca > white tea > cinnamon > green tea > oregano > saffron > cat's claw > marjoram > boldo > rosemary > black tea > carqueja > mate > pau d'arco > basil > chamomile > lemon balm > senna > fennel > chapeu-de-couro > coriander > guarana.

DPPH• and FRAP assays are widely used to determine the antioxidant capacity in plant extracts, due to their simplicity, stability, and reproducibility (Reddy et al., 2010). Results of radical scavenging capacities, determined by the DPPH• and FRAP assays are shown in Table 1.

3.2 Antioxidant capacity of plant extracts by the DPPH• method

The antioxidant activity determined by the DPPH• assay was expressed in EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) $\pm$ SD, which corresponds to the antioxidant concentration needed to reduce the initial quantity of the DPPH• radical in 50%. The smaller the EC_{50} , the higher is the efficiency, and, thus, the better the antioxidant capacity of the sample. The extracts of barbatimao and juca, originated from the Amazon Region, displayed the highest antioxidant capacity, possessed the highest antioxidant capacity equating to the synthetic antioxidant Trolox ($EC_{50}=3.09 \pm 0.082 \mu\text{g/mL}$), used as a positive control. White tea, green tea, cinnamon, clove, black tea, oregano, boldo, saffron and rosemary were also shown to be efficient in reducing the DPPH• radical. Conversely, the extracts of fennel, chapeu-de-couro and coriander did not present reactivity in this method, what was expected taking into account the low TPC values determined.

3.3 Antioxidant capacity of the plant extracts by the FRAP assay

The FRAP antioxidant activity ranged from the lowest value of 8.00 (fennel) to the highest value of 582.45 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4 \text{ g}^{-1}$ extract (Clove). Based on the antioxidant data obtained, the plants extracts were grouped into four categories: low antioxidant power ($<40 \mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ extract), medium ($40\text{--}90 \mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ extract), high ($90\text{--}200 \mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ extract), extremely high ($>200 \mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ extract). The number of plants in each of the low, medium, high, and extremely high antioxidant power categories was 5, 7, 6 and 6.

Table 2. Total Phenolic Contents (TPC) expressed in mg of GAE/g of plant extract and antioxidant capacity determined by the FRAP method expressed in mmol Fe²⁺/g of plant extract and EC₅₀ (µg/ mL) utilizing the DPPH• radical method.

Plant extract	TPC (mg GAE/g extract)	Antioxidant capacity	
		DPPH• EC ₅₀ (µg/mL) ^a	FRAP (µmol Fe ₂ SO ₄ /g extract)
Saffron	88.5 ± 3.13	17.18 ±0.78	133.80
Rosemary	63.0 ± 2.30	19.51 ±0.82	70.80
Barbatimao	147.37 ± 1.99	3.09 ±0.89	343.88
Boldo	63.95 ± 0.96	16.65 ±1.33	88.72
Chamomile	25.3 ± 0.90	96.16 ±0.50	75.55
Cinnamon	117.2 ± 1.05	6.70 ±1.17	182.49
Carqueja	47.95 ± 0.63	31.65 ±0.90	82.72
White tea	125.76 ± 2.23	4,27 ±0.77	287.75
Mate	40.83 ± 1.15	31.31 ±0.81	100.40
Chapeu de couro	9.85 ± 0.13	NR ^b	12.52
Black tea	56.91 ± 0.93	15.70 ±1.22	103.00
Green tea	92.35 ± 1.78	5.77 ±0.96	213.56
Coriander	8.7 ± 0.40	NR ^b	8.26
Clove	193.63 ± 0.80	10,65 ±0.99	582.45
Lemon balm	23.92 ± 0.38	127.50 ±1.22	37.92
Fennel	11.9 ± 0.70	NR ^b	8.00
Juca	133.63 ±1.94	3.11 ±0.93	427.11
Guarana	4.32 ± 0.22	133.68 ±1.95	15.03
Marjoram	65.54 ± 0.97	24.20 ±0.51	260.53
Basil	32.88 ± 1.21	51.04 ±0.78	74.88
Oregano	92.1 ± 1.96	16.05 ±0.25	170.53
Pau d'arco	36.73 ± 0.92	109.61 ±0.98	77.43
Senna	19.1 ± 0.60	153.95 ±1.70	64.75
Cat's claw	68.81 ± 1.60	13,30 ±0.29	257.78

^a Antioxidant concentration required to reduce in 50% the DPPH• .

^b NR – Did not show reactivity for this method.

Similarly to results obtained for the DPPH• method, juca, barbatimao, white tea, green tea, cinnamon and oregano showed a high activity towards the reduction of ferric ion ($427.11 > 343.88 > 287.75 > 213.56 > 182.49 > 170.53$ $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ extract, respectively).

Clove extract exhibited the highest TPC (193.63 ± 0.8 mg GAE/g extract) and the best antioxidant capacity by the FRAP assay (582.45 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ extract). Although it did not display the best performance in the DPPH• method, it is very efficient, once it need a pretty small value of EC_{50} in terms of the DPPH• radical (10.65 ± 0.99 $\mu\text{g}/\text{ml}$). This plant is known for its remarkable aroma and flavor, conferred by a volatile phenolic compound, eugenol, its main constituent (70-95%) (Dewick, 2002). It is utilized for years, all over the world, as a dental anesthetic and flavoring. Studies have evidenced its nematocidal, insecticidal, antiviral, bactericidal, fungicidal activities (Mazzafera, 2003; Tsao and Yu, 2000; Nascimento et al., 2000) and recently its activity as a powerful larvicide and insecticide against vectors of dengue, a disease commonly found in tropical countries (Medeiros et al., 2013).

The Amazon region is the source of a variety of medicinal plants. Juca is among the plant species that show recognized biological activities, such as anti-inflammatory and analgesic (Carvalho, 1996). Barbatimao is another source of phytochemicals, which exhibited, among other, antiseptic, antimicrobial, antihemorrhagic, antidiarrhoeal, anti-inflammatory and healing activities (Jacobson et al., 2005). In the present study, the extracts of juca and barbatimao displayed values TPC values (133.63 ± 1.94 and 147.37 ± 1.99 mg GAE/g extract), respectively, thus confirming the excellent antioxidant capacity revealed by the methods DPPH• (EC_{50} of 3.11 ± 0.93 and 3.09 ± 0.89 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and FRAP (427.11 and 343.88 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ extract), respectively.

Pau d'arco is recognizedly applied for the treatment of several diseases, moreover for cancer. Studies point out that the extensive healing power of pau d'arco is ascribed to the totality of the substances contained in such remarkable plant. Some of these substances, even in small concentrations, can decisively contribute to the inhibition of the tumor growth. On the other hand, the literature reports that the usage of its isolated compounds leads to a reduction of its healing power (Jones, 1994; Lübeck, 1998). The low values obtained in the TPC of pau d'arco extract, 36.73 ± 0.92 mg GAE/g extract, reflect its antioxidant activity, yielding EC_{50} values of 109.61 ± 0.98 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 77.53 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$ extract, respectively, for the DPPH• and FRAP assays.

The beneficial effects that the teas of *Camellia sinensis* (black tea, green tea and white tea) and herbal infusions as boldo, mate, chamomile, senna, fennel, carqueja and lemon balm

to provide to health are mainly attributed to the presence of polyphenols, such as catechins, theaflavins, myricetin, quercetin, kaempferol and terpenoids (Zaveri et al., 2006; Matsubara and Rodriguez-Amaya, 2006; Leung et al., 2001; Parejo et al., 2004; Peron et al, 2008; Mckay and Blumberg , 2006). White tea and green tea, produced from unfermented buds and leaves, showed the best TPC values (125.76 ± 2.23 and 92.35 ± 1.78 mg GAE / g extract, respectively), so it conferred a higher antioxidant activity (EC_{50} of 4.27 ± 0.77 and 5.77 ± 0.96 μ g/ml and 287.75 and 213.56 μ mol Fe_2SO_4 /g extract, respectively) when compared to the remaining herbal infusions.

The family Lamiaceae represented by more than 3,500 species (Cuppett and Hall, 1998) including rosemary, oregano, basil and marjoram is widely used in the oxidation control of lipid matrices, due to the recognized antioxidant properties, which is mainly attributed to the significant presence of phenolic compounds, as rosmarinic acid, caffeic acid, carnosol, rosmanol, carnosic acid, catechin, luteolin and kaempferol (Cordeiro et al., 2012; Mariutti and Bragagnolo, 2007; Shan et al., 2005; Dorman et al., 2004; Pizzale et al., 2002). Among the species from the Lamiaceae family investigated in the present study, the highest TPC (92.01 ± 1.96 mg GAE/g extract) corresponded to the oregano extract. On the other hand, marjoram extract was shown to be the most efficient by the metallic ion reduction method (260.53 μ mol Fe_2SO_4 /g extract).

According to Shahidi (2000), the antioxidants from natural sources are frequently present in combinations involving many different compounds, thus favoring the oxidation protection by different action mechanisms. Several studies on plant antioxidant properties have been performed, using different methods, with quite different fundamentals, reaction mechanisms and manners of expressing the results. These foregoing differences are also related to the various application fields of such studies: physiology, pharmacology, nutrition, chemistry, cosmetics, food and others (Medeiros et al., 2013; Reddy et al., 2010; Oliveira et al., 2009; Mariutti and Bragagnolo, 2007; Zaveri et al., 2006). Besides this, the high variety of *in vivo* and *in vitro* oxidation systems hinders the comparison between literature data. Despite intensive studies on the action of bioactive components in plant species have been undertaken, thermal stability data are insufficient and / or incomplete.

3.4 Thermal profile of natural antioxidants

Figure 1 shows the TG curves of the plant extracts, obtained in non-isothermal mode. The thermogravimetric profiles of all plant extracts show the initial mass loss temperature below 36 °C, with the exception of black tea extract, in which it was 57 °C. The thermal processes of decomposition/volatilization, investigated in this case in the isothermal mode, took place in 3 to 7 mass loss steps (Table 3).

3.4.1 Thermogravimetric profiles of the extracts of teas and infusions

The remarkable antioxidant potential of teas, together with the infusions of the herbs mate, fennel, lemon balm, senna, carqueja, chamomile and boldo is recognized. However such antioxidant potential depends on many factors involved in the preparation, specially the temperature. The thermal profile of these species was investigated and it disclosed that the extracts of senna, mate, and white tea exhibited higher thermal resistance, justified by smaller mass losses (<8.00%), occurred in the first steps, in which the temperatures were up to 160.30 °C (Table 3). It should be remembered that the ethanol solvent and moisture were previously removed by long heating at 50 °C at low pressure, as previously described. These low mass loss values can be ascribed to the evaporation of the remaining solvent/moisture, followed by the decomposition / volatilization. Green tea extract can also be considered as thermostable, as it showed a mass loss of 12.20% up to the temperature of 207.7 °C.

The remaining extracts displayed, even in the first decomposition / volatilization step an important mass loss that ranged from 30.00% to 55.00%, probably compromising their bioactive compounds. The TG curve of chamomile extract shows a different behavior, with a mass loss of 9.90% in the fourth and final thermal decomposition step (683.6 °C - 964.5 °C), yielding a residue of 7.6% (Table 3).

3.4.2 Thermogravimetric profile of extracts from plants from the Lamiaceae family

The TG curves of extracts from marjoram, basil and oregano showed similar characteristics, as can be noticed in Figure 1 d. All extracts showed a mass loss lower than 15.90% in the first step, which can be associated to endothermic volatilization processes, as shown in the DTA data (Table 4). Figure 1 d also displays the TG curve of rosemary extract, which differed from the remaining species of the Lamiaceae family, showing a superior resistance towards decomposition / volatilization, with a mass loss of only 6.50% up to the

temperature of 176.80 °C. The thermal stability of these antioxidant extracts is confirmed in oxidative stability tests, reported in the literature (Cordeiro et al., 2012; Chen et al., 1992). During the whole performance of the isothermal run at 110 °C, rosemary extract lost 8.50% of its mass by degradation / volatilization (Table 5).

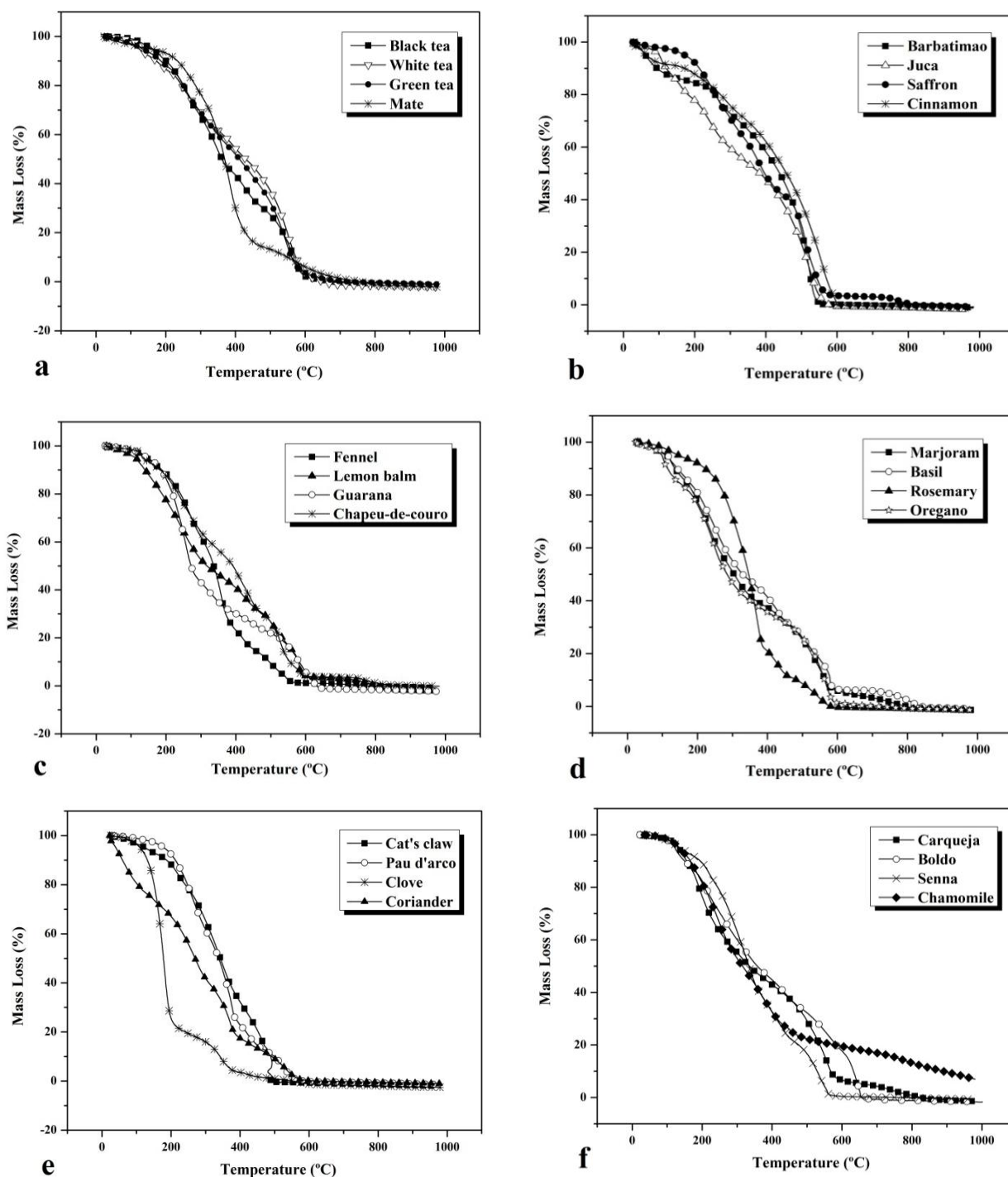


Figure 1 – TG curves of the 24 plant extract.

Tabela 3. Analysis of the TG curves of the plant extracts, obtained in the non-isothermal mode.

Plant extract	Steps	ΔT (°C)	Δm (%)	DTG (Tpeak)	Plant extract	Steps	ΔT (°C)	Δm (%)	DTG (Tpeak)	Plant extract	Steps	ΔT (°C)	Δm (%)	DTG (Tpeak)
Fennel	1 st	31.1 – 296.9	36.8	267.9	Chamomile	1 st	35.7 – 322.3	51.1	242.2	Rosemary	1 st	30.3 – 176.8	6.5	121.7
	2 nd	296.9 – 459.7	48.3	348.9		2 nd	322.3 – 563.0	28.3	367.9		2 nd	176.8 – 405.3	73.2	363.5
	3 th	459.7 – 600.8	13.3	528.5		3 th	563.0 – 683.6	3.1	636.4		3 th	405.3 – 471.1	9.3	426.9
	4 th	648.7 – 836.5	1.3	746.2		4 th	683.6 – 964.5	9.9	766.0		4 th	471.1 – 604.5	11.1	536.7
Black tea	1 st	56.4 – 291.1	30.5	255.3	Guarana	1 st	25.7 – 313.6	58.8	251.7	Pau d'arco	1 st	29.9 – 306.9	40.0	263.8
	2 nd	291.1 – 386.6	24	343.8		2 nd	313.6 – 392.3	10.2	322.8		2 nd	306.9 – 412.4	39.0	361.7
	3 th	386.6 – 474.8	14.85	421.9		3 th	392.3 – 488.8	8.0	445.3		3 th	412.4 – 472.2	8.2	421.9
	4 th	474.8 – 761.7	31.1	559.9		4 th	488.8 – 668.0	24.0	578.8		4 th	472.2 – 615.2	13.0	520.9
White tea	1 st	25.9 – 153.4	8.0	127.7	Mate	1 st	25.0 – 83.6	2.4	51.0	Carqueja	1 st	24.1 – 292.9	43.5	196.1
	2 nd	153.4 – 204.7	5.6	182.1		2 nd	83.6 – 148.1	2.0	112.0		2 nd	292.9 – 398.4	13.0	302.8
	3 th	204.7 – 353.1	25.0	252.4		3 th	148.1 – 484.4	80.9	382.1		3 th	398.4 – 657.6	37.9	543.8
	4 th	353.1 – 423.2	10.4	393.6		4 th	484.4 – 744.0	13.5	569.4		4 th	657.6 – 790.1	4.1	746.5
	5 th	423.2 – 699.1	52.2	543.7		5 th	744.0 – 821.4	1.2	780.8		5 th	790.1 – 880.3	2.0	817.4
Oregano	1 st	24.0 – 155.8	15.9	116.2	Juca	1 st	29.2 – 140.8	12.9	116.5	Clove	1 st	28.1 – 266.7	81.4	175.7
	2 nd	155.8 – 406.1	48.5	243.5		2 nd	140.8 – 193.1	8.1	155.9		2 nd	266.7 – 403.4	14.9	342.8
	3 th	406.1 – 619.9	34.2	553.5		3 th	193.1 – 351.8	25.2	242.4		3 th	403.4 – 482.0	2.2	426.8
	4 th	619.9 – 802.2	1.8	753.9		4 th	351.8 – 611.8	54.8	514.0		4 th	482.0 – 636.6	2.7	559.5
Boldo	1 st	22.8 – 389.8	53.8	234.7	Barbatimao	1 st	32.0 – 68.2	14.2	67.7	Cinnamon	1 st	28.3 – 130.2	7.8	63.2
	2 nd	389.8 – 489.3	12.7	433.1		2 nd	68.2 – 312.3	14.3	268.0		2 nd	130.2 – 334.6	19.8	280.7
	3 th	489.3 – 775.2	34.4	630.6		3 th	312.3 – 565.1	71.2	507.0		3 th	334.6 – 616.5	71.6	549.7
Green tea	1 st	27.3 – 207.7	12.2	186.0	Cat's claw	1 st	30.8 – 157.79	7.1	140.4	Senna	1 st	34.2 – 160.3	6.8	134.1
	2 nd	207.7 – 306.7	19.7	256.6		2 nd	157.7 – 243.6	13	224.1		2 nd	160.3 – 381.0	56.7	321.3
	3 th	306.7 – 373.9	11.7	330.3		3 th	243.6 – 401.2	47.6	336.6		3 th	381.0 – 465.2	15.4	419.0
	4 th	373.9 – 734.1	56.1	534.8		4 th	401.2 – 507.4	32.4	487.2		4 th	465.2 – 584.0	20.5	532.2
Saffron	1 st	28.2 – 108.7	2.2	38.6	Basil	1 st	30.5 – 160.6	12.4	134.5	Chapeu-de-couro	1 st	30.9 – 69.3	0.9	34.0
	2 nd	108.7 – 294.1	25.5	257.4		2 nd	160.6 – 344.3	39.0	252.3		2 nd	69.3 – 162.1	6.7	136.5
	3 th	294.1 – 338.3	8.6	307.9		3 th	344.3 – 460.4	16.9	424.0		3 th	162.1 – 344.3	34.8	244.5
	4 th	338.3 – 440.2	20.6	379.7		4 th	460.4 – 513.7	7.9	496.9		4 th	344.3 – 477.7	27.9	423.8
	5 th	440.2 – 609.4	39.6	507.3		5 th	513.7 – 624.1	17.2	567.6		5 th	477.7 – 560.9	20.5	524.1
	6 th	714.8 – 837.3	3.2	775.5		6 th	624.1 – 876.0	6.6	804.3		6 th	560.9 – 610.6	5.2	570.3
Lemon balm	1 st	29.4 – 363.2	55.0	246.0	Coriander	1 st	22.2 – 150.6	25.0	63.4		7 th	687.7 – 862.5	3.4	768.2
	2 nd	363.2 – 462.8	13.3	424.0		2 nd	150.6 – 313.8	34.5	265.8	Marjoran	1 st	25.7 – 157.5	13.3	136.9
	3 th	462.8 – 526.0	10.4	507.5		3 th	313.8 – 416.7	23.2	361.2		2 nd	157.5 – 386.5	48.0	232.9
	4 th	526.0 – 645.5	18.9	571.6		4 th	416.7 – 457.6	3.2	427.5		3 th	386.5 – 652.7	34.0	537.8
	5 th	645.5 – 896.6	5.3	776.6		5 th	457.6 – 632.2	12.8	523.4		4 th	652.7 – 842.3	45.0	761.8

Tabel 4. Values obtained from DTA curves.

Plant extract	Transition	Tpeak (°C)	Process	Plant extract	Transition	Tpeak (°C)	Process	Plant extract	Transition	Tpeak (°C)	Process
Barbatimao	1 st	72.0	Endo	Pau d'arco	1 st	261.2	Endo	Boldo	1 st	131.8	Endo
	2 nd	244.0	Endo		2 nd	357.9	Endo		2 nd	223.0	Endo
	3 th	506.7	Exo		3 th	445.9	Endo		3 th	423.4	Endo
	4 th	546.8	Exo		4 th	537.1	Exo		4 th	634.1	Exo
Black tea	1 st	130.2	Endo	Carqueja	1 st	143.0	Endo	Green tea	1 st	128.0	Endo
	2 nd	176.8	Endo		2 nd	291.6	Endo		2 nd	239.5	Endo
	3 th	356.7	Exo		3 th	547.7	Exo		3 th	334.6	Endo
	4 th	554.9	Exo		4 th	815.7	Exo		4 th	534.0	Exo
White tea	1 st	119.5	Endo	Marjoram	1 st	130.5	Endo	Guarana	1 st	139.0	Endo
	2 nd	212.0	Endo		2 nd	236.1	Endo		2 nd	256.8	Endo
	3 th	413.2	Endo		3 th	310.7	Exo		3 th	349.9	Exo
	4 th	529.9	Exo		4 th	553.0	Exo		4 th	465.2	Endo
	5 th	649.6	Exo		5 th	741.3	Endo		5 th	576.2	Exo
Cat's claw	1 st	357.1	Exo	Juca	1 st	114.3	Endo	Oregano	1 st	109.3	Endo
	2 nd	491.8	Exo		2 nd	220.4	Endo		2 nd	290.8	Exo
	3 th	492.8	Exo		3 th	508.4	Exo		3 th	556.5	Exo
Fennel	1 st	73.6	Endo	Mate	1 st	56.0	Endo	Basil	4 th	125.0	Endo
	2 nd	134.3	Endo		2 nd	120.3	Endo		5 th	281.7	Exo
	3 th	353.5	Exo		3 th	213.1	Endo		6 th	365.7	Exo
	4 th	384.5	Exo		4 th	386.9	Endo		4 th	430.0	Exo
	5 th	477.5	Exo		5 th	539.9	Exo		5 th	488.0	Exo
	6 th	543.4	Exo		6 th	802.0	Exo		6 th	577.5	Exo
Saffron	1 st	172.3	Endo	Clove	1 st	184.5	Endo	Rosemary	1 st	196.6	Endo
	2 nd	283.5	Endo		2 nd	346.0	Endo		2 nd	271.5	Endo
	3 th	382.4	Endo		3 th	410.2	Endo		3 th	353.4	Endo
	4 th	506.8	Exo		4 th	485.8	Endo		4 th	449.8	Endo
	5 th	773.8	Endo		5 th	581.8	Endo		5 th	543.7	Exo
Lemon balm	1 st	136.3	Endo	Senna	1 st	127.2	Endo	Chamomile	1 st	129.3	Endo
	2 nd	266.0	Endo		2 nd	208.5	Endo		2 nd	308.4	Endo
	3 th	311.3	Endo		3 th	284.3	Endo		3 th	427.2	Endo
	4 th	492.4	Exo		4 th	351.2	Endo		4 th	458.2	Endo
	5 th	579.0	Exo		5 th	409.9	Endo		5 th	500.2	Endo
	6 th	758.2	Exo		6 th	535.2	Exo		6 th	576.8	Endo
	7 th	847.4	Exo		7 th	556.3	Exo		7 th	808.5	Endo
Chapeu-de-couro	1 st	131.2	Endo	Cinnamon	1 st	68.7	Endo	Coriander	1 st	63.8	Endo
	2 nd	278.0	Endo		2 nd	239.3	Endo		2 nd	155.6	Endo
	3 th	393.8	Endo		3 th	343.6	Endo		3 th	273.0	Endo
	4 th	415.1	Endo		4 th	562.3	Exo		4 th	365.9	Exo
	5 th	520.3	Exo		5 th	596.7	Exo		5 th	528.5	Exo
	6 th	588.2	Exo								
	7 th	777.3	Endo								

3.4.3 Thermogravimetric profile of the spice extracts

Among the spices analyzed, the thermal profiles of the extracts of cinnamon and saffron evidenced three and six thermal decomposition steps, with mass losses of 7.80 and 2.8%, respectively (Table 3). Clove extract presented in its first volatilization / decomposition step (28.10 °C - 266.70 °C) a 81.00% loss of its original mass, what was related to its main constituent, eugenol (boiling point of 256.50 °C). In the isothermal mode, at 110 °C, clove extract showed a volatilization of 76.00%, whereas cinnamon showed a mass loss of 9.90% (Table 5).

Table 5. Analysis of the isothermal curves of the plant extracts, performed at 110 °C.

Plant extract	Time (min)	Loss mass (%)	Time onset (min)	Loss mass (%)
Fennel	600	7.30	33.60	5.10
Black tea	600	9.80	26.00	4.20
White tea	600	12.80	15.00	8.80
Lemon balm	600	20.10	30.00	9.10
Carqueja	600	16.20	34.33	8.50
Boldo	600	21.00	23.00	12.00
Green tea	600	13.50	14.00	8.50
Senna	600	8.80	22.00	4.70
Chamomile	600	21.20	28.00	9.80
Guarana	600	9.20	-	-
Mate	600	5.10	11.80	2.50
Barbatimao	600	14.00	13.00	11.50
Cat's claw	600	17.50	16.10	13.00
Juca	600	20.50	16.00	15.30
Chapeu-de-couro	600	9.10	36.00	4.60
Marjoram	600	17.60	30.00	8.50
Basil	600	17.70	34.00	9.20
Saffron	600	11.30	23.00	4.00
Pau d'arco	600	18.30	37.00	6.90
Clove	600	76.00	55.80	61,60
Rosemary	600	8.50	23.77	5.30
Cinnamom	600	9.90	10.40	8.30
Oregano	600	23.60	18.00	14.50
Coriander	600	20.10	25.00	12.60

3.4.4 Thermogravimetric profile of the extracts originated from the Amazon Region

The thermal profiles of the extracts of cat's claw, pau d'arco, guarana and juca, originated from the Amazon region, showed four thermal decomposition steps. The mass losses for the first step ranged from 7.1% (cat's claw) to 58.8% (guarana) (Figure 1b, 1c and 1e and also Table 3). Barbatimao is a source of phenolic compounds, mainly condensed tannins and flavonoids (Santos et al., 2002; Panizza et al., 1988; Ardisson et al., 2002). The TG curve of barbatimao extract (Figure 1b) displays three thermal decomposition steps, with an initial mass loss of 14.2% up to the temperature of 68.2 °C. Such mass loss is attributed to the presence of moisture and small amounts of solvent. The second event took place up to 312.3 °C, presenting a mass loss of 14.3%. It can be ascribed to the loss of water and to the initial volatilization / decomposition of bioactive components, possibly tannic acid, proanthocyanidins and pyrogallol. During the third thermal decomposition step (312.3 °C to 565.1 °C), barbatimao extract lost 71.2% of its original mass, what was related to polymeric compounds.

The species *Echinodorus*, known as chapeu-de-couro, is constituted basically by terpenoids (Pimenta et al., 2006; Costa et al., 1999). The thermogravimetric profile of the chapeu-de-couro extract exhibited seven mass loss events, with the initial temperature of 30.9 °C. The first mass loss step, of 0.9%, is associated to the volatilization of the remaining solvent and moisture, what is evidenced by the endothermic event (Table 4). As for the second step (69.3 °C - 162.1 °C), the mass loss was of only 6.7%. Phytol, its main constituent, is a diterpene which comprises a large group of non volatile compounds, of low molecular weight, insoluble in water and with confirmed pharmacological activities (Tirapelli et al., 2010). This compound, a segment of the chlorophyll molecule, presents a boiling point of 202 °C (McGinty et al., 2010), which is included in the temperature range (162.1 °C to 344.3 °C) of the third mass loss event, corresponding a mass loss of 34.8%. Among the extracts of plants from the Amazon Region, cat's claw and chapeu de couro showed be best thermal resistance, whereas guarana, followed by pau d'arco were the extracts showing the smallest thermal stability.

4. Conclusions

The extracts of clove, barbatimao, juca, rosemary, saffron, boldo, cinnamon, black tea, marjoram, oregano, cinnamon, white tea, green tea and cat's claw presented a high

antioxidant capacity, when evaluated by the DPPH• and FRAP assays. The high efficiency evidenced by these extracts is possibly related to the phenolic composition and phenolic concentration in the extract. The extracts of chapeu-de-couro, fennel, guarana and coriander showed a low total phenolic content and consequently a poor antioxidant action.

The thermogravimetric profiles of the extracts of cat's claw, saffron, rosemary, white tea and cinnamon stood out due to their good thermal resistance. Thus the chemical constituents of the foregoing extracts will be preserved, upon their utilization as antioxidant additives in formulations that require heating.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Brazilian agencies FAPEAM - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, by the Ph. D. scholarship, and to MCT and FINEP.

References

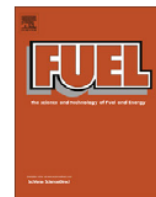
- Ardisson, L., Godoy, J. S., Ferreira, L. A. M., Stehmann, J. R., Brandão, M. G. L. 2002. Preparação e caracterização de extratos glicólicos enriquecidos em taninos a partir das cascas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 12 (1), 27-34.
- Augustin, M.A., Berry, S.K. 1983. Efficiency of antioxidants BHA and BHT in palm oil during heating and frying. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1520-1523.
- Benzie, I. F., Strain, J. J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239 (1), 70-76.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28 (1), 25-30.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74, 2157-2184.
- Carvalho, J. C. T. Teixeira, J. R., Souza, P. J., Bastos, J. K., Santos Filho D., Sarti, S. J. 1996. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 53, 175-178.
- Chen, Q., Shi, H., Ho, C. 1992. Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *Champaign*, 69 (10), 999-1002.
- Chun, S.-S., Vatem, D.A., Lin, Y.-T., Shetty, K. 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochemistry*, 40, 809 – 816.

- Cordeiro, A. M. T. M., Medeiros, M. L., Silva, M. A. A. D., Silva, I. A. A., Soledade, L. E. B., Souza, A. L., Queiroz, N., Souza, A. G. Rancimat and PDSC accelerated techniques for evaluation of oxidative stability of soybean oil with plant extracts. *J Therm Anal Calorim* DOI 10.1007/s10973-013-3036-0
- Cordeiro, A. M. T. M., Medeiros, M. L., Santos, N. A., Soledade, L. E. B., Pontes, L. F. B. L., Souza, A. L., Queiroz, N., Souza, A. G. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract: Thermal study and evaluation of the antioxidant effect on vegetable oils. *J Therm Anal Calorim* DOI 10.1007/s10973-012-2778-4.
- Costa, M., Tanaka, C. M. A., Imamura, P. M., Marsaioli, A. J. 1999. Isolation and synthesis of a new clerodane from *Echinodorus grandiflorus*. *Phytochemistry*, 50, 117–122.
- Cuppett, S. L., Hall, C. A. 1998. Antioxidant activity of the Labiatae. *Advances in Food and Nutrition Research*, 42, 245-271.
- Curin, Y., Andriantsitohaina, R. 2005. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. *Pharmacological Reports*, 57, 97–107.
- Dewick, P. M. 2002. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2 ed. England: John Wiley & Sons, 515 p.
- Dobarganes, M.C., Perez-Camino, M.C., Gutierrez-Rosales, F. 1986. Acción protectora de los antioxidantes BHT y BHA en grasas calentadas a elevada temperatura. *Grasas y Aceitas*, 37, 262-266.
- Dorman, H. J. D., Bachmayer, O., Kosar, M., Hiltunen, R. 2004. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 762-770.
- Frankel, E. N., Meyer, A. S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-41.
- Fu, L., Xu, B.T., Xu, X.R., Gan, R.Y., Zhang, Y., Xia, E.Q., Li, H.B. 2011. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129, 345-350.
- Jacobson, T. K. B., Garcia, J., Santos, S. C., Duarte, J. B., Farias, J. G., Kliemann, J. 2005. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron* sp.). *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 35 (3), 163-169.
- Jones, K. 1995. Pau d'Arco: Immune Power from the Rain Forest. Vermont: Healing Arts press, 152 p.
- Kim, M-B., Park, J.-S., Lim, S.-B. 2010. Antioxidant activity and cell toxicity of pressurised liquid extracts from 20 selected plant species in Jeju, Korea. *Food Chemistry*, 122, 546–552.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioproducts processing*, 89, 217–233.
- La Vecchia, C., Altieri, A., Tavani, A. 2001. Vegetables, fruit, antioxidants and cancer: A review of Italian studies. *European Journal of Nutrition*, 40, 261–267.

- Lampe, J. W. 2003. Spicing up a vegetarian diet: Chemopreventive effects of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 579S- 583S.
- Leung, L. K., Su, Y., Chen, R., Zhang, Z., Huang, Y., Chen, Z. Y. 2001. Theaflavins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. *Journal of Nutrition*, 131 (9), 2248-2251.
- Lübeck, W. 1998. The Healing Power of Pau D'Arco: The Divine Tree of the South American Shamans Provides Extraordinary Healing Benefits. Silver Lake: Lotus Press, 130 p.
- Mariutti, L. R. B., Bragagnolo, N. 2007. Review: Natural Antioxidants from the Lamiaceae Family. Application in Food Products. *Brazilian Journal of Food Technology*, 10 (2), 96-103.
- Matsubara, S., Rodriguez-Amaya, D. B. 2006. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26 (2), 380-385.
- Mazzafera, P. 2003. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. *Revista Brasileira de Botânica*, 26 (2), 231-238.
- McGinty, D., Letizia, C.S., Api, A.M. 2010. Fragrance material review on phytol. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 59-63.
- Mckay, D. L., Blumberg, J. B. 2006. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytotherapy Research*, 20, 519–30.
- Medeiros, E. S., Rodrigues, I. B., Litaiff-Abreu, E., Pinto, A. C. S., Tadei, W. P. 2013. Larvicidal activity of clove (*Eugenia caryophyllata*) extracts and eugenol against *Aedes aegypti* and *Anopheles darlingi*. *African Journal of Biotechnology*, 12 (8), 836-840.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J. , Parajó, J. C. 2001. Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145-171.
- Mothé, C. G., Azevedo, A. D. Análise Térmica de Materiais. São Paulo: Editora Artliber, 2009.
- Nascimento, G. G. F., Locatelli, J., Freitas, P. C., Silva, G. L. 2000. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 247-256.
- Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., Trevisan, M. T. S. 2009. Vegetals as natural sources of antioxidants. *Química Nova*, 32 (3), 689-702.
- Panizza, S., Rocha, A. B., Gecchi, R., Silva, R. S., Penteado, R. 1988. *Stryphnodendron barbatiman* (Vellozo) Martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, 10, 101-106.
- Parejo, I., Jauregui, O., Sánchez-Rabaneda, F., Viladomat, F., Bastida, J., Codina, C. 2004. Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3679-3687.

- Peron, A. P., Marcos, M. C., Cardoso, S. C., Vicentini, V. E. P. 2008. Avaliação do potencial citotóxico dos chás de *Camellia sinensis* L. e *Cassia angustifolia vahl* em sistema teste vegetal. *Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar*, 12, 51-4.
- Pimenta, D. S., Figueiredo, M. R., Kaplan, M. A. C. 2006. Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli (Chapéu de couro). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78 (4), 623-628.
- Pizzale, L., bortolomeazzi, R., Vichi, S., Uberegger, E., Conte, L. S. 2002. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. indercedens*) extracts related to their phenolic compound content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1645-1651.
- Reddy, C. V. K., Sreeramulu, D., Raghunath, M. 2010. Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Research International*, 43 (1), 285–288.
- Santos, N. A., Cordeiro, A. M. T. M., Damasceno, S. S., Aguiar, R. T., Rosenhaim, R., Carvalho Filho, J. R., Santos, I. M. G., Maia, A. S., Souza, A. G. 2012. Commercial antioxidants and thermal stability evaluations. *Fuel*, 97, 638-643.
- Santos, S. C., Wesley, F. C., Ribeiro, J. P., Guimarães, D. O., Ferri, P. H., Ferreira, H. D., Seraphin, J. C. 2002. Tannin composition of barbatimão species. *Fitoterapia*, 73, 292-299.
- Shahidi, F. 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, 44 (3), 158-163.
- Shan, B., CAI, Y. Z., Sun, M., Corke, H. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 7749-7759.
- Singleton, V. L., Rossi, J. R. J. A. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–58.
- Tang, L., Zirpoli, G. R., Guru, K., Moysich, K. B., Zhang, Y., Ambrosone, C. B., McCann, S. E. 2008. Consumption of raw cruciferous vegetables is inversely associated with bladder cancer risk. *Cancer Epidemiology Biomarkers e Prevention*, 17 (4), 938-944.
- Tirapelli, C. R., Ambrosio, S. R., Oliveira, A. M., Tostes, R. T. 2010. Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: A therapeutic promise for the treatment of hypertension. *Fitoterapia*, 81, 690-702.
- Tsao, R., Yu, Q. 2000. Nematicidal activity of monoterpenoid compounds against economically important nematodes in agriculture. *Journal of Essential Oil Research*, 12, 350-354.
- Wojdyło, A., Oszmianski, J., Czemerys, R. 2007. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, 940-949.
- Yanishlieva, N. V., Marinova, E., Pokorný, J. 2006. Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipids Science and Technology*, 108 (9), 776-793.
- Zaveri, N. T. 2006. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications. *Life Sciences*, 78, 2073-2080.

Zheng, W., Wang, S. Y. 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11), 5165-5170.



Commercial antioxidants and thermal stability evaluations

Nataly A. Santos^{a,*}, Angela M.T.M. Cordeiro^{b,c}, Sarah S. Damasceno^a, Rebeca T. Aguiar^a, Raul Rosenhaim^d, José R. Carvalho Filho^a, Ieda M.G. Santos^a, Ary S. Maia^a, Antonio G. Souza^a

^a Departamento de Química, CCEN, Universidade Federal da Paraíba, 58059-9000 João Pessoa, Paraíba, Brazil

^b Departamento de Engenharia de Alimentos, CT, Universidade Federal da Paraíba, 58059-9000 João Pessoa, Paraíba, Brazil

^c Instituto Federal do Amazonas, 69020-120 Amazonas, Brazil

^d Departamento de Engenharia Química, CT, Universidade Federal da Paraíba 58059-9000, João Pessoa, Paraíba, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 October 2011

Received in revised form 27 January 2012

Accepted 30 January 2012

Available online 14 February 2012

Keywords:

Antioxidants

Thermal analysis

Thermal stability

Oxidation stability

ABSTRACT

Synthetic and natural antioxidants are used in the biodiesel and food industries to increase product shelf lives. Rancimat, which is regulated by EN 14112, is the official analytical method used to determine the oxidation stability of biodiesel, oils and fats. It involves subjecting samples to a temperature of 110 °C for prolonged periods. Some antioxidants decompose or volatilize below 110 °C, leading to false results. A TG/DTA technique with both dynamic and isothermal (110 °C) analysis methods was used to evaluate the thermal stability of commercial antioxidants. Synthetic antioxidants exhibited thermal resistances in the following order: PG > TBHQ > BHA > BHT. Initial thermal decomposition temperatures were lower than 110 °C, and BHT, BHA and TBHQ volatilized during the first few hours of the analysis. Natural antioxidants are resistant to heat and displayed stabilities in the following order: α -tocopherol > caffeic acid > ferulic acid > gallic acid. Subjecting chelating agents to a temperature of 110 °C for prolonged periods resulted in the following order of thermal stabilities: ascorbic acid > citric acid > EDTA. The initial thermal decomposition temperatures for both gallic acid and EDTA were lower than 110 °C.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Oils and fats with high contents of unsaturated fatty acids are highly susceptible to oxidation. Exposure to air, heat, light or metal contaminants accelerates oxidative reactions [1,2]. The reaction products are primarily aldehydes, ketones, acids, peroxides, and polymers that affect the physical and chemical properties of the oils [2]. Biodiesels derived from such oils and fats are also prone to oxidation [3]. The oxidation of biodiesels during storage affects the physical and chemical properties of the fuels and may cause engine malfunctions [4].

Antioxidants are used to increase the oxidation induction period or decrease the rate of oxidation [1]. The actions of antioxidants have been extensively studied [5–8], and they can be functionally classified as primary, biological, or mixed antioxidants, synergists, oxygen removers, or chelators [4,8]. Primary antioxidants promote the removal or inactivation of free radicals in the initiation and propagation stages of the oxidation by donating hydrogen atoms to interrupt the chain reaction [3,4,8]. Synergists are substances with little or no antioxidant activity, but they may increase the activity of primary antioxidants when used in an appropriate combination [8].

BHA, BHT, TBHQ and PG are the synthetic antioxidants that are most commonly used in industry [8,9]. Among the most widely used natural antioxidants are the tocopherols and phenolic acids [10,11]. Citric acid and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) salts are the main chelating agents used [8,12]. The same industrial antioxidants used in oils and fats have also been studied and used for biodiesel fuels [13–17].

Maia et al. [4] evaluated the stability of soybean biodiesel when fortified with either pure or mixed BHA, BHT and TBHQ by using a centric simplex plan. The results showed that BHA and TBHQ generally offered a higher degree of protection, both separately and in mixtures, with induction periods of up to 6 h at 110 °C.

Other researchers [18,19] have examined phenolic acids as potential replacements for synthetic antioxidants, which are widely used in lipidic food storage. Phenolic compounds are powerful antioxidants that can prevent the oxidative deterioration of polyunsaturated fatty acids. Among these compounds, caffeic and ferulic acids are widely recognized as natural antioxidants [18,20].

The official analytical method used to determine the oxidative stability of biodiesels, oils, and fats is the Rancimat EN 14112 standard, which measures the induction period (IP) [21]. The American (ASTM D 6751-11b) [22] and European (EN 14214) [23] standards specify 3 h and 6 h, respectively, as the minimum IP limits for which biodiesel must resist oxidation.

Researchers have used the Rancimat method to optimize the amounts of antioxidants necessary to achieve the limits specified

* Corresponding author. Tel./fax: +55 8332167441.

E-mail address: natalyjp@gmail.com (N.A. Santos).

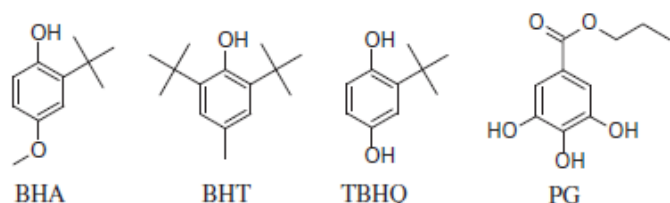


Fig. 1. Structure of synthetic antioxidants.

by the international standards for commercialized products [4,14]. The oxidation process is accelerated by temperature and oxygen in the air. In this method, the sample is heated to 110 °C, and air flow of 10 L h⁻¹ is injected. Any oxidation products formed are sent to a conductivity cell containing deionized water. The induction time is determined by the inflection point of the conductivity curve [24]. Some antioxidants volatilize or decompose at this temperature, leading to a false IP [17,20]. The aims of this study were to analyze the thermal profiles of commercial antioxidants, determine the initial temperatures of decomposition and measure the time it takes to decompose or vaporize these compounds at 110 °C.

2. Materials and methods

2.1. Antioxidants

TBHQ, BHT, BHA, PG, α -tocopherol, caffeic acid and ferulic acid were obtained from Sigma–Aldrich. L-(+)-Ascorbic acid and gallic acid were obtained from VETEC. EDTA was obtained from F. Maia. Citric acid was obtained from Cargill.

2.2. Thermal analysis

Non-isothermal thermogravimetric curves (TG) were obtained on a Shimadzu Thermal Analyzer, Simultaneous DTA-TG, DTG model H-60, in a synthetic air atmosphere at a heating rate of 20 °C min⁻¹. Approximately 10 mg of sample was heated over a temperature range of 25–1000 °C. Differential thermal analysis (DTA) curves were obtained simultaneously.

Samples that showed mass variation before 110 °C using the non-isothermal method were analyzed by the isothermal method. The TG curves in the isothermal mode were obtained on a Shimadzu Thermal Analyzer, Simultaneous DTA-TG, DTG model H-60, in a synthetic air atmosphere, using approximately 10 mg of sample. The following heating schedule was used: an initial heating rate of 10 °C min⁻¹ was maintained until the temperature reached 100 °C, followed by a rate of 2 °C min⁻¹ until reaching 110 °C, at which point the isotherm measurement was performed.

3. Results and discussion

3.1. Synthetic antioxidants

BHA, BHT, TBHQ and PG are the most commonly used synthetic antioxidants in the biodiesel and food industries (Fig. 1). The structures of these phenolic compounds allow for the donation of hydrogen atoms protons to free radicals, thus inhibiting the oxidative process [25].

In the dynamic method, the thermogravimetric curves for BHA, BHT and TBHQ (Fig. 2a–c) indicated that mass loss is initiated at temperatures lower than 100 °C (Table 1), and each compound

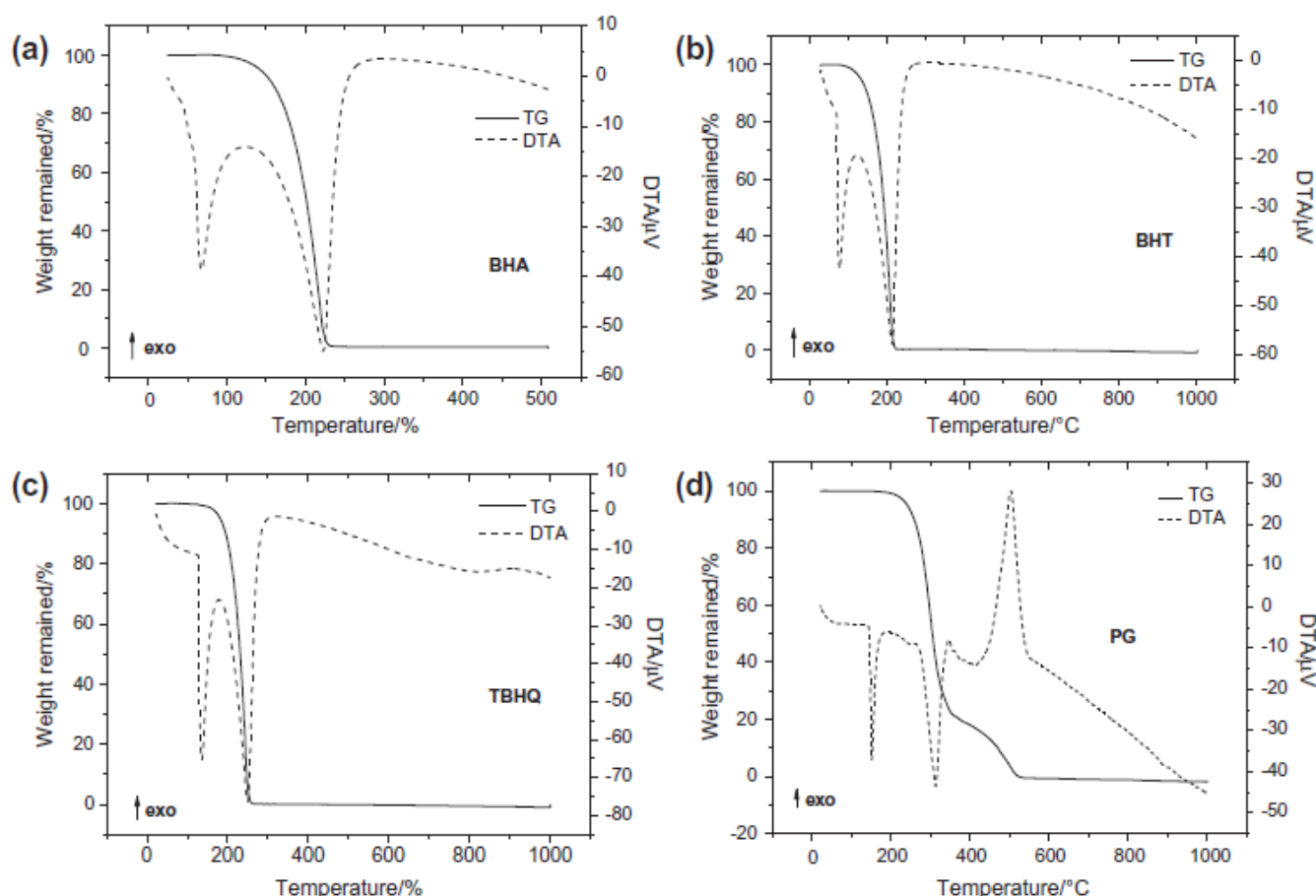


Fig. 2. TGA/DTA dynamic (a) BHA, (b) BHT, (c) TBHQ and (d) PG.

Table 1

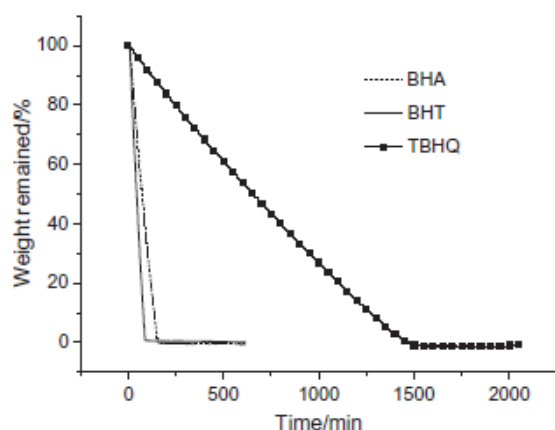
Values obtained from dynamic and isothermal TG curves.

Antioxidants	Dynamics			Isothermal (110 °C)	
	Steps	Temperature (°C)	Δm (%)	Time (min)	Δm (%)
BHA	1 st	85–239	100	155	100
BHT	1 st	71–235	100	90	100
TBHQ	1 st	98–272	100	1500	100
PG	1 st	184–388	81	–	–
	2 nd	388–549	19	–	–

Table 2

Values obtained from DTA curves.

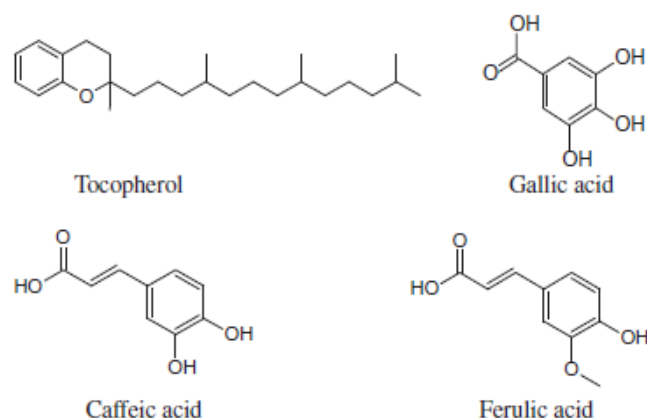
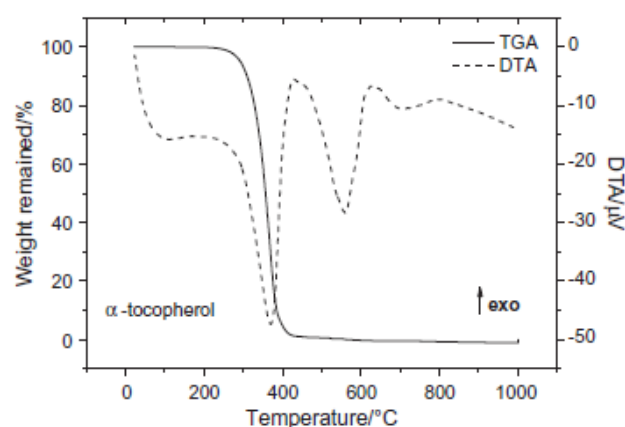
Antioxidants	Transition	Process	Temperature (°C)
BHA	1 st	Endo	68
	2 nd	Endo	222
BHT	1 st	Endo	78
	2 nd	Endo	214
TBHQ	1 st	Endo	136
	2 nd	Endo	250
PG	1 st	Endo	152
	2 nd	Endo	314
	3 rd	Exo	504

**Fig. 3.** Isothermal TG curves of BHA, BHT and TBHQ.

showed a single-step thermal decomposition. The complete evaporation/decomposition of these three antioxidants was observed at 250 °C. Due to its chemical structure, the antioxidant PG had a distinct thermal profile, exhibiting greater thermal resistance, an initial decomposition temperature of 184 °C and a two-step decomposition.

The DTA curves (Fig. 2a–c) for BHA, BHT and TBHQ showed two endothermic transitions. The first is due to fusion of the antioxidants and does not involve a mass variation. The second transition is due to volatilization and/or decomposition (Table 2). The curve for PG (Fig. 2d) also shows these two endothermic transitions, but these are followed by an exothermic transition due to the combustion of the compound at higher temperatures.

Fig. 3 shows the thermal profile at 110 °C for BHA, BHT and TBHQ. The times required for the complete vaporization of BHT, BHA and TBHQ were 90 min, 155 min and 1500 min, respectively (Table 1). The heat resistance decreases in the order PG > TBHQ > BHA > BHT, which corroborates the Rancimat data obtained for antioxidant protection using an accelerated oxidation method, as seen in the literature [4,14]. This shows the necessity of knowing the thermal profile of an antioxidant when using accelerated methods, which can lead to unreliable results under some analytical conditions.

**Fig. 4.** Structure of antioxidants.**Fig. 5.** Curves TG/DTA dynamics of α -tocopherol.

These results show that BHT and BHA should volatilize during the early hours of analysis for accelerated tests such as the Rancimat method at 110 °C, as emphasized by Karavalakis and Stourmas [16]. Thus, we suggest modifying the method so that it can be performed at lower temperatures. Another possibility would be the use of the P-DSC and petroOxy methods, in which the tests are conducted under increased pressures [26,27]. These methods have already been discussed in the literature as faster alternatives to the Rancimat method, and in the case of the P-DSC method, smaller amounts of the samples are required [28,29].

An additional problem is encountered when using these antioxidants in frying oils. Because of their volatility, these antioxidants do not guarantee the right levels of protection when the oils are subjected to the thermal stress of frying [8]. The safety of these synthetic antioxidants has also been questioned because of their toxic and carcinogenic effects in animals and humans. TBHQ, for example, is not permitted in Canada or the European Economic Community because of its role in hemoglobin count reductions and basal cell hyperplasia [8]. The volatility and instability of synthetic antioxidants at high temperatures has driven the industry to examine natural antioxidants as an alternative [1].

3.2. Natural antioxidants

The most widely used natural antioxidants are the tocopherols, phenolic acids and plant extracts (Fig. 4).

The thermogravimetric profile for α -tocopherol (Fig. 5) shows an initial loss of mass at a temperature of 199 °C and exhibits three stages of mass variation. The first and most significant stage should

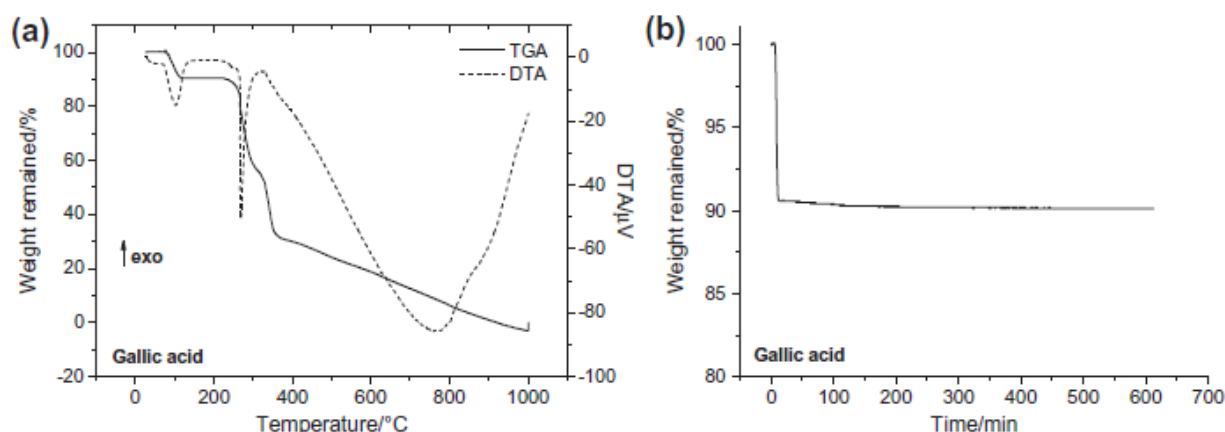


Fig. 6. Gallic acid (a) TGA/DTA dynamic and (b) isothermal TG curve.

Table 3

Values obtained curves TG/DTA.

Antioxidants	TG – dynamic			DTA		
	Steps	Temperature (°C)	Δm (%)	Transition	Process	Temperature (°C)
α -tocopherol	1 st	199–432	99	1 st	Endo	371
	2 nd	432–800	1	2 nd	Endo	561
Gallic acid	3 rd			3 rd	Endo	707
	1 st	68–123	9	1 st	Endo	102
	2 nd	213–311	34	2 nd	Endo	268
	3 rd	311–375	25	3 rd	Endo	766
Ferulic acid	4 th	375–996	32			
	1 st	147–268	75	1 st	Endo	177
	2 nd	268–407	12	2 nd	Endo	240
	3 rd	407–492	11	3 rd	Endo	348
Caffeic acid	4 th	492–606	2	4 th	Endo	386
				5 th	Endo	471
				6 th	Exo	553
				1 st	Endo	222
	1 st	170–246	30	2 nd	Endo	312
	2 nd	246–394	39	3 rd	Endo	368
	3 rd	394–570	31	4 th	Exo	535

Table 4

Values obtained curves TG/DTA.

Antioxidants	TG – dynamic			DTA		
	Steps	Temperature (°C)	Δm (%)	Transition	Process	Temperature (°C)
Citric acid	1 st	148–310	92	1 st	Endo	162
	2 nd	310–750	8	2 nd	Endo	221
				3 rd	Endo	459
				4 th	Endo	685
Ascorbic acid	1 st	186–248	40	1 st	Endo	195
	2 nd	248–466	30	2 nd	Exo	224
	3 rd	466–653	30	3 rd	Exo	537
				4 th	Endo	616
EDTA	1 st	90–215	10	1 st	Endo	188
	2 nd	237–330	23	2 nd	Endo	256
	3 rd	330–441	27	3 rd	Endo	332
	4 th	441–759	12	4 th	Exo	387
	5 th	759–1000	3	5 th	Exo	427
				6 th	Exo	636
				7 th	Exo	858
				8 th	Exo	876

be associated with the endothermic processes of decomposition and/or volatilization of the sample, as shown in the differential thermal analysis curve. This antioxidant is thermally resistant and can be used in accelerated oxidation tests.

3.3. Phenolic acids

The phenolic acids are structurally characterized by the presence of a benzene ring, a terminal carboxylic acid, and one or more

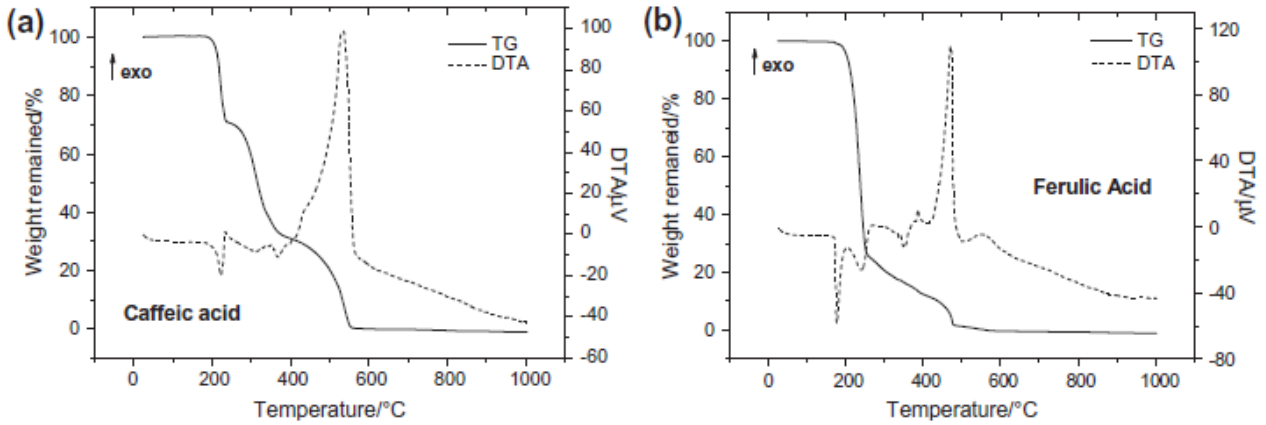


Fig. 7. Curves TG/DTA dynamics of caffeic acid (a) and ferulic acid (b).

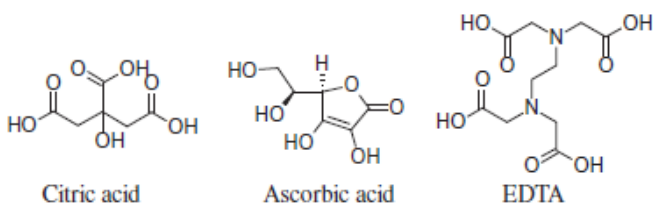


Fig. 8. Structure of chelating agents.

hydroxy or methoxy groups, all of which confer anti-oxidative properties [8].

Gallic acid (Fig. 6a) had an initial thermal decomposition temperature of 68 °C, at which point 9% of the mass was lost (Table 3). In the isothermal mode at 110 °C (Fig. 6b), the time required for the gallic acid to lose 9% of its mass was 13 min, after which the mass remained stable for 10 h. This first mass-loss event is attributed to the water content according to Galvez et al. [30]. These authors also argued that gallic acid undergoes a facile thermal decarboxylation to produce pyrogallol. Thus, the second event, at 213 °C, corresponds to the liberation of carbon dioxide upon heating. The third event, at 316 °C, probably corresponds to the further loss of hydroxyl groups. Finally, the fourth peak corresponds to the residual decomposition of gallic acid [30].

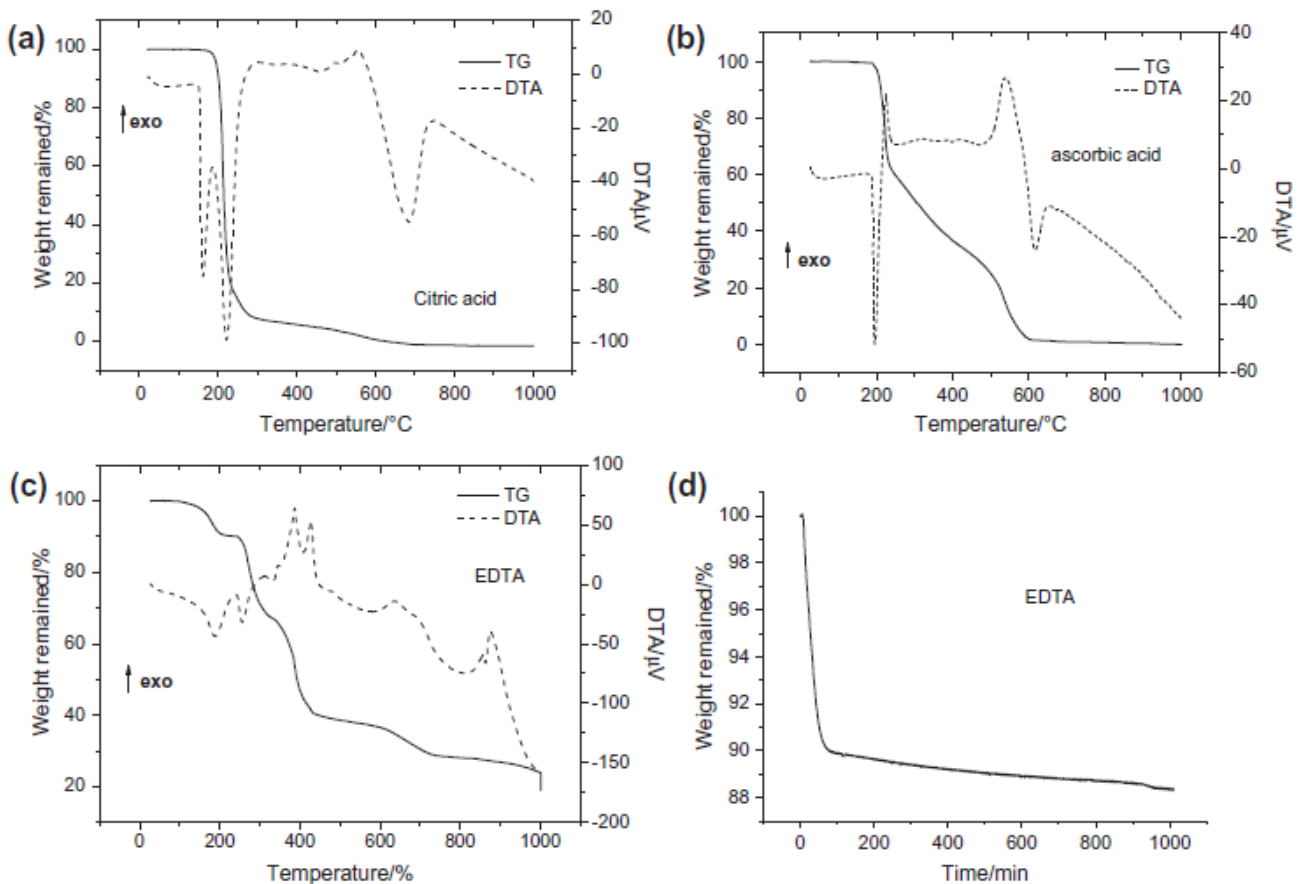


Fig. 9. Curves TG/DTA dynamic (a) citric acid, (b) ascorbic acid, (c) EDTA. Isothermal TG curve (d) EDTA.

These results show that in accelerated tests, such as the standard Rancimat method at 110 °C, gallic acid volatilized within a few minutes of analysis but kept its antioxidant activity.

The thermal profiles of ferulic and caffeic acid (Fig. 7) showed 3 and 4 phases of thermal decomposition, respectively. The initial mass-loss temperatures were 170 °C for caffeic acid and 147 °C for ferulic acid (Table 3).

The thermal stability of these phenolic acids decreases in the following order: caffeic acid > ferulic acid > gallic acid. Phenolic acids are efficient antioxidants; they act as radical scavengers and sometimes as metal chelators, disrupting both the initiation stages and the oxidative propagation [8]. Studies have shown that the antioxidant activity of these compounds is due to their catechol and carboxylate groups, which offer two potential sites for chelation [31,32].

3.4. Metal deactivators

Citric acid, EDTA and ascorbic acid (Fig. 8) are commonly used to increase the shelf life of foods containing lipids due to their chelating properties.

Fig. 9 shows the thermal profiles of citric acid, ascorbic acid and EDTA. Both citric acid and ascorbic acid showed an initial thermal decomposition temperature that was higher than 110 °C (Table 4). For EDTA, 10% of the mass was lost in the initial decomposition step, which occurred at 90 °C. It took 60 min to volatilize 10% of the EDTA with the isothermal method at 110 °C. Citric acid and ascorbic acid are resistant to the Rancimat method, and the thermal stability of these compounds decreases in the following order: ascorbic acid > citric acid > EDTA.

4. Conclusion

The commercial synthetic antioxidants that were evaluated by TG/DTA showed initial decomposition temperatures lower than 110 °C, except for PG. The thermal resistance of these compounds decreased in the following order: PG > TBHQ > BHA > BHT. BHA and BHT exhibited total mass losses after 90 and 155 min, respectively, of being subjected to the isothermal tests at 110 °C. The higher heat resistances observed for the natural antioxidants were found to decrease in the following order: α -tocopherol > caffeic acid > ferulic acid > gallic acid. Gallic acid showed an initial thermal decomposition temperature of less than 110 °C. The order for the thermal stabilities of the chelating agents was ascorbic acid > citric acid > EDTA. Citric acid and ascorbic acid exhibited initial thermal decomposition temperatures that were higher than 110 °C.

Antioxidants that have initial mass-loss temperatures of less than or equal to 110 °C may produce false results when evaluated by the Rancimat method. Thus, we suggest modifying the standard method, either by normalizing to low temperatures or by using the high-pressure P-DSC and petroOxy methods, in which volatilization of the antioxidants would be decreased.

References

- Chirinos R, Huamán M, Betalletez-Pallardel I, Pedreschi R, Capos D. Characterisation of phenolic compounds of inca muña (*Clinopodium bolivianum*) leaves and the feasibility of their application to improve the oxidative stability of soybean oil during frying. *Food Chem* 2011;128:711–6.
- Wang H, Liu F, Yang L, Zu Y, Wang H, Qu S, et al. Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage. *Food Chem* 2011;128:93–9.
- Jain S, Sharma MP. Thermal stability of biodiesel and its blends: a review. *Renew Sust Energy Rev* 2011;15:438–48.
- Maia ECR, Borsato D, Moreira I, Spacino KR, Rodrigues PRP, Gallina AL. Study of the biodiesel B100 oxidative stability in mixture with antioxidants. *Fuel Process Technol* 2011;92:1750–5.
- Almeida ES, Portela FM, Sousa RFM, Daniel D, Terrones MGH, Richter EMR, et al. Behavior of the antioxidant tert-butyl hydroquinone on the storage stability and corrosive character of biodiesel. *Fuel* 2011;90:3480–4.
- Liang YC, May CY, Foon CS, Ngan MA, Hock CC, Basiron Y. The effect of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of palm diesel. *Fuel* 2006;85:867–70.
- Yettella RR, Henbest B, Proctor A. Effect of antioxidants on soy oil conjugated linoleic acid production and its oxidative stability. *J Agric Food Chem* 2011;59:7377–84.
- Ramallo VC, Jorge N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim Nova* 2006;29:755–60.
- Guzman R, Tang H, Salley S, Simon Ng KY. Synergistic effects of antioxidants on the oxidative stability of soybean oil and poultry fat-based biodiesel. *J Am Oil Chem Soc* 2009;86:459–67.
- Wojdylo A, Oszmiański J, Czemerys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chem* 2007;105:940–9.
- Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 2006;99:191–203.
- Wyrzykowski D, Hebanowska E, Nowak-Wicz G, Makowski M, Chmurski L. Thermal behavior of citric acid and isomeric aconitic acids. *J Therm Anal Calorim* 2011;104:731–5.
- Mittelbach M, Schober S. The influence of antioxidants on the oxidation stability of biodiesel. *J Am Oil Chem Soc* 2003;80:817–23.
- Jain S, Sharma MP. Oxidation stability of blends of jatropha biodiesel with diesel. *Fuel* 2011;90:3014–20.
- Xin J, Imahara H, Saka S. Kinetics on the oxidation of biodiesel stabilized with antioxidant. *Fuel* 2009;88:282–6.
- Karavalakis G, Stournas S. Impact of antioxidant additives on the oxidation stability of diesel/biodiesel blends. *Energy Fuels* 2010;24:3682–6.
- Waynick JA. Characterization of biodiesel oxidation and oxidation products. CRC Project No. AVFL-2b; 2005.
- Medina I, Undeland I, Larsson K, Storror I, Rustad T, Jacobsen C, et al. Activity of caffeic acid in different fish lipid matrices: a review. *Food Chem* 2012;131:730–40.
- Michotte D, Rogez H, Chirinos R, Mignolet E, Campos D, Larondelle Y. Linseed oil stabilisation with pure natural phenolic compounds. *Food Chem* 2011;129:1228–31.
- Santos NA, Damasceno SS, Araujo PHM, Marques VC, Rosenhaim R, Fernandes Jr VJ, et al. Caffeic acid: an efficient antioxidant for soybean biodiesel contaminated with metals. *Energy Fuels* 2011;25:4190–4.
- European Committee for Standardization (CEN). EN 14112 Fat and oil derivatives – fatty acid methyl esters (FAME) – determination of oxidation stability (accelerated oxidation test). German; 2003.
- American Society for Testing and Materials (ASTM). ASTM D6751–11b. Standard specification for biodiesel fuel blend stock (B100) for middle distillate fuels. West Conshohocken (PA): ASTM; 2011. doi: <10.1520/D6751-11B>.
- European Committee for Standardization (CEN). EN 14214 automotive fuels – fatty acid methyl esters (FAME) for diesel engines – requirements and test methods. Brussels (Belgium): CEN; 2010.
- Jain S, Sharma MP. Review of different test methods for the evaluation of stability of biodiesel. *Renew Sust Energy Rev* 2010;14:1937–47.
- Jain S, Sharma MP. Study of oxidation stability of jatropha curcas biodiesel/diesel blends. *Int J Energy Environ* 2011;2:533–42.
- Araújo SV, Rocha BS, Luna FMT, Rola Jr EM, Azevedo DCS, Cavalcante Jr CLC. FTIR assessment of the oxidation process of castor oil FAME submitted to petroOxy and Rancimat methods. *Fuel Process Technol* 2011;92:1152–5.
- Pentao MB, Albuquerque AR, Barros AK, Rodrigues Filho MG, Antoniosi Filho NR, Sinfrônio FSM, et al. Evaluation of the oxidative stability of corn biodiesel. *Fuel* 2011;90:773–8.
- Moser BR. Comparative oxidative stability of fatty acid alkyl esters by accelerated methods. *J Am Oil Chem Soc* 2009;86:699–706.
- Araújo SV, Luna FMT, Rola Jr EM, Azevedo DCS, Cavalcante Jr CLC. A rapid method for evaluation of the oxidation stability of castor oil FAME: influence of antioxidant type and concentration. *Fuel Process Technol* 2009;90:1272–7.
- Galvez JMG, Fechtal M, Riedl B. Gallic acid as a model of tannins in condensation with formaldehyde. *Therm Acta* 1996;274:149–63.
- Boillet L, Cornard JP, Lapouge C. Determination of the chelating site preferentially involved in the complex of lead(II) with caffeic acid: a spectroscopic and structural study. *J Phys Chem A* 2005;109:1952–60.
- Cornard JP, Lapouge C. Theoretical and spectroscopic investigations of a complex of Al(III) with caffeic acid. *J Phys Chem A* 2004;108:4470–8.

Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract

Thermal study and evaluation of the antioxidant effect on vegetable oils

A. M. T. M. Cordeiro · M. L. Medeiros ·
N. A. Santos · L. E. B. Soledade · L. F. B. L. Pontes ·
A. L. Souza · N. Queiroz · A. G. Souza

Received: 3 September 2012 / Accepted: 10 October 2012
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2012

Abstract The restriction to the use of synthetic antioxidants has fostered the research on natural antioxidants, taking into account that the prolonged usage of these substances can harm seriously the human being provoking degenerative diseases. In the present study, the antioxidant effect of the ethanolic rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract on the oxidative stability of edible vegetable oils was investigated by means of the pressurized differential scanning calorimetry (PDSC) and oven test techniques. The rosemary extract, at the concentration of 2,000 mg kg⁻¹, as well as the synthetic antioxidant *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) at the concentrations of 100 and 200 mg kg⁻¹ were added to samples of sunflower oil, corn oil, and soybean oil. The fatty acid profiles of the vegetable oils were determined by gas chromatography–mass spectrometry confirming the elevated contents of unsaturated fatty acids. The thermogravimetric analysis showed that the rosemary extract is stable at the frying temperature of the oils. The results of the oxidative stability demonstrated that the

extract of *Rosmarinus officinalis* displayed a more effective protective action in the PDSC technique, when compared with the synthetic antioxidant TBHQ, indicating that it is a promising source of natural antioxidants for edible vegetable oils.

Keywords Rosemary extract · Edible oils · PDSC · TG · Oxidative stability

Introduction

Edible oils contain polyunsaturated fatty acids, which are important substances on the biological and nutritional points of view. In relation to the chemical structure, fatty acids present double bonds that make them prone to oxidative reactions. Such reactions may compromise their stability, causing modifications in the organoleptic, nutritional and functional properties, besides giving rise to chemical compounds which are harmful to the human health [1].

The lipid oxidation is commonly controlled by the addition of antioxidants [1, 2]. The synthetic antioxidants butylated hydroxyanisole (BHA), *tert*-butylhydroquinone (TBHQ), propyl gallate (PG), 2,4,5-trihydroxybutyrophenone (THBP), di-*tert* butyl-4-hydroxymethylphenol (IONOX-100) are widely employed by the industry [2, 3] due to their low cost and good performance. However, the prolonged usage of these substances can cause serious harms to the human being, provoking degenerative diseases [4]. Thus, natural sources of antioxidants [5] have been a feasible alternative to face the inconveniences caused by synthetic antioxidants.

Among the diverse classes of antioxidant substances of natural occurrence, the phenolic compounds have received

A. M. T. M. Cordeiro (✉)
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, CT, Campus I, Universidade Federal da Paraíba,
João Pessoa, PB, Brazil
e-mail: atribuzycordeiro@gmail.com

M. L. Medeiros · N. A. Santos
Programa de Pós-Graduação em Química, CCEN, Campus I,
Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

L. E. B. Soledade
Campus de Pinheiro, Universidade Federal do Maranhão,
Pinheiro, MA, Brazil

L. F. B. L. Pontes · A. L. Souza · N. Queiroz · A. G. Souza
Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM),
Departamento de Química, CCEN, Universidade Federal da
Paraíba, Campus I, João Pessoa, PB, Brazil

much attention in the last years, chiefly as they inhibit *in vivo* and *in vitro* lipid oxidation [2, 6].

Foods such as fruits, herbs, and cereals are among the sources of natural antioxidants that have been quite utilized [7, 8]. In relation to herbs, the extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) has pointed out as it displays an elevated antioxidant power and provides an excellent protection factor in the oxidative stability of lipid matrices [9]. This activity is associated to the presence of phenolic acids, flavonoids, diterpenoids, and phenolic triterpenes [10].

Therefore, the present study had an objective to evaluate the antioxidant efficiency of rosemary extract, in vegetable oils, by means of accelerated methods of assessing the oxidative stability, namely PDSC and oven test.

Experimental

Materials

Refined vegetable oils (sunflower, corn, and soybean) and dried rosemary leaves were acquired from the local market. According to the manufacturer specifications, the vegetable oil samples were free from antioxidants. The synthetic antioxidant TBHQ (*tert*-butylhydroquinone) was supplied by Sigma Aldrich and the remaining reagents and solvents, of analytical degree, by FMAIA.

Methods

Preparation of the antioxidant extracts

The rosemary extract was obtained from 170.3 g of dried and crushed leaves, submerged in 960 mL of ethanol for a period of 15 days at room temperature. A filtration was carried to separate the plant residue and then the extract was concentrated by rotoevaporation at temperature 78 °C, obtaining 27.8 g of dry extract, corresponding to a 16.3 % yield. The extract was stored in a glass container, protected from light and room temperature up to the moment of being utilized.

Thermal analyses

The thermogravimetric curves (TG/DTA) of the rosemary extract were obtained in a model DTG-60H simultaneous thermal analyzer from Shimadzu. The tests non-isothermic were carried out using about 10 mg samples in an alumina pan and synthetic air atmosphere, with a flow rate of 50 mL min⁻¹, heating rate of 10 °C min⁻¹, and temperature range of 25–1,000 °C. The isothermal curves were obtained in a synthetic air atmosphere, using approximately 10 mg of sample in an alumina pan, with a flow rate of

50 mL min⁻¹. The following heating schedule was used: an initial heating rate of 10 °C min⁻¹ was maintained until the temperature reached 100 °C, followed by a rate of 2 °C min⁻¹ until reaching 110 °C, at which point the isotherm measurement was performed.

Determination of the fatty acid profiles of the vegetable oils

The vegetable oils were transesterified according to the IUPAC standard method 2.301 [11]. The esters were analyzed by a Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC–MS) apparatus model GCMS-QP2010 from Shimadzu, equipped with a split injector.

Preparation of the oil samples, with and without additives

The rosemary extract at the concentration of 2,000 mg kg⁻¹, and also the synthetic antioxidant TBHQ at the concentrations of 100 and 200 mg kg⁻¹, were added to the samples of sunflower, corn, and soybean oils. Table 1 shows the codes used for the samples of vegetable oils, with and without additives.

Pressurized differential scanning calorimetry

The PDSC curves of the samples were obtained by means of a pressurized differential scanning calorimeter, PDSC, model DSC Q1000 equipment from TA Instruments, coupled to a pressure cell. The tests were performed in the isothermal mode (110 °C) utilizing an aluminum pan of approximately 10 mg sample, under an oxygen atmosphere with initial pressure of 203 psi (roughly 1,400 kPa) and heating rate of 10 °C min⁻¹.

Table 1 Vegetable oil samples used in the oxidative stability tests and oven tests

Sample	Code
Sunflower oil	SFO
Sunflower oil + TBHQ 100	TSFO 100
Sunflower oil + TBHQ 200	TSFO 200
Sunflower oil + rosemary extract	RSFO
Corn oil	CO
Corn oil + TBHQ 100	TCO 100
Corn oil + TBHQ 200	TCO 200
Corn oil + rosemary extract	RCO
Soybean oil	SBO
Soybean oil + TBHQ 100	TSBO 100
Soybean oil + TBHQ 200	TSBO 200
Soybean oil + rosemary extract	RSBO

Oven test

The accelerated tests in an oven with air circulation were conducted for 29 days at the temperature of $60 \pm 5^\circ\text{C}$. A volume of 35 mL of each sample was placed in a glass container. The containers were maintained within the oven to allow the direct contact with air. At intervals of 7 days, aliquots from the samples were taken and were analyzed to perform the following physico-chemical tests: acid value, peroxide value, conjugated dienes, according to the methods NBR 11115 ABNT [12], Cd 8-53 AOCS, and Ti 1a-64 AOCS [13], respectively. The absorbance was measured using a model UV-2550 UV-Vis Shimadzu spectrophotometer at 232 nm against a blank of isooctane.

Results and discussion

Fatty acid profile of the vegetable oils

Table 2 presents the fatty acid profile of the vegetable oils investigated.

According to the data from Table 2, it is noticed that the vegetable oils studied presented elevated amounts of unsaturated fatty acids, what agrees with the data reported in the literature [14–16].

The polyunsaturated fatty acids act in several physiological and metabolic processes. These acids are not synthesized by the human organism, thus they ought to be supplied by the food diet, for a good maintenance of health. Linoleic (18:2 ω -6) and α -linolenic (C18:3 ω -3) acids are included in this group. These two fatty acids are precursors of the polyunsaturated fatty acids of long chains from the series ω -3 and ω -6, like arachidonic acid (C20:4 ω -6) and docosahexaenoic acid (22:6 ω -3) [1].

Table 2 Fatty acid profile of the vegetable oils

Fatty acids	Common name	Percentages/%		
		Sunflower oil	Corn oil	Soybean oil
C16:0	Palmitic acid	6.3	13.2	13.8
C18:0	Stearic acid	3.8	2.3	4.6
C18:1	Oleic acid	33.1	39.2	25.5
C18:2	Linoleic acid	56.9	44.4	46.8
C18:3	Linolenic acid	–	–	4.0
Not identified—similarity <90%—NIST library		–	–	5.0
Saturated fatty acids		10.1	15.5	18.4
Monounsaturated fatty acids (MUFA)		32.6	39.2	25.5
Polyunsaturated fatty acids (PUFA)		56.9	45.3	50.8

Sunflower oil displayed the highest content of unsaturated fatty acids, 89.5 %, corresponding to 32.6 % of monounsaturated fatty acids (MUFA) and 56.9 % of polyunsaturated fatty acids (PUFA). Corn oil also showed a high content of unsaturated fatty acids, 84.5 %, displaying amounts of MUFA higher than the remaining oils and soybean oil was the one that showed the smallest amount of unsaturated fatty acids, 76.3 %.

Aued-Pimentel et al. (2009) [17], studying refined vegetable oils, found smaller contents of oleic acid (34.44–35.68 %) and linoleic acid (22.57–25.82 %) in corn oil and sunflower oil, respectively. As for the soybean oil, the amounts found for oleic acid (22.57–25.82 %) and linoleic acid (48.11–54.65 %) were similar to the values obtained in the present study.

Oxidative stability

The values of oxidative induction time (OIT), Table 3, obtained by analyzing the PDSC curves, Fig. 1, showed that corn oil is 2.6 times more stable than sunflower oil and 1.1 times more stable than soybean oil.

These results are within the expected range, as although sunflower oil did not show detectable amounts of linolenic acid, it was the vegetable oil with the highest percentage of linoleic acid. Such higher tendency to oxidation of sunflower oil was also noticed upon the application of Eq. 1. Such equation was formulated based on kinetic studies and it estimates the oxidability of a vegetable oil, from the composition of its polyunsaturated fatty acids [18]. Upon the usage of Eq. 1, the oxidability values were calculated as: sunflower oil (0.57), soybean oil (0.55), and corn oil (0.45).

$$\text{OX} = \frac{[0.02(\%O) + (\%L) + 2(\%Ln)]}{100} \quad (1)$$

Table 3 Oxidative stability of the vegetable oils obtained by the PDSC method, expressed in terms of OIT

Sample	OIT/min
SFO	65.0
RSFO	149.9
TSFO100	82.8
TSFO200	103.8
CO	168.6
RCO	285.9
TCO100	110.9
TCO200	112.7
SBO	149.7
RSBO	236.5
TSBO100	158.6
TSBO200	169.7

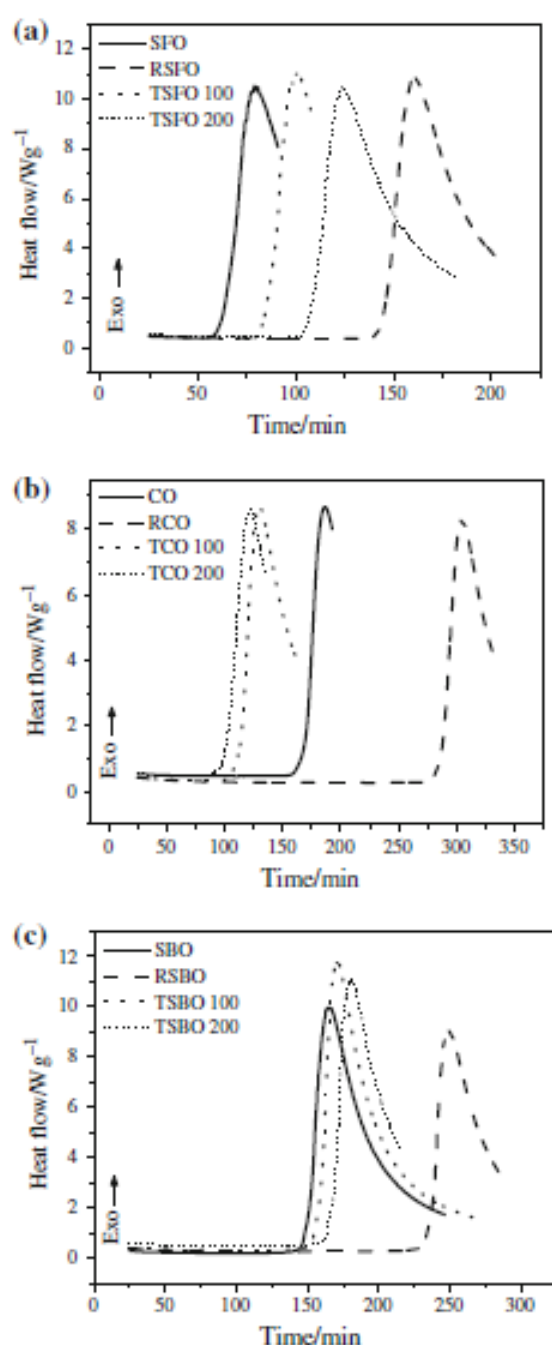


Fig. 1 PDSC curves of the samples of vegetable oils, with and without additives: **a** sunflower oil; **b** corn oil; **c** soybean oil

In which OX = oxidability of the vegetable oil/%
 % O = content of oleic acid/mass %
 % L = content of linoleic acid/mass %
 % Ln = content of linolenic acid/mass %

In the evaluation of the oxidative stability of the vegetable oils with the addition of additives, it was noticed that the antioxidant TBHQ showed a small antioxidant effect in the sunflower and soybean oils, in the two concentrations

investigated. In relation to corn oil, it displayed a pro-oxidant action, reducing the OIT values in the range from 34.2 to 33.1 %, as compared TCO100 and TCO200 samples, respectively. It should be stressed that 200 mg kg⁻¹ is the highest concentration of TBHQ allowed by the Brazilian legislation [19]. This result, however, does not indicate that TBHQ is an antioxidant that cannot be applied to corn oil; it only indicates that the experimental conditions of pressure and temperature, in the present study, were not adequate for the evaluation of the antioxidant efficiency of TBHQ to corn oil.

The oxidative stability of the vegetable oils with the addition of rosemary extract, at the concentration of 2,000 mg kg⁻¹ was also assessed. Differently to the synthetic antioxidant TBHQ, the rosemary extract showed a remarkable antioxidant action in the three vegetable oils, moreover for the case of corn oil. This promising effect of rosemary was already verified in lipid systems, using a chloroform extract of *Rosmarinus officinalis* in canola oil, by means of the accelerated methods Oxidograph and Rancimat [20].

Thermogravimetric studies have shown that the stability of several antioxidants decrease with the increase of temperature [21]. The TG/DTG curves of the rosemary extract obtained in the present study (Fig. 2a) showed that it may be a thermostable antioxidant, as it showed a mass loss of only 6 % up to 190 °C (Table 4). Such loss is probably ascribed to the presence of moisture, traces of ethanol—the solvent used to obtain the extract and volatile phenolic compounds.

The second step, from 190 to 462 °C, presented a mass loss of 88.6 %. This loss may also be attributed to the volatilization/decomposition of bioactive constituents, possibly from phenolic diterpenes, such as carnosic acid and carnosol, as well as from the rosmarinic acid.

Finally the third step, in the range from 462 to 1,000 °C, with a mass loss of 5.8 %, can be related to inorganic compounds.

In the isothermal mode at 110 °C (Fig. 2b), the time required to the rosemary extract to lose 6 % mass was of 76 min, and the remaining mass was kept stable for 9 h. This evaluation corroborated the results obtained by PDSC, showing that at the temperature of the tests, the rosemary extract remained stable and active.

Accelerated oven test

The samples submitted to aging in an oven were evaluated according to the tests: acid value, peroxide value, and conjugated dienes.

The acid values for the oil samples with and without additives varied from 0.06 to 0.4 mg KOH kg⁻¹. No meaningful changes were noticed in this parameter during

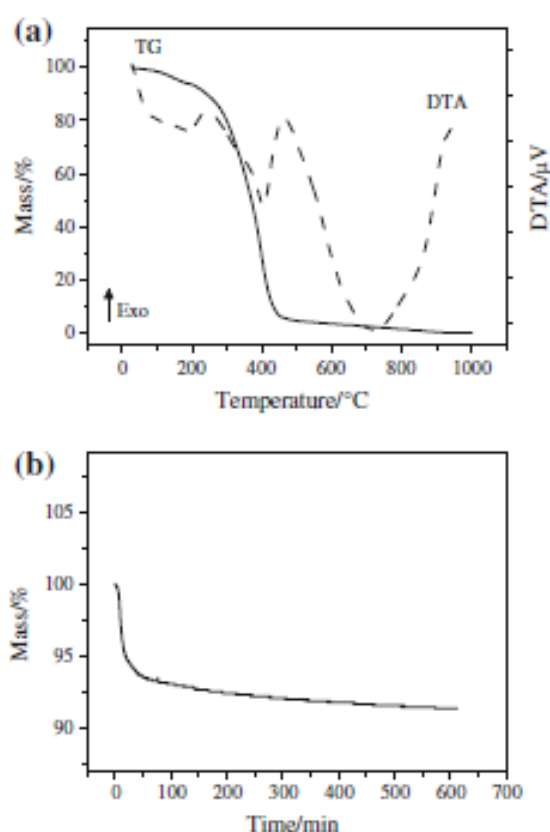


Fig. 2 TG/DTA curves and isothermal (110 °C) TG of the rosemary extract

Table 4 Values obtained curves TG/DTA of the rosemary extract

TG—Dynamic			DTA		
Step	Temperature/°C	Mass loss/%	Transition	Process	Temperature/°C
1st	56–190	6	1st	Endo	198
2nd	190–462	88.2	2nd	Endo	403
3rd	462–1,000	5.8	3rd	Endo	716

the period of evaluation for all the samples, which kept their acid values below the limit established by ANVISA of 0.6 mg KOH kg⁻¹ [22].

Figure 3 shows the increase of the peroxide values of the samples during storage. Peroxides and hydroperoxides are products that represent the beginning of the lipoxidation [1], a step in which the chain-breaker antioxidants can interrupt the process and restore the fatty acid chain.

Conversely to the acid values, the peroxide values increased during the storage. For the vegetable oils without additives, the peroxide values (PV) were no bigger than the maximum limit established by ANVISA, of 10 meq kg⁻¹ [22].

It can be noticed that the samples of soybean oil presented a small variation among the peroxide values until the 14 day of storage. Figure 3c shows that, at the end of

storage period, the rosemary extract increased the protection at 44 %, when compared to the soybean oil without additives. Besides, it is observed that the rosemary extract, for the corn oil (Fig. 3b), acted as a good antioxidant, protecting the oil with a protection factor of 60 %. The protection factor was also verified for the antioxidant TBHQ at the concentration of 100 mg kg⁻¹. In the samples of sunflower oil, both rosemary extract and TBHQ were efficient in controlling the formation of peroxide; however,

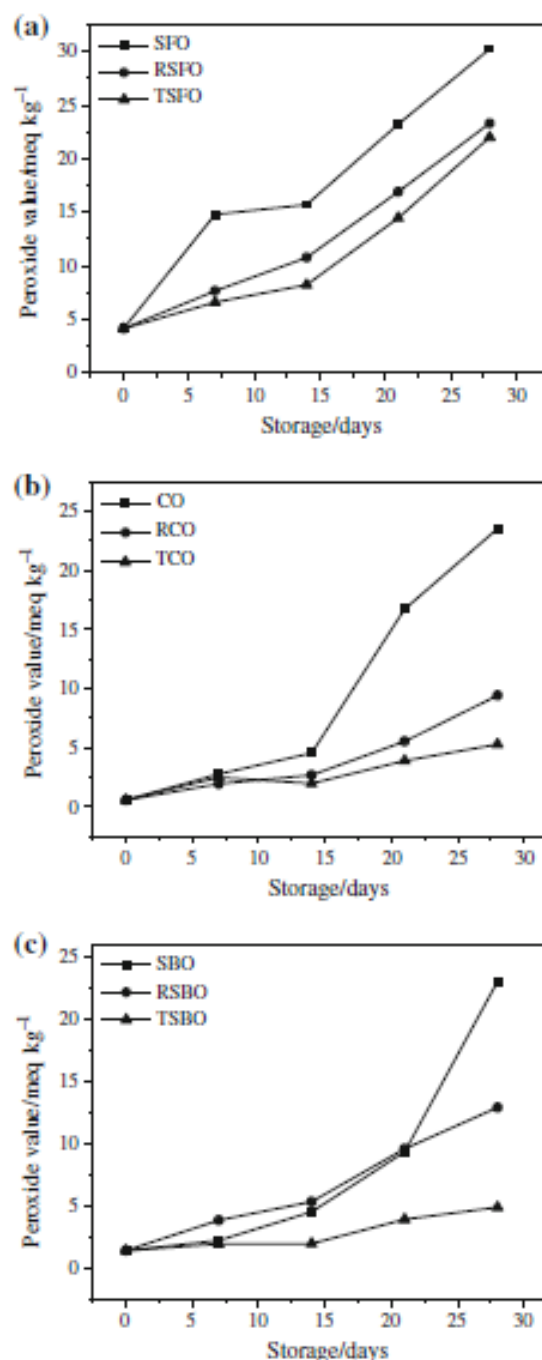


Fig. 3 Peroxide values of the vegetable oils, with and without antioxidants for different storage times: **a** sunflower oil; **b** corn oil and; **c** soybean oil

the effect of both antioxidants was less effective than other two vegetable oils (Fig. 3a).

Several studies have shown that TBHQ is efficient in delaying the oxidative processes in lipid matrices, when added at the maximum amount allowed of 200 mg kg^{-1} [23, 24]. According to the results reported by Almeida-Doria et al. (2000), TBHQ added to soybean oil obtained a better result against the peroxide than the ethanolic extracts of rosemary and marjoram, during storage at 63°C [25]. Nevertheless, the results utilizing the rosemary extract

were shown promising, chiefly when utilized with corn oil. It is important to stress that the rosemary extract is a source of a natural antioxidant, whereas TBHQ is a synthetic antioxidant, of questionable use in several countries, once its prolonged usage is harmful to health [4].

The presence of conjugated dienes (CD), similarly to the peroxide value, is a parameter for the determination of the oxidative stability of vegetable oils. It is evaluated by the absorbance at the wavelength of 232 nm. The formation of hydroperoxides coincides with the conjugation of the double bonds in polyunsaturated fatty acids (PUFA) [26].

The CD values of the samples during storage are displayed in Fig. 4.

It is observed that a gradual increase occurred in the formation of conjugated dienes, in all the samples. Up to the 14 day, the samples of sunflower oil, corn oil, and soybean oil, with the addition of rosemary extract and TBHQ showed low values of CD, differently to the other samples. This occurs probably by the protecting effect of the antioxidants in inhibiting the formation of the primary oxidation products. After the 21st day, a rapid rise in the CD values was observed for the samples without additives.

The CD values for the samples without additives, conversely to what was observed for the peroxides, revealed a protection factor effect similar among the antioxidants, showing that the activity of an antioxidant cannot be determined by only one parameter.

Conclusions

The results obtained in the present study showed that the rosemary extract is a promising source of natural antioxidants for vegetable oils, being able to protect the oils against oxidative processes, even at high temperatures, once its efficiency measured by the PDSC technique was better than the one of the synthetic antioxidant TBHQ. Another parameter to be taken into account deals with the thermal stability of the rosemary extract, which, by means of thermogravimetric analyses was shown to be stable at the frying temperature of the oils, a property that is not found in the majority of the antioxidants commonly used in edible oils.

Acknowledgements The authors acknowledge the Brazilian agencies FAPEAM—Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas, by the Ph.D. scholarship, and to MCT and FINEP.

References

- Shahidi F, Zhong Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem Soc Rev*. 2010;39:4067–79.
- Shahidi F. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*. 2000;44:158–63.

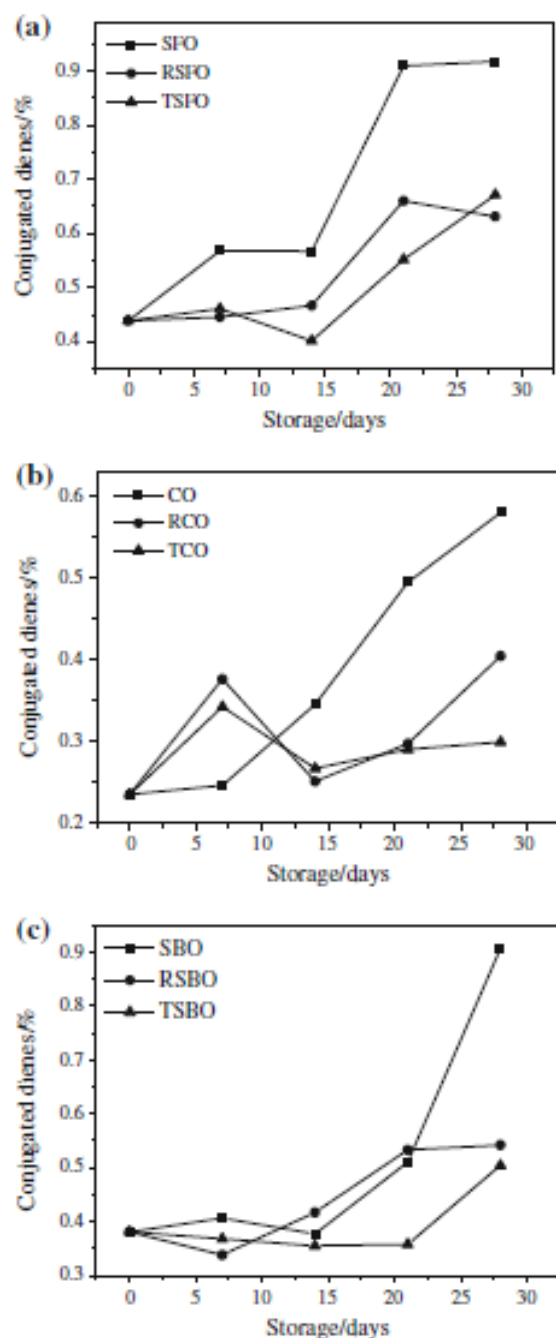


Fig. 4 Values for conjugated dienes (CD) of the samples of stored vegetable oils in the oven tests: **a** sunflower oil; **b** corn oil and; **c** soybean oil

3. Guo L, Xie MY, Yan AP, Wan YQ, Wu YM. Simultaneous determination of five synthetic antioxidants in edible vegetable oil by GC-MS. *Anal Bioanal Chem*. 2006;386:1881–7.
4. Ito N, Hirose M, Fukushima S, Tsuda H, Shirai T, Tatematsu M. Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food Chem Toxicol*. 1986;24:1071–82.
5. Ramalho VC, Jorge N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. *Quim Nova*. 2006;29:755–60.
6. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr*. 2002; 15:71–81.
7. Yanishlieva NV, Marinova E, Pokorný J. Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur J Lipid Sci Tech*. 2006;108:776–93.
8. Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr*. 2004; 79:727–47.
9. Carvalho RN, Moura LS, Rosa PTV, Meireles MAA. Supercritical fluid extraction from rosemary (*Rosmarinus officinalis*): kinetic data, extract's global yield, composition, and antioxidant activity. *J Supercrit Fluid*. 2005;35:197–204.
10. Mahmoud AA, Al-Shihry SS, Son BW. Diterpenoid quinones from (*Rosmarinus officinalis* L.). *Phytochemistry*. 2005;66:1685–90.
11. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC). Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. 7th ed. Boston: Blackwell Scientific Publications; 1987.
12. Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Substâncias Graxas - Determinação do Índice de Acidez; 1998.
13. American Oil Chemists' Society (AOCS). In: Firestone D, editor. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society: Fats, Oils and Lipid Related Analytical Methods. 6th ed. Champaign, IL: AOCS; 1993.
14. Jorge N, Soares BBP, Lunardi VM, Malacrida CR. Physico-chemical alterations of sunflower, corn and soybean oils in deep fat frying. *Quim Nova*. 2005;28:947–51.
15. Ribeiro APB, Grimaldi R, Gioielli LA, Gonçalves LAG. Zero trans fats from soybean oil and fully hydrogenated soybean oil: Physico-chemical properties and food applications. *Food Res Int*. 2009;42:401–10.
16. Candeia RA, Sinfrônio FSM, Bicudo TC, Queiroz N, Barros Filho AKD, Soledade LEB, Santos IMG, Souza AL, Souza AG. Influence of the storage on the thermo-oxidative stability of methyl and ethyl esters by PDSC. *J Therm Anal Calorim*. 2011;106:581–6.
17. Aued-Pimentel S, Kumagai EE, Kus MMM, Caruso MSF, Tavares M, Zenebon O. Trans fatty acids in refined polyunsaturated vegetable oils commercialized in the city of São Paulo, Brazil. *Cienc Tecnol Aliment*. 2009;29:646–51.
18. Neff WE, Selke E, Mounts TL, Rinsch W, Frankel EN, Zeitoun MAM. Effect of triacylglycerol composition and structures on oxidative stability of oils from selected soybean germplasm. *J Am Oil Chem Soc*. 1992;69:111–8.
19. BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução no. 04/88. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO, Compêndio da Legislação de Alimentos. São Paulo: ABIA, 2001. v. 1, p. 326.
20. Nogala-Kalucka M, Korczak J, Dratwa M, Lampart-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 Chem*. 2005;93:227–35.
21. Santos NA, Cordeiro AMTM, Damasceno SS, Aguiar RT, Rosenhaim R, Carvalho Filho JR, Santos IMG, Maia AS, Souza AG. Commercial antioxidants and thermal stability evaluations. *Fuel*. 2012;97:638–43.
22. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). RDC no. 270, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. In: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Legislacao>. Accessed 14 Jan 2012.
23. Wang H, Liu F, Yang L, Zu Y, Wang H, Qu S, Zhang Y. Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage. *Food Chem*. 2011;128:93–9.
24. Mohdaly AAA, Sarhan MA, Mahmoud A, Ramadan MF, Smetanska I. Antioxidant efficacy of potato peels and sugar beet pulp extracts in vegetable oils protection. *Food Chem*. 2010;123: 1019–26.
25. Almeida-Doria RF, Regitano-D'arce MAB. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. *Cienc Tecnol Aliment*. 2000;20: 197–203.
26. Iqbal S, Bhanger MI. Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chem*. 2007;100:246–54.

Rancimat and PDSC accelerated techniques for evaluation of oxidative stability of soybean oil with plant extracts

A. M. T. M. Cordeiro · M. L. Medeiros ·
M. A. A. D. Silva · I. A. A. Silva · L. E. B. Soledade ·
A. L. Souza · N. Queiroz · A. G. Souza

Received: 20 September 2012 / Accepted: 4 February 2013
© Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary 2013

Abstract Taking into account the importance of natural antioxidants in the preservation of oils and fats, the present study evaluated the antioxidant action of five plant extracts in the control of soybean oil stability, by means of the accelerated techniques Rancimat and PDSC. These plants are rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), chamomile (*Matricaria recutita* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.), fennel (*Foeniculum vulgare*), and senna (*Cassia angustifolia* Vahl). The plant extracts and also the synthetic antioxidant BHT were added to the samples of crude soybean oil at the concentration of 1,000 mg kg⁻¹. The values of total phenolic contents ranged from 8.7 ± 0.4 to 63.0 ± 2.3 mg GAE g⁻¹ extract and a strong positive correlation was observed between the total phenolic contents and the overall antioxidant activity of the plant extracts. Such high values indicate a good protection of the analyzed soybean oil, moreover for the Rosemary extract that was superior to the remaining extracts. In the Rancimat technique the rosemary extract was more effective than the synthetic BHT antioxidant. The OIT

values of Rosemary extract and the BHT antioxidant were equivalent, and the former, showed the highest phenolic contents among the extracts, for all the performed tests, confirming that it is a powerful natural source of antioxidants.

Keywords Oxidative stability · Natural antioxidants · Accelerated tests · PDSC · Rancimat

Introduction

The industrialization of oily plants constitutes one of the most important activities of the Brazilian agribusiness once the vegetable oils, besides being employed in the food, cosmetics, pharmaceutical, and chemical industries, nowadays they find in the biofuel industry a huge market for the biodiesel production [1, 2].

Oils and fats are extremely important in human nutrition. Besides supplying energy, they are excellent sources of liposoluble vitamins and essential fatty acids. Once they are utilized in the foods, they impart to them excellent qualities, such as: texture, flavor, aroma, color, besides markedly increasing the palatability of the foods [3].

However, oils and fats are highly prone to oxidative processes, in which the degradation of the essential fatty acids takes place with the appearance of unpleasant odors and flavors, besides the formation of compounds that are potentially toxic to the human body [4–6].

The usage of antioxidant substances (natural or synthetic) is one of the more efficient means of controlling the oxidative degradation of oils and fats, and it has been successfully applied to the vegetable oil industry [7]. This market relies upon a significant number of synthetic antioxidants. However, the utilization of these antioxidants in food has found severe restrictions, once carcinogenic and

A. M. T. M. Cordeiro · M. A. A. D. Silva · I. A. A. Silva
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos, CT, Campus I, Universidade Federal da Paraíba,
João Pessoa, Paraíba, Brazil

M. L. Medeiros
Programa de Pós-Graduação em Química, CCEN, Campus I,
Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

L. E. B. Soledade
Campus de Pinheiro, Universidade Federal do Maranhão,
Pinheiro, MA, Brazil

A. L. Souza (✉) · N. Queiroz · A. G. Souza
Laboratório de Combustíveis e Materiais—LACOM,
Departamento de Química, CCEN, Campus I, Universidade
Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil
e-mail: antonia_lucia@yahoo.com.br

mutagenic effects have been attributed to them, and, thus, their usage has been controlled in several countries [8].

Bearing in mind the large industrial application of oils and fats, the research devoted to the discovery of new antioxidant substances has been stimulated, moreover in the area of natural products [7].

Substances with recognized antioxidant capacity, such as ascorbic acid, coumarins, flavonoids, tocopherols, and carotenoids and widely found in the plant extracts of fruits, herbs, spices, seeds of citric fruits, and mushrooms [8, 9]. Thus, it can be stated that herbs, both in the form of extracts and *in natura*, are a natural source of antioxidants, possibly due to the presence of phenolic compounds [7].

The species *Rosmarinus officinalis* L., popularly known as rosemary, displays an elevated antioxidant power, mainly attributed to the presence of rosmarinic acid and the phenolic diterpene carnosic acid and camosol [10–12].

Chamomile (*Matricaria recutita* L.) is one of the most popular herbs used for the preparation of teas in Brazil, and it has been traditionally used for medicinal purposes. A series of studies reports evidences of the bioactivity of this herb, including the antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities, mainly attributed to the presence of substances from the flavonoid class: apigenin, quercetin, patuletin, luteolin, in both free and in the free and glycosylated forms, besides cinnamic, ferulic and caffeic acids and also the terpenoid α -Bisabol [13, 14].

The aromatic properties of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and fennel (*Foeniculum vulgare*) make that these species be widely used in the food and pharmaceutical industries for the correction of food flavors and as a component of medications [15].

The essential oil of coriander displays, as its main chemical components the monoterpenes linalol, citronelol, geraniol, myrcene, α and γ -terpinene, limonene, and camphor, besides some fatty acids [16, 17].

It is attributed to fennel a powerful antioxidant activity, possibly run from the presence of phenolic compounds chlorogenic acid, quercetin 3-*O*-rutinoside, quercetin-3-*O*-glucuronide, kaempferol-3-*O*-glucuronide, isoquercitrine, and isorhamnetin-3-*O*-glucoside [18, 19].

Known from its purgative power, senna (*Cassia angustifolia* Vahl) displays several biologic properties, including: antibacterial, antifungal, antimalarial, antitumor, and hepatoprotective properties [20]. Fitochemical analyses evidenced that flavonoid compounds as kaempferol, anthraquinone substances like chrysophanol, and other phenolic substances are its main constituents, besides the presence of sennosides A and B [21, 22].

Considering the importance of natural antioxidants in the preservation of oils and fats, the present study investigated the antioxidative capacity of ethanolic extracts of: rosemary, chamomile, coriander, fennel and senna, by means of the determination of the overall phenolic content

and the DPPH[•] radical scavenging and evaluated their effects on the oxidative stability of soybean oil, using the accelerated methods Rancimat and PDSC.

Experimental

Material

Leaves of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), flowers of chamomile (*Camomila recutita*), seeds of coriander (*Coriandrum sativum* L.), seeds of fennel (*Foeniculum vulgare*), leaves of senna (*Cassia angustifolia* Vahl.) and seeds of soybean were acquired from the local market.

Standards of ascorbic acid, gallic acid, BHT (2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol), and DPPH[•] (2,2-diphenyl- β -picrylhydrazyl) were obtained from Sigma-Aldrich. The reagent Folin–Ciocateau was supplied by Merck and the remaining reagents and solvents, of analytical degree, from FMAIA.

Preparation of soybean oil

The soybean seeds were mechanically pressed at room temperature for the preparation of crude soybean oil, which was vacuum filtered and stored in amber glass bottles, in an inert atmosphere, at the temperature of 10 ± 1 °C up to moment of its utilization.

Preparation of the antioxidant extracts

The plant extracts (rosemary, chamomile, coriander, fennel, and senna) were obtained using ethanol as the solvent, at room temperature. The dried herbs were separately conditioned in glass containers, immersed in ethanol, under daily stirring, remaining closed for 15 days at room temperature. Later, the extracts were vacuum filtered and the solvent removed under reduced pressure at 50 °C in rotary evaporator. The plant extracts were conditioned in glass containers, protected from light, at room temperature, up to the moment of being used.

Methods

Total phenolics determination

The overall content of phenolics in each plant extract was determined, in triplicate, by the colorimetric method, utilizing the Folin–Ciocateau reagent [23], with some modifications [24]. Extract solutions, prepared in ethanol at a concentration of 1 mg mL^{-1} , were mixed with 60 μL of the Folin–Ciocateau reagent, 180 μL of 15 % sodium carbonate solution and distilled water up to 3 mL. After 30 min, in a dark environment, at the temperature of 45 °C,

the absorbance at 760 nm was measured by a Shimadzu, model UV-2550, UV-Vis spectrophotometer. A gallic acid standard curve (from 2.5 to 25 mg L⁻¹) was obtained, using the same conditions. The results were expressed as mg of gallic acid equivalents (GAE) g⁻¹.

Radical-scavenging activity of 2,2-diphenyl-β-picrylhydrazyl radical (DPPH•) assay

The antioxidant activity was measured by means of the capability of the antioxidants present in the samples in scavenging the stable DPPH• radical, according to Brand-Williams et al. [25], with modifications by Silva [24]. The scavenging activity of the free radical 2,2-diphenyl-β-picrylhydrazyl-DPPH—is one of the most used methods for the evaluation of antioxidant capacity. This radical is stable, with absorption in the 515–520 nm range, which easily undergoes reduction in the presence of antioxidants, with the corresponding decrease in absorption. The percent of the overall antioxidant activity (%OAA), or the scavenging of free radicals activity, corresponds to the amount of DPPH consumed by the antioxidant [26]. In triplicate, aliquot of 150 μL of sample (1 mg mL⁻¹) was mixed with 150 μL of ethanol and 2,700 μL of the DPPH solution (23.6 μg mL⁻¹ in EtOH). After 120 min, the sample absorbance was taken at 517 nm, in a Shimadzu, model UV-2550, UV-Vis spectrophotometer. A control curve, utilizing ascorbic acid, was prepared (from 0.5 to 5 μg mL⁻¹). The results are expressed by reporting the OAA, calculated by the Eq. 1, ± standard deviation.

$$\%OAA = 100 \times \left(\frac{Abs_{control} - Abs_{sample}}{Abs_{control}} \right) \quad (1)$$

in which %OAA is the overall antioxidant activity percent, Abs_{control} is the absorbance of the ethanolic solution of the DPPH• radical and Abs_{sample} is the absorbance of the radical in the presence of the extract or the standard ascorbic acid.

Sample preparation

The plant extracts (rosemary, chamomile, coriander, fennel, and senna) and the BHT synthetic antioxidant were added to crude soybean oil, reaching the concentration of 1,000 mg kg⁻¹. A crude soybean oil sample, without antioxidant, was utilized as a blank.

Oxidative stability test

The oxidative stability was determined in 873 Biodiesel Rancimat equipment from Metrohm [27], utilizing a sample of 2 g, temperature of 110 °C, under a constant air flow (10 L h⁻¹). The result, expressed as induction period (IP), is

automatically determined from the inflection point of the curve by the software that accompanies the equipment.

Pressurized differential scanning calorimetry (PDSC)

The PDSC curves of the samples were obtained by a model DSC Q1000, TA Instruments, pressurized differential scanning calorimeter. The tests were performed in the isothermal mode (110 °C), utilizing an aluminum pan with approximately 10 mg sample, under an oxygen atmosphere with initial pressure of 203 psi (roughly 1,400 kPa) and heating rate of 10 °C min⁻¹.

Statistical analysis

The results were reported as average ± standard deviation. The Pearson correlation coefficient (*r*) was calculated between the total phenolics contents and the analysis methods of the OAA utilizing the free software R (95 % confidence interval) [28].

Results and discussion

The values of total phenolics (TF) the OAA of the plant extracts are presented in Table 1. The values of TFs ranged from 8.7 ± 0.4 to 63.0 ± 2.3 mg GAE g⁻¹ extract, whereas the OAA ranged from 1.2 ± 0.01 to 95.5 ± 0.0001 %OAA in 50 μg mL⁻¹.

The Rosemary extract showed a TFs content higher than those of the remaining extracts. However, the result was lower than what was reported by Erkan et al. [10], evaluating the methanolic extract of rosemary. Such difference may be attributed to the solvent, the extraction method and the plant origin, factors that may influence the result.

The TF content for chamomile was of 25.3 mg GAE g⁻¹ of extract, higher than the value found by Pereira et al. [29], assessing the TF contents of aqueous, methanolic and ethanolic contents, who reported the maximum value of 0.013 mg EAG g⁻¹ plant.

Table 1 Total phenolics content and values of overall antioxidant activity (%OAA) utilizing the DPPH radical for the plant extracts

Plant extracts	TF/mg GAE g ⁻¹ extract	DPPH•/%OAA in 50 μg mL ⁻¹
Rosemary	63.0 ± 2.3	95.5 ± 0.0001
Chamomile	25.3 ± 0.9	38.1 ± 0.011
Senna	19.1 ± 0.6	24.8 ± 0.001
Fennel	11.9 ± 0.7	1.2 ± 0.01
Coriander	8.7 ± 0.4	6.0 ± 0.01

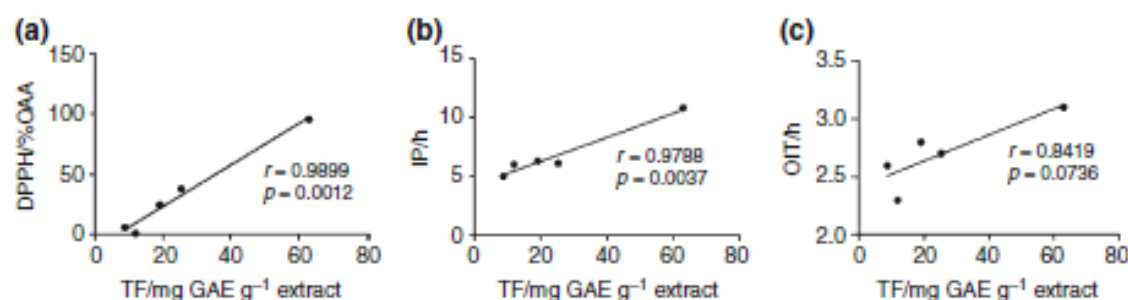


Fig. 1 Results for the Pearson correlation coefficient **a** TF $\times$ %OAA, **b** TF $\times$ IP, and **c** TF $\times$ OIT

The ethanolic extract of *Coriandrum sativum* L., although it was the sample displaying the smallest TF value, the result was placed within the expected range, as, in spite of *Coriandrum sativum* L. be a species of chemical constituents of elevated antioxidant potential, such as the phenolics: catechol, salicylic acid, glycitein, gentisic acid, protocatechuic acid, caffeic acid, and quinic acid, these substances are not always present in the ethanolic extract at considerable concentrations. Melo [17], evaluating the TF contents in fractions of aqueous extracts of leaves and shoots of *Coriandrum sativum* L. obtained results from 4.42 ± 0.22 to 17.08 ± 0.09 μg of catechin equivalent/ml of fraction, and the best result was obtained for the fraction eluted with the chloroform:methanol blend (65:35, v/v).

The ethanolic extract of *Foeniculum vulgare* presented a TF content of 11.9 ± 0.7 mg GAE g^{-1} , lower than the value found by Oktay [19], who upon the evaluation of the same type of extract found a value of 90.00 μg GAE mg^{-1} extract.

For the species *Cassia angustifolia* no results about the determination of TFs were reported, possibly this fact can be attributed to the popular use of the plant as a natural purgative [21, 22].

Natural antioxidants have been studied with the purpose of increasing the storage stability and resistance to thermodegradation of vegetable oils and other fat-rich products [7]. Several tests are performed for the determination of the antioxidant activity of the components present in plant extracts [29]. Schwarz et al. [30] classified them into two groups: methods that assess the ability to scavenge free radicals and methods that test the ability of inhibiting the lipid oxidation.

The antioxidant capacity of the plant extracts, expressed in percent of the OAA, by the DPPH $^{\bullet}$ method, proves that the present bioactive compounds act as hydrogen donors to the radical. However this action was shown to be differentiated among the investigated plant extracts (Table 1).

The rosemary extract displayed the highest scavenging capacity for the DPPH radical, over 90 %. This result can be ascribed to the presence of phenolic diterpenes: carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid [10, 12, 31]. Other papers have also reported the efficiency of the rosemary extract as an antioxidant [11, 32, 33].

Research works report the strong correlation between the antioxidant activity and TF content of extracts obtained from natural sources [34]. In the present study, a strong positive correlation was obtained between the TF contents and the %OAA of the plant extracts, with a Pearson correlation coefficient (r) equal to 0.9899 (Fig. 1a).

The results for assessment of the oxidative stability of crude soybean oil (without additives) and with the addition

Table 2 Evaluation of the oxidative stability for the soybean oil samples by the Rancimat and PDSC techniques

Sample	Oxidative stability	
	Rancimat IP/h	PDSC OIT/h
Crude soybean oil (CSO)	5.2 ± 0.01	2.5 ± 0.2
Oil with rosemary extract (RSO)	10.8 ± 0.11	3.1 ± 0.2
Oil with senna extract (SSO)	6.3 ± 0.10	2.8 ± 0.2
Oil with chamomile extract (CHSO)	6.1 ± 0.12	2.7 ± 0.2
Oil with fennel extract (FSO)	6.0 ± 0.20	2.3 ± 0.2
Oil with coriander extract (COSO)	5.0 ± 0.10	2.6 ± 0.2
Oil with BHT (positive control) (BSO)	6.3 ± 0.10	3.4 ± 0.2

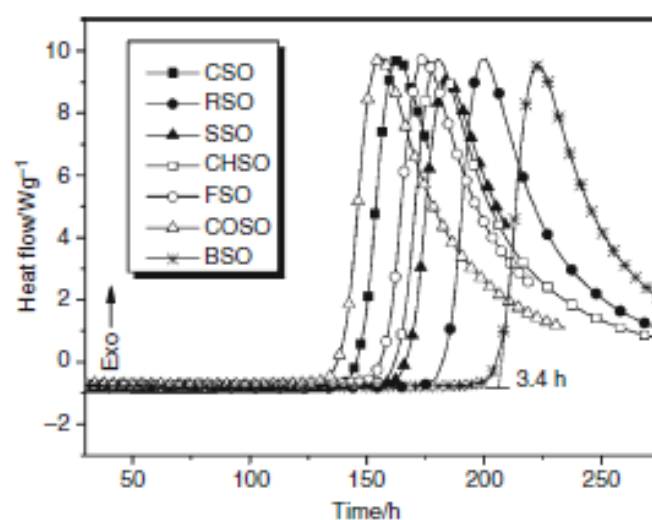


Fig. 2 PDSC isotherm curves ($T = 110$ $^{\circ}\text{C}$) of CSO, RSO, SSO, CHSO, FSO, COSO, and BSO

of plant extracts are shown in Table 2 and Fig. 2. These data show the low oxidative stability of soybean oil, evidenced by values of the IP, determined by the Rancimat technique and by the oxidative induction time (OIT) by the PDSC technique. The value of OIT for the soybean oil, without additives, agrees with the result found by Freire et al. [35], who reported an OIT of 152.45 min at the same experimental conditions of the present study. This low oxidative stability of soybean oil is ascribed to the elevated percentage of unsaturated fatty acids [36], thus being necessary the usage of antioxidants to increase the life time of the oil.

The results obtained for the samples of soybean oil with the addition of the plant extracts indicated that rosemary extract exhibited the highest protecting effect for the soybean oil, moreover according to the Rancimat technique, from which the IP was 1.7 times bigger than the IP determined for the synthetic antioxidant BHT.

Evaluating the oxidative stability by the PDSC technique, it was noticed that a remarkable difference was not observed between the OIT values from the rosemary extract and from the synthetic antioxidant BHT. The increase of the protecting effect of BHT in the PDSC technique, as compared with its result from Rancimat, can be attributed to the pressure difference that is verified between the two techniques. In the Rancimat the experiment takes place at the atmospheric pressure, whereas in the PDSC it is performed under elevated pressure. This result agrees with the studies undertaken by Boleslaw [37], who verified that the pressure increase suppress the BHT evaporation and increases its efficiency as antioxidant.

Comparing the IPs of the samples with the addition of the plant extracts, it was possible to verify a strong positive correlation ($r = 0.9788$) with the TFs contents presented by the extracts (Fig. 1b). A positive correlation was also observed between the OIT values and the TFs contents, with a Pearson correlation coefficient (r) equal to 0.8419 (Fig. 1c). Nevertheless with the OIT, the linear correlation was not as significant as the one observed by the Rancimat method. This fact can be attributed to the experimental conditions of the two techniques utilized.

Conclusions

The results showed that the plant extracts exhibited an antioxidant capacity to the DPPH radical, moreover for the rosemary extract that presented the highest TFs content. The rosemary extract was also shown to be the most effective for the control of the oxidative stability of soybean oil. When it is compared with the synthetic antioxidant BHT, it was shown more efficient according to the Rancimat technique and presented the same efficiency by the PDSC technique. The

remaining extracts did not display a satisfactory efficiency, however, this does not indicate that they do not possess an antioxidant potential, because all of them revealed the presence of phenolic substance. Therefore, there is room for a deeper investigation on these extracts, utilizing solvents with a polarity different from that of ethanol.

Acknowledgements The authors acknowledge the Brazilian agencies FAPEAM, Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas, by the Ph. D. scholarship, and to MCT and FINEP.

References

- Carlsson AS. Plant oils as feedstock alternatives to petroleum—a short survey of potential oil crop platforms. *Biochimie*. 2009;91:665–70.
- Azam MM, Waris A, Nahar NM. Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. *Biomass Bioenergy*. 2005;29:293–302.
- German JB. Food processing and lipid oxidation. *Adv Exp Med Biol*. 1999;459:23–50.
- Araújo KLG, Epaminondas OS, Silva MCD, Lima AEA, Rosenham R, Maia AS, Soledade LEB, Souza AL, Santos IMG, Souza AG, Queiroz N. Influence of thermal degradation in the physicochemical properties of fish oil. *J Therm Anal Calorim*. 2011;106:557–61.
- Shahidi F, Zhong Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chem Soc Rev*. 2010;39:4067–79.
- Ramallo VC, Jorge N. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. *Quim Nova*. 2006;29:755–60.
- Cordeiro AMTM, Medeiros ML, Santos NA, Soledade LEB, Pontes LFB, Souza AL, Queiroz N, Souza AG. Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract: Thermal study and evaluation of the antioxidant effect on vegetable oils. *J Therm Anal Calorim*. 2012; doi:10.1007/s10973-012-2778-4.
- Reische, DW, Lillard DA, Eitenmiller RR. Antioxidants. In: Akoh CC, Min DB. *Food Lipids: chemistry, nutrition and biotechnology*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 2002.
- Yanishlieva NV, Marinova E, Pokorný J. Natural antioxidants from herbs and spices. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2006;108:776–93.
- Erkan N, Ayranci G, Ayranci E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem*. 2008;110:76–82.
- Almela L, Sanchez-Munoz B, Fernandez-Lopez JA, Roca MJ, Rabe V. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J Chromatogr A*. 2006;1120:221–9.
- Mahmoud AA, Al-Shihry SS, Son BW. Diterpenoid quinones from (*Rosmarinus officinalis* L.). *Phytochemistry*. 2005;66:1685–90.
- Mulinacci N, Romani A, Pinelli P, Vincieri FF, Prucher D. Characterization of *Matricaria recutita* L. flower extracts by HPLC-MS and HPLC-DAD analysis. *Chromatographia*. 2000;51:301–7.
- McKay DL, Blumberg JB. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res*. 2006;20:519–30.
- Lo Cantore P, Iacobellis NS, De Marco A, Capasso F, Senatore F. Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller Var. *vulgare* (Miller) essential oils. *J Agric Food Chem*. 2004;52:7862–6.

16. Grosso C, Gerraro V, Figueiredo AC, Barroso JG, Coelho JA, Palavara AM. Supercritical carbon dioxide extraction of volatile oil from Italian coriander seeds. *Food Chem.* 2008;111:197–203.
17. Melo EA, Mancini Filho J, Guerra NB. Characterization of antioxidant compounds in aqueous coriander extract (*Coriandrum sativum* L.). *Food Sci Technol.* 2005;38:15–9.
18. Parejo I, Jauregui O, Sánchez-Rabaneda F, Viladomat F, Bastida J, Codina C. Separation and characterization of phenolic compounds in fennel (*Foeniculum vulgare*) using liquid chromatography-negative electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2004;52:3679–87.
19. Oktay M, Gülçin İ, Küfrevioğlu Öİ. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *Food Sci Technol.* 2003;36:263–71.
20. Viegas C Jr, Rezende A, Silva DHS, Castro-Gambôa I, Bolzani VS. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. *Quim Nova.* 2006;29:1279–86.
21. Lombardo M, Kiyota S, Kaneko TM. Aspectos étnicos, biológicos e químicos de *Senna occidentalis* (Fabaceae). *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2009;30:9–17.
22. Peron AP, Marcos MC, Cardoso SC, Vicentini VEP. Avaliação do potencial citotóxico dos chás de *Camellia sinensis* L. e *Cassia angustifolia* vahl em sistema teste vegetal. *Arq Ciênc Saúde Unipar.* 2008;12:51–4.
23. Singleton VL, Rossi JRJA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Viticult.* 1965;16:144–58.
24. Silva TMS, Câmara CA, Lins ACS, Barbosa Filho JM, Silva SEM, Freitas BM, Santos FAR. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *J Food Comp Anal.* 2006;19:507–11.
25. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol.* 1995;22:25–30.
26. Frankel EN, Meyer AS. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. *J Sci Food Agric.* 2000;80:1925–41.
27. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. Fats, oils and lipid related analytical methods. 6th ed. Champaign: AOCS; 1993.
28. R. The R Project for Statistical Computing. In: <http://www.r-project.org/>. Accessed 06 may 2012.
29. Pereira RP, Fachineto R, Prestes AS, Puntel RL, Silva GNS, Heinzmann BM, Boschetti TK, Athayde ML, Bürger ME, Morel AF, Morsch VM, Rocha JBT. Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*. *Neurochem Res.* 2009;34:973–83.
30. Schwarz K, Bertelsen G, Nissen LR, Gardner PT, Heinonen MI, Hopia A, Huynh-Ba T, Lambelet P, McPhail D, Skibsted LH, Tijburg L. Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur Food Res Technol.* 2001;212:319–28.
31. Celiktas OY, Bedir E, Sukan FV. In vitro antioxidant activities of *Rosmarinus officinalis* extracts treated with supercritical carbon dioxide. *Food Chem.* 2007;101:1457–64.
32. Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic Res.* 2006;40:223–31.
33. Nogala-Kalucka M, Korczak J, Dratwa M, Lampart-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 Chem.* 2005;93:227–35.
34. Liu X, Dong M, Chen X, Jiang M, Lv X, Yan G. Antioxidant activity and phenolics of an endophytic *Xylaria* sp. from *Ginkgo biloba*. *Food Chem.* 2007;105:548–54.
35. Freire LMS, Filho JRC, Moura CVR, Soledade LEB, Stragevitch L, Cordeiro AMTM, Santos IMG, Souza AG. Evaluation of the oxidative stability and flow properties of quaternary mixtures of vegetable oils for biodiesel production. *Fuel.* 2012;95:126–30.
36. Santos NA, Damasceno SS, Araújo PHM, Marques VC, Rosenhaim R, Fernandes VJ Jr, Queiroz N, Santos IMG, Maia AS, Souza AG. Caffeic acid: an efficient antioxidant for soybean biodiesel contaminated with metals. *Energy Fuel.* 2011;25:4190–4.
37. Boleslaw K. Evaluation of activities of antioxidants in rapeseed oil matrix by pressure differential scanning calorimetry. *Thermochim Acta.* 1993;213:135–46.

Evaluation of the protective effect of rosemary extract on oxidative stability of vegetable oils using accelerated methods

Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro^{a,b*}, Maria Lins de Medeiros^c, Anderson Eduardo Alcântara de Lima^c, Raul Rosenhaim^d, Luiz Edmundo Bastos Soledade^e, Liliana Fátima Bezerra Lira Pontes^f, Antônia Lúcia de Souza^f, Neide Queiroz^f, Antonio Gouveia de Souza^f

^aUniversidade Federal da Paraíba, CT, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, João Pessoa, PB, Brazil.

^bInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Manaus - Zona Leste, Manaus, AM, Brazil.

^cUniversidade Federal da Paraíba, CCEN, Programa de Pós-Graduação em Química, João Pessoa, PB, Brazil.

^dUniversidade Federal da Paraíba, CT, Departamento de Engenharia Química, João Pessoa, PB, Brazil.

^eUniversidade Federal do Maranhão, Campus de Pinheiro, Pinheiro, MA, Brazil.

^fUniversidade Federal da Paraíba, CCEN, Departamento de Química, Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM), João Pessoa, PB, Brazil.

* Corresponding Author

E-mail: atribuzycordeiro@gmail.com (Angela Maria Tribuzy de Magalhães Cordeiro)

Phone/Fax: + 55 83 3216 7441. Universidade Federal da Paraíba, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, João Pessoa, PB, Brazil

Abstract

The usage of synthetic antioxidants in the control of the oxidative rancidity of vegetable oils and fats faces several restrictions by the food sector, as these substances may form degradation products, which are extremely harmful to the human organism. Thus, the search for natural substances displaying an antioxidant activity is becoming more and more frequent. Therefore the present study investigated the antioxidant activity of rosemary extract in the oxidation control of vegetable oils. Samples of corn oil, sunflower oil and soybean oil received the addition of rosemary extract (at the concentrations of 200, 500, 1000, 1500 and 2000 mg kg⁻¹) and the synthetic antioxidant *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) (at the concentrations of 20, 50, 100, 150 and 200 mg kg⁻¹). The samples, with and without the addition of the antioxidants, were submitted to the accelerated methods Rancimat and PetroOXY. The results pointed out an increase in the oxidative stability of the oils to which the rosemary extract was added, showing that the drastic temperature and pressure conditions to which the rosemary extract was submitted in the accelerated methods did not interfere with its antioxidant activity. This tendency was mainly observed in the PetroOXY method, in which the action of the natural antioxidant was shown to be superior to the TBHQ control. These data indicate rosemary as a potential and alternative antioxidant source to be used in vegetable oils, chiefly in those that display a high percentage of poly-unsaturated fatty acids. A strong correlation between the results obtained by the Rancimat and PetroOXY techniques was noticed, what allows the utilization of PetroOXY as an alternative and complementary tool for the study of the stability of oils, as well as for the evaluation of the activity of new antioxidants.

Keywords: Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.); Natural antioxidants; Vegetable oils; Rancimat; PetroOXY.

1. Introduction

Lipids are important sources of energy, liposoluble vitamins and essential fatty acids. When the lipids are present in foods, they confer excellent qualities and they increase the palatability (German, 1999; Shahidi & Zhong, 2010). However, the unsaturated structure of some of the fatty acids that compose the lipids, makes them highly prone to undergo oxidative processes, which can cause the degradation of essential fatty acids, besides provoking the appearance of unpleasant odors and flavors, harming the nutritional quality and the safety of the foods (Shahidi & Zhong, 2010; Ramalho & Jorge, 2006).

The vegetable oil industries, aiming at inhibiting or delaying the oxidative processes have been successfully using substances displaying antioxidant activity. These substances chemically act upon the inactivation of free radicals, the formation of transition metals complexes, or the reduction of hydroperoxides (Shahidi, 2000). Among the mostly used antioxidant substances used by the industry are butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), propyl gallate (PG) and *tert*-butylhydroquinone (TBHQ) (Shahidi, 2000; Wanasundara & Shahidi, 2005). Although they are efficient and show a relatively low cost, the literature reports diverse effects of the consumption of these additives to the human health. Some studies have associated the regular consumption of the synthetic antioxidants BHA and BHT with the development of some types of cancer (Ito et al., 1983; Würtzen, 1990). Conversely, there are reports that completely disagree on the harmful effect of these substances to the human organism, even ascribing a protecting effect to them (Williams et al., 1999; Botterweck, 2000).

The inconveniences brought about by the synthetic antioxidants have been pushing the search for antioxidant substances from natural sources. The use of vegetable extracts as antioxidants has been reported in the literature as an alternative to replace, totally or partially, the synthetic antioxidants (Cai et al., 2004; Wojdyło et al., 2007).

Different fruits, herbs and cereals present phenolic compounds, which display antioxidant activity. These compounds exert *in vitro* and *in vivo* antioxidant effects, preventing cancer, as well as cardiovascular and neurodegenerative diseases. Several studies have shown the antioxidant activity of extracts from vegetable sources that help in the prevention of oxidative stress. (Vijaya Kumar Reddy et al., 2010; Fu et al., 2011; Bursal et al., 2013).

Among these vegetable sources, the extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) has been pointed out as it presents compounds that exhibit antioxidant activities, such as

phenolic acids, flavonoids, diterpenoids and phenolic triterpenes, rich in carnosic acid, carnosol, rosmanol and rosmarinic acid (Wellwood et al., 2004; Mahmoud et al., 2005; Almela et al., 2006). Several studies report that the antioxidant action of rosemary extracts takes place by means of free radical scavenging, delaying the lipid oxidation (Nogala-Kalucka et al., 2005; Hernandez-Hernandez et al., 2009).

Different methods have been utilized for the evaluation of the antioxidant potential and for the quantification of antioxidant substances, present in the vegetable extracts (Wojdyło et al., 2007; Bursal et al., 2013). The most used ones are ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), ferric reducing ability of plasma (FRAP), oxygen radical absorbance capacity (ORAC), β -carotene bleaching methods, the determination of total phenolic compounds (TPC) and High Performance Liquid Chromatography (HPLC). These are complementary methods and their joint application is necessary for an efficient assessment of the antioxidant potential.

The determination of the oxidative stability is one of the most important quality issues in oils and fats (Tan et al., 2002). So, the direct application of vegetable extracts in lipid matrices is the most efficient way of evaluating their antioxidant capacity. The method recommended by AOCS (2009) is widely used in the oils fat, pharmaceutical, cosmetic and biodiesel industries. In such method, the Rancimat equipment is used the measurement of the oxidative stability is based on the determination of the electrical conductivity of volatile products of the lipid degradation. However, when it deals with the evaluation of the protecting effect of a determined substance, the Rancimat method can yield questionable data, due to the fact that some antioxidants decompose at the test temperature (Santos et al., 2012).

PetroOXY is a rapid and practical method, initially developed to evaluate the biodiesel oxidative stability, can be applied to heat labile substances, as it uses high pressures. In this technique, the induction period of the sample is the time needed to occur a 10% decrease of the maximum pressure reached by the system. Works dealing with the usage of this technique in the analyses of oxidizing matrices have obtained promising results (Araújo et al., 2009).

Therefore, in the present study, the protecting effect of rosemary extract for the oxidative stability was evaluated in samples of vegetable oils, using the Rancimat and PetroOXY techniques.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Dehydrated leaves of Rosemary and refined oils of soybean (*Glycine max* L.), corn (*Zea mays* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) were acquired in the local market. According to the manufacture specifications, the oil samples are free from antioxidants.

2.2. Reagents

The synthetic antioxidant *tert*-butylhydroquinone (TBHQ), the ultra pure water and the ethanol PA were obtained from Sigma Aldrich, from the apparatus Purelab (Elga) and from FMAIA (Brazil), respectively.

2.3. Preparation of the antioxidant extract

The rosemary extract was obtained by cold ethanol extraction. The dried rosemary leaves were conditioned in a glass container, immersed in ethanol and kept for 15 days at room temperature. After this extraction period, the remaining vegetable material was removed by filtration and the solvent was removed by vacuum. The concentrated extract was stored in a glass container, at room temperature, and protected from light until the moment of been utilized.

2.4. Fatty acid profile of the vegetable oils

The vegetable oils were transesterified, according to the standard methodology (IUPAC, 1987). The esters were analyzed in Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) equipment with a split injector, model GCMS-QP2010, from Shimadzu.

2.5. Physico-chemical characterization of the vegetable oils

In the samples of vegetable oils the following physico-chemical tests were performed: acid value, peroxide value and iodine value, according to the methods NBR 11115 (ABNT, 1998) Cd 8-53 and Cd 1-25 (AOCS, 2009), respectively.

2.6. Additions to the samples

The samples of vegetable oils (sunflower, corn and soybean) received the addition of an antioxidant. Thus, rosemary extract was added at the concentrations of 200, 500, 1000, 1500 and 2000 mg kg⁻¹. For the case of the addition of the synthetic antioxidant TBHQ, the concentrations studied were 20, 50, 100, 150 and 200 mg kg⁻¹. One sample of each oil, without any addition, was used as a blank control. The tests for the oxidative stability, using either the Rancimat or the PetroOXY methods, were conducted in duplicate for all the 33 samples, as detailed in [Table 1](#).

Table 1 - Codes for the vegetable oil samples used in the oxidative stability tests performed by the Rancimat and PetroOXY methods.

Sample	Code	Sample	Code
Sunflower oil	SF	Corn oil + TBHQ 20	TC 20
Sunflower oil + Rosemary extract 200	RSF 200	Corn oil + TBHQ 50	TC 50
Sunflower oil + Rosemary extract 500	RSF 500	Corn oil + TBHQ 100	TC 100
Sunflower oil + Rosemary extract 1000	RSF 1000	Corn oil + TBHQ 150	TC 150
Sunflower oil + Rosemary extract 1500	RSF 1500	Corn oil + TBHQ 200	TC 200
Sunflower oil + Rosemary extract 2000	RSF 2000	Soybean oil	SB
Sunflower oil + TBHQ 20	TSF 20	Soybean oil + Rosemary extract 200	RSB 200
Sunflower oil + TBHQ 50	TSF 50	Soybean oil + Rosemary extract 500	RSB 500
Sunflower oil + TBHQ 100	TSF 100	Soybean oil + Rosemary extract 1000	RSB 1000
Sunflower oil + TBHQ 150	TSF 150	Soybean oil + Rosemary extract 1500	RSB 1500
Sunflower oil + TBHQ 200	TSFO 200	Soybean oil + Rosemary extract 2000	RSBO 2000
Corn oil	CO	Soybean oil + TBHQ 20	TSBO 20
Corn oil + Rosemary extract 200	RCO 200	Soybean oil + TBHQ 50	TSBO 50
Corn oil + Rosemary extract 500	RCO 500	Soybean oil + TBHQ 100	TSBO 100
Corn oil + Rosemary extract 1000	RCO 1000	Soybean oil + TBHQ 150	TSBO 150
Corn oil + Rosemary extract 1500	RCO 1500	Soybean oil + TBHQ 200	TSBO 200
Corn oil + Rosemary extract 2000	RCO 2000		

2.7. Evaluation of the oxidative stability

2.7.1. Rancimat

The oxidative stability tests were carried out in duplicate, according to the methodology of [AOCS \(2009\)](#), using the equipment 873 Biodiesel Rancimat, from Metrohm.

The test was performed using a 2g sample, at the temperature of 110 °C and a constant air flow of 10 L h⁻¹. The result, the induction period (IP), usually expressed in hours, was automatically determined from the inflexion point of the curve by the internal equipment software.

2.7.2. PetroOXY

The PetroOXY (Petrotest) apparatus contains a pressurized chamber, in where the sample (5 mL) is heated up to the temperature of 110 °C, in an oxygen atmosphere at the pressure of 700 kPa. The tests are also performed in duplicate and the result is also expressed in hours, in terms of the induction period (IP).

2.8. Statistical analysis

The results were reported as average $\pm$ standard deviation. The statistical treatment of the data was performed by the Analysis of Variance (ANOVA) and by the Tukey test ($p < 0.05$), using the software Action 2.4 ([Estatcamp, 2012](#)). The Pearson correlation coefficient (r) was calculated between the induction period of the Racimat and PetroOXY methods.

3. Results and Discussion

3.1. Fatty acid profile of the vegetable oils

Table 2 presents the fatty acid profile of the vegetable oils investigated.

Examining the data in Table 2, it can be noticed the predominance of unsaturated fatty acids, characteristic of vegetable oils. On the nutritional standpoint, the fatty acids advantageous to the health are the unsaturated, whose percentages present in the oils of sunflower (89.5%), corn (84.5%) and soybean (76.3%), qualify them as healthy foods to the human organism. Among the unsaturated deserve emphasis the poly-unsaturated fatty acids. In samples investigated, sunflower oil presented the highest percentage of polyunsaturated fatty acids - PUFA (56.9%), whereas corn oil showed the highest amount of monounsaturated fatty acids - MUFA (39.2%).

The highest presence of saturated fatty acids - SAFA was shown in soybean oil, pointing out the highest contents of palmitic and stearic acids (18.4%). The fatty acid profile of soybean oil, determined in the present study agrees with profiles previously reported in the literature ([Aued-Pimentel et al., 2009](#); [Candeia et al., 2011](#)). For corn oil and sunflower oil,

the contents of oleic and linoleic acids were bigger than those reported by other researchers ([Aued-Pimentel et al., 2009](#)).

Table 2 - Fatty acid profile of the vegetable oils.

Numerical symbol	Systematic name	Common name	Composition (%)		
			Sunflower oil	Corn oil	Soybean oil
(C16:0)	Hexadecanoic acid	Palmitic acid	6.3	13.2	13.8
(C18:0)	Octadecanoic acid	Stearic acid	3.8	2.3	4.6
(C18:1)	9-octadecanoic acid	Oleic acid	33.1	39.2	25.5
(C18:2)	9,12-octadecadienoic acid	Linoleic acid	56.9	44.4	46.8
(C18:3)	9, 12, 15-octadecatrienoic acid	Linolenic acid	-	-	4.0
Not identified (similarity <90% - NIST Library)			-	-	5.0
SAFA (saturated fatty acids)			10.1	15.5	18.4
MUFA (monounsaturated fatty acids)			32.6	39.2	25.5
PUFA (polyunsaturated fatty acids)			56.9	45.3	50.8

3.2 Physico-chemical characterization of the vegetable oils

The data of acid value, peroxide value and iodine are shown in [Table 3](#). The three oils without addition, sunflower, corn and soybean showed acidity values and peroxide values much lower than the limit established by ANVISA, the Brazilian Food and Drug Agency ([Brazil, 2012](#)).

Corn oil (CO) showed the smallest iodine value, followed by sunflower oil (SF) and soybean oil (SB). According to [Hui \(2006\)](#), oils that present a high amount of linoleic acid in its composition display iodine value over 110 g I₂.100g. The iodine values found in the present study agree with the parameters determined by ANVISA ([Brazil, 2012](#)) for soybean oil (120-143 g I₂.100g), corn oil (103-128 g I₂.100g) and sunflower oil (110-143 g I₂.100g).

These results indicate that the three vegetable oils show a good quality and that they represent well these oils, for the testing of oxidative stability.

Table 3 - Physico-chemical characterization of the vegetable oils.

Characterization	Sunflower oil	Corn oil	Soybean oil	Limit*
Acid value (mg KOH.100g ⁻¹)	0.23 ±0.008	0.22 ±0.0	0.112 ±0.0	0.6
Peroxide Value (meq.kg ⁻¹)	3.88 ±0.0	1.29 ±0.023	0.97 ±0.0	10.0
Iodine Value (g I ₂ .100g)	124.0 ±0.7	115.5 ±0.3	140.0 ±0.8	-

* Limit parameters as determined by ANVISA

3.3 Evaluation of the oxidative stability of the oil samples.

Table 4 shows the induction period (IP) of soybean oil, corn oil and sunflower oil with the addition of rosemary extract and the synthetic antioxidant TBHQ, calculated from the accelerated oxidation test by the Rancimat method.

Table 4 - Average induction period (IP) values, obtained by the Rancimat method, of the vegetable oil samples with and without antioxidant additives.

Antioxidant (mg.kg ⁻¹)	Soybean oil		Corn oil		Sunflower oil	
	IP (h)	PF*	IP (h)	PF*	IP (h)	PF*
Oil without antioxidant	7.74 ^a	-	10.50 ^a	-	4.92 ^a	-
Rosemary extract 200	9.34 ^b	1.21	12.04 ^b	1.15	5.55 ^b	1.13
Rosemary extract 500	11.28 ^c	1.46	14.23 ^c	1.36	6.31 ^c	1.28
Rosemary extract 1000	12.64 ^d	1.63	16.26 ^d	1.55	7.59 ^d	1.54
Rosemary extract 1500	14.03 ^e	1.81	17.27 ^{de}	1.64	8.75 ^e	1.78
Rosemary extract 2000	14.81 ^e	1.91	18.27 ^e	1.74	9.52 ^f	1.93
TBHQ 20	11.11 ^c	1.44	12.49 ^b	1.19	5.18 ^{ab}	1.05
TBHQ 50	14.38 ^e	1.86	14.61 ^c	1.39	7.48 ^d	1.52
TBHQ 100	18.61 ^f	2.40	17.17 ^{de}	1.64	9.78 ^f	1.99
TBHQ 150	22.13 ^g	2.86	20.53 ^f	1.96	11.60 ^g	2.36
TBHQ 200	22.07 ^g	2.85	24.20 ^g	2.30	13.32 ^h	2.70

*PF=Protection factor. The averages of the results of samples with and without additives, followed by the same superscript letter, in the same column, do not differ statistically, according to the Tukey test (p>0.50).

The samples of vegetable oils free from antioxidants showed different induction periods, with values varying from 4.92 to 10.50 hours. Corn oil was the most stable, followed by soybean oil and sunflower oil. This tendency to oxidation was possible to foresee by

means of applying equation (1) established by [Neff et al. \(1992\)](#). From kinetic calculations and from the poly-unsaturated fatty acid composition of a sample, it is possible to estimate its oxidation rate. Thus, the tendency toward oxidizability of vegetable oils was determined, which followed the decreasing order: Sunflower oil=0.57 > Soybean oil=0.55 > Corn oil=0.45.

$$OX = [0.02(\%O) + (\%L) + 2 (\%Ln)]/100 \quad (1)$$

In which OX = oxidizability of the vegetable oil / %

%O = content of oleic acid / mass %

%L = content of linoleic acid / mass %

%Ln = content of linolenic acid / mass %

As for the oxidative stability of the samples of vegetable oils with the addition of Rosemary extract, [Figure 1](#), a progressive protecting effect was verified. Thus the protection increased with the extract concentration, and no pro-oxidant effect was noticed.

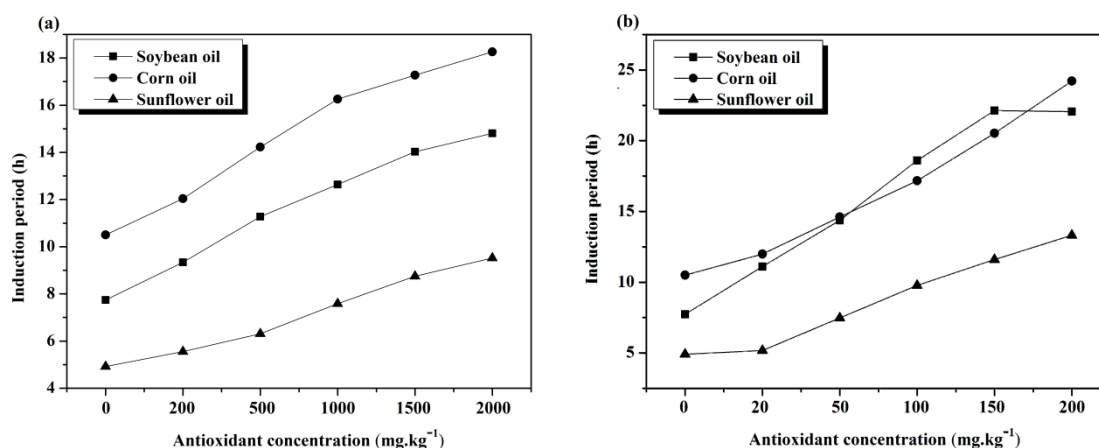


Fig. 1. Oxidative stability of the vegetable oils by Rancimat method. (a) Rosemary extract; (b) TBHQ.

The efficiency of an antioxidant has been estimated by the increase of the induction period (IP) caused by its addition ([Beddows et al., 2001](#)). The Protection Factor (PF) is related to such improvement in protection and its value is obtained from the ratio between the

induction period of the oil in the presence of the antioxidant and the induction period of the same oil, free from antioxidant ([Mezouari et al., 2007](#)).

[Table 4](#) presents the protection factors (PF) for all the concentration of both antioxidants investigated, as measured by the Rancimat method. It is observed that the rosemary extract at the maximum concentration investigated of 2000 mg kg^{-1} (samples RSF 2000, RSB 2000 and RC 2000) was the most efficient in delaying oxidation, among the samples with the addition of rosemary extract. The extract protected sunflower oil, soybean oil and corn oil 1.93, 1.91 and 1.74 times more than their blank control samples (the oils free from antioxidants, samples SB, C e SF), respectively.

It is important to stress that TBHQ, with this method, was more efficient in protecting the vegetable oils. However TBHQ is a high purity (98%) substance, conversely to the unprocessed rosemary extract. For the samples of corn oil and sunflower oil, the highest concentration of rosemary extract roughly showed the same performance as the TBHQ concentration of 100 mg kg^{-1} , but in the case of soybean oil the rosemary concentration of 2000 mg kg^{-1} was similar to TBHQ concentration of 50 mg kg^{-1} de TBHQ.

It was also noticed that the application of the rosemary extract in corn oil and sunflower oil, at the concentration of 200 mg kg^{-1} showed induction period (IP) values similar to the application of TBHQ at the concentration of 20 mg kg^{-1} . For soybean oil, when it received the lowest concentration of TBHQ, its IP did not differ significantly from the IP of rosemary extract at the amount of 500 mg kg^{-1} . These data suggest that the antioxidant activity of the rosemary extract, as measured by the Rancimat technique, is lowest, as compared with the TBHQ activity. Moreover, the rosemary extract is a natural product, much safer to human health than TBHQ.

The oxidative stability of the vegetable oil samples with the addition of antioxidants was also evaluated by the PetroOXY method. This automatic technique, recently developed for the biodiesel analysis, assesses the sample resistance to oxidation. PetroOXY has been increasingly used in research, as the test is performed in a reduced time span, displaying an easy handling and quick cleaning, besides yielding a good reproducibility. The equipment contains a small test chamber, hermetically closed, in which a 5 ml sample is heated in the presence of oxygen. These conditions induce a quick aging process in the sample. The induction period (IP), expressed in hours, is the time needed to occur a 10% drop of the maximum pressure achieved by the system ([Neumann et al., 2008](#)).

Table 5 shows the average induction period (IP) values of samples of soybean oil, corn oil and sunflower oil, with or without the addition of rosemary extract and the synthetic antioxidant TBHQ, submitted to accelerated oxidation by the PetroOXY method.

Table 5. Average induction period (IP) values, obtained by the PetroOXY method, of the vegetable oil samples with and without the antioxidant additives rosemary extract and TBHQ.

Antioxidant (mg kg ⁻¹)	Soybean oil		Corn oil		Sunflower oil	
	IP (h)	PF*	IP (h)	PF*	IP (h)	PF*
Oil without antioxidant	3.15 ^a	-	4.14 ^a	-	1.39 ^a	-
Rosemary extract 200	3.50 ^b	1.11	4.45 ^b	1.07	2.12 ^{bi}	1.53
Rosemary extract 500	3.83 ^c	1.22	5.04 ^c	1.21	2.43 ^c	1.75
Rosemary extract 1000	4.23 ^d	1.34	5.60 ^d	1.35	2.78 ^d	2.00
Rosemary extract 1500	4.44 ^e	1.41	6.06 ^e	1.46	3.06 ^e	2.20
Rosemary extract 2000	4.77 ^f	1.51	6.11 ^f	1.48	3.35 ^f	2.41
TBHQ 20	3.77 ^c	1.20	2.26 ^g	-	1.86 ^g	1.34
TBHQ 50	3.94 ^g	1.25	4.35 ^h	1.05	2.06 ^h	1.48
TBHQ 100	4.36 ^e	1.38	4.39 ^h	1.06	2.07 ^{hi}	1.49
TBHQ 150	4.73 ^f	1.50	4.65 ⁱ	1.12	2.16 ^b	1.55
TBHQ 200	5.02 ^h	1.60	4.88 ^j	1.18	2.17 ^b	1.56

*PF=Protection factor. The averages of the results of samples with and without additives, followed by the same superscript letter, in the same column, do not differ statistically, according to the Tukey test ($p>0.50$).

According to these data, it is observed that the induction period (IP) values of corn oil and sunflower oil, with the addition of the rosemary extract at the concentration of 2000 mg kg⁻¹ were better than the ones obtained upon the utilization of the synthetic antioxidant TBHQ at the concentration of 200 mg kg⁻¹. For the corn oil and sunflower oil, the protection factors obtained with the rosemary extract were 1.48 and 2.41, respectively, against the PF values of 1.18 and 1.56 with TBHQ, respectively. In the case of the soybean oil, it was noticed that the result obtained utilizing the Rosemary extract concentration of 2000 mg.kg⁻¹ did not differ significantly from the result ascribed to the TBHQ concentration of 150 mg kg⁻¹.

Differently of what was found in the Rancimat technique, the data from the PetroOXY tests pointed out that the rosemary extract presented a protecting effect to vegetable oils higher than the synthetic antioxidant TBHQ. This fact can be attributed to the presence of volatile compounds in the rosemary extract. Small amounts of volatiles released during the

sample heating in the Rancimat equipment lead to modifications in electrical conductivity of the water contained in analysis cell of the apparatus, yielding false results.

In the case of the PetroOXY equipment, this mistake does not occur, as the induction period (IP) is determined by the oxygen consumption, which is related to pressure drop observed in the equipment. The fact that a procedure undertaken at high pressures can change the behavior of TBHQ should not be discarded. High pressures may lead to a higher effectivity of the intermolecular hydrogen bonds, diminishing the hydrogen availability of the phenolic hydroxyls present in the synthetic antioxidant TBHQ.

Several studies have demonstrated that the extract of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) displays a high antioxidant power and provides a better protection factor (PF) in the oxidative stability of lipid matrices (Almela et al., 2006; Moreno et al., 2006). The promising antioxidant activity of Rosemary was also ascertained by Nogala-Kalucka et al., (2005) upon the addition of the chloroform extract to canola oil and the evaluation of the oxidative stability by the accelerated methods Oxidograph and Rancimat.

According to Figure 2, similarly to what was found by the Rancimat technique, the rosemary extract also protected the vegetable oil matrices against oxidation, increasing the oxidative stability at a degree proportional to the extract concentration.

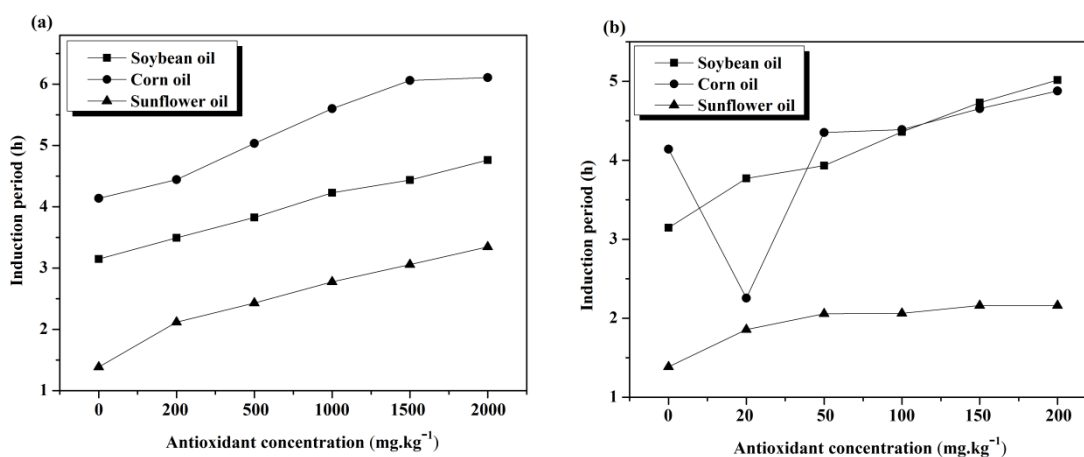


Fig. 2. Oxidative stability of the vegetable oils by the PetroOXY method. (a) Rosemary extract; (b) TBHQ.

As both methods pointed out the increase of the oxidative stability with the addition of the rosemary extract, the correlation between the results obtained by the Rancimat and PetroOXY methods was investigated. Thus, this correlation was shown to be significant

($p < 0.05$) and also a strongly positive Pearson correlation coefficient ($r > 0.8$) was obtained. The r values were 0.9917, 0.9938 and 0.9588 for samples of soybean oil, corn oil and sunflower oil with the addition of rosemary extract, respectively.

4. Conclusion

The present study showed that the rosemary extract exhibited an expressive capacity to increase the oxidative stability of the vegetable oils to which it was added, when compared to TBHQ. This tendency was observed in the accelerated test techniques utilized: Rancimat and PetroOXY, moreover by means of the PetroOXY method, in which the rosemary extract was superior to the positive TBHQ control. These data corroborate the usage of rosemary as a potential and alternative source of antioxidants to be used in vegetable oils, moreover in the ones presenting a high percentage of polyunsaturated fatty acids. PetroOXY is not a conventional method for the study of the oxidative stability of edible vegetable oils. However, a strong correlation was obtained between the Rancimat and PetroOXY results, what supports the utilization of the latter technique as an alternative and complementary tool for the study of the oxidative stability of oils, as well as for the investigation of the new antioxidant activities.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Brazilian agencies FAPEAM - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas, by the Ph. D. scholarship, and to MCT and FINEP.

References

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. (1998). Fatty substances, Acid Value Determination. Rio de Janeiro: ABNT.
- Almela, L., Sanchez-Munoz, B., Fernandez-Lopez, J. A., Roca, M. J. and Rabe, V. (2000). Liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography A*, 1120, 221–229.
- AOCS - American Oil Chemists Society (2009). Official Methods and Recommended Practices of the AOCS. 6th ed. Champaign: AOCS.
- Araújo, S. V., Luna, F. M. T., Rola Jr, E. M., Azevedo, D. C. S. and Cavalcante Jr, C. L. (2009). A rapid method for evaluation of the oxidation stability of castor oil FAME:

- influence of antioxidant type and concentration. *Fuel Processing Technology*, 90, 1272–1277.
- Aued-Pimentel, S., Kumagai, E. E., Kus, M. M. M., Caruso, M. S. F., Tavares, M. and Zenebon, O. (2009). Trans fatty acids in refined polyunsaturated vegetable oils commercialized in the city of São Paulo, Brazil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 29, 646-651.
- Beddows, C. G., Jagait, C. and Kelly, M. J. (2001). Effect of ascorbyl palmitate on the preservation of α -tocopherol in sunflower oil, alone and with herbs and spices. *Food Chemistry*, 73, 255-61.
- Botterweck, A. A. M., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., Kleinjans, J. and van den Brandt, P. A. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study, *Food Chemistry and Toxicology*, 38, 599-605.
- Brazil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolution, RE N° 482/1999, Online at: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm Accessed 09.16.12.
- Bursal, E., Köksal, E., Gülçin, İ., Bilsel, G. and Gören, A. C. (2013) Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC–MS/MS. *Food Research International*, 51, 66–74.
- Cai, Y., Luo, Q., Sun, M., Corke, H. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sciences*, 74, 2157-2184.
- Candeia, R. A., Sinfrônio, F. S. M., Bicudo, T.C., Queiroz, N., Barros Filho, A. K. D., Soledade L. E. B., Santos I. M. G., Souza A. L. and Souza A. G. (2011). Influence of the storage on the thermo-oxidative stability of methyl and ethyl esters by PDSC. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 106, 581-586.
- Estatcamp. (2012). Action 2.4. São Carlos: Estatcamp. Online at: <http://www.portalaction.com.br/>. Accessed 08.18.12
- German, J.B. (1999). Food processing and lipid oxidation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 459, 23-50.
- Hernandez-Hernandez, E., Ponce-Alquicira, E., Jramillo-Flores, M. E. and Guerrero-Legarreta, I. (2009). Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and color of model raw pork batters. *Meat Science*, 81, 410-417.
- Hui, Y. H. (2006). Handbook of food science, technology, and engineering. Vol. 4. Melbourne: RMIT University.
- Ito, N., Fukushima, S., Hagiwara, A., Shibata, M. and Ogiso, T. (1983). Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 70, 343.
- IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry, 1987. Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives. 7th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Iverson, F. (1995). Phenolic antioxidants – health protection branch studies on butylated hydroxyanisole. *Cancer Letters*, 93, 49-54.

- Fu, L., Xu, B. T., Xu, X. R., Gan, R. Y., Zhang, Y., Xia, E. Q. and Li, H. B. (2011). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. *Food Chemistry*, 129, 345-350.
- Mahmoud, A. A., Al-Shihry, S. S. and Son, B.W. (2005). Diterpenoid quinones from *Rosmarinus officinalis* L. *Phytochemistry*, 66, 1685-1690.
- Mezouari, S. and Eichner, K. (2007). Evaluation of the stability of blends of sunflower and rice bran oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 531-535.
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S. and Vojnov, A. A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, 40, 223-231.
- Neff, W.E., Selke, E., Mounts, T.L., Rinsch, E.N. and Zeitoun, M.A.M. (1992). *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69, 111-118.
- Neumann, A., Jebens, T. and Wiembicki, V. (2008). A method for determining oxidation stability of petrodiesel, biodiesel, and blended fuels. *American Laboratory*, 40, 22-23.
- Nogala-Kalucka, M., Korczak, J., Dratwia, M., Lampart-Szczapa, E., Siger, A. and Buchowski, M. (2005). Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. *Food Chemistry*, 93, 227-235.
- Ramalho, V. C. and Jorge, N. (2006). Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. *Química Nova*, 29, 755-60.
- Santos, N. A., Cordeiro, A. M. T. M., Damasceno, S. S., Aguiar, R. T., Rosenhaim, R., Carvalho Filho, J. R., Santos, I. M. G., Maia, A. S. and Souza, A. G. (2012). Commercial antioxidants and thermal stability evaluations, *Fuel*, 97, 638-643.
- Shahidi, F., 2000. Antioxidants in food and food antioxidants. *Nahrung*, 44, 158-163.
- Shahidi, F. and Zhong, Y., 2010. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*, 39, 4067-4079.
- Tan, C.P., Che Man, Y.B., Selamat, J. and Yusoff, M.S.A. (2002). Comparative studies of oxidative stability of edible oils by differential scanning calorimetry and oxidative stability index methods. *Food Chemistry*, 76, 385-389.
- Vijaya Kumar Reddy, C., Sreeramulu, D., and Raghunath, M. (2010). Antioxidant activity of fresh and dry fruits commonly consumed in India. *Food Research International*, 43, 285-288.
- Wanasundara, P. K. J. P. D. and Shahidi, F. (2005). Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In Shahidi, F. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*. v. 1. Edible oil and fat products: chemistry, properties, and health effects. 6th ed. New Jersey: John Wiley and Sons, Inc., Publication.
- Wellwood, C. R. L. and Cole, R. A. (2004). Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.), accessions for optimization of antioxidant yield. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6101-6107.

- Williams, G.M., Iatropoulos, M.J. and Whysner, J. (1999). Safety assessment of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene as antioxidant food additives. *Food Chemistry Toxicology*, 37, 1027-1038.
- Wojdyło, A., Oszmianski, J., Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, 105, 940-949.
- Würtzen, G. (1990). Shortcomings of current strategy for toxicity testing of food chemicals: antioxidants. *Food Chemistry and Toxicology*, 28, 743-745.

5. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos vegetais revelaram um considerável teor de conteúdo de fenólicos totais, constituindo-se, portanto, em fontes potenciais de antioxidantes, com algumas exceções (chapéu-de-couro, erva-doce, guaraná e coentro). Destacaram-se os extratos de cravo, barbatimão, jucá, alecrim, açafrão, boldo, canela, chá preto, manjerona, orégano, canela, chá branco, chá verde e unha-de-gato por apresentarem alta capacidade antioxidante quando avaliados pelos métodos DPPH e FRAP. Esta eficiência apresentada pelos extratos está relacionada à composição de fenólicos e sua concentração no extrato.

Dentre os extratos aditivados nos óleos vegetais comestíveis (girassol, milho e soja), o de alecrim revelou-se o mais efetivo, sobretudo aos sintéticos BHT e TBHQ quando avaliados pelos métodos acelerados de estabilidade oxidativa PDSC e PetroOXY, e efeito semelhante ao BHT, pela técnica Rancimat.

Os extratos unha-de-gato, açafrão, alecrim, chá branco e canela apresentaram boa resistência térmica, indicando que seus constituintes químicos foram preservados, podendo ser utilizados como aditivos antioxidantes em formulações que necessitem de aquecimento.

Os estudos termogravimétricos mostraram que os extratos vegetais e os antioxidantes sintéticos TBHQ, BHA e BHT volatilizam/decompõem em temperaturas inferiores a 110 °C, indicando que o uso de métodos acelerados pode levar a resultados incertos. Nesse sentido, sugere-se a utilização de métodos pressurizados para evitar a volatilização das substâncias antioxidantes ou a modificação/diminuição da temperatura normatizada no método Rancimat.

Os resultados indicam a necessidade de avaliar a estabilidade térmica dos principais padrões fenólicos, de forma a correlacionar com os extratos vegetais investigados.

Os extratos de açafrão, unha-de-gato, chá branco e canela são fontes promissoras de antioxidante e apresentam estabilidade térmica, justificando estudos adicionais sobre sua ação antioxidante em matrizes lipídicas.

ANEXOS

ANEXO A – Documento de registro de submissão do artigo intitulado ‘Evaluation of the protective effect of rosemary extract on oxidative stability of vegetable oils using accelerated methods’.

A manuscript number has been assigned: FOODRES-D-13-00425



Food Research International (fri@uoguelph.ca) Adicionar aos contatos 18/02/2013
Para: atribuzycordeiro@gmail.com, atribuzycordeiro@hotmail.com

Ms. Ref. No.: FOODRES-D-13-00425

Title: Evaluation of the protective effect of rosemary extract on oxidative stability of vegetable oils using accelerated methods
Food Research International

Dear ANGELA TRIBUZY,

Your submission entitled "Evaluation of the protective effect of rosemary extract on oxidative stability of vegetable oils using accelerated methods" has been assigned the following manuscript number: FOODRES-D-13-00425.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/foodres/>.

Your username is: atribuzycordeiro@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/foodres/automail_query.asp

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Food Research International

Anderson de Souza Sant'Ana, Ph.D.
Editor-in-Chief

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.