

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS VEGETAIS,
ISOLADOS OU ASSOCIADOS SINERGICAMENTE A ANTIOXIDANTES
SINTÉTICOS, APLICADOS AO ÓLEO DE LINHAÇA**

POLIANA SOUSA EPAMINONDAS

JOÃO PESSOA–PB

2013

POLIANA SOUSA EPAMINONDAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS VEGETAIS,
ISOLADOS OU ASSOCIADOS SINERGICAMENTE A ANTIOXIDANTES
SINTÉTICOS, APLICADOS AO ÓLEO DE LINHAÇA**

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. Dr. Antonio Gouveia de Souza

JOÃO PESSOA–PB

2013

E63a *Epaminondas, Poliana Sousa.*

Avaliação do potencial antioxidante de extratos vegetais, isolados ou associados sinergicamente a antioxidantes sintéticos, aplicados ao óleo de linhaça / Poliana Sousa Epaminondas.- João Pessoa, 2013.

155f. : il.

Orientador: Antonio Gouveia de Souza

Tese (Doutorado) – UFPB/CT

POLIANA SOUSA EPAMINONDAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS VEGETAIS,
ISOLADOS OU ASSOCIADOS SINERGICAMENTE A ANTIOXIDANTES
SINTÉTICOS, APLICADOS AO ÓLEO DE LINHAÇA**

Tese **APROVADA** em 30/09/2013

BANCA EXAMINADORA


Dr. ANTONIO GOUVEIA DE SOUZA

**Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza - DQ/ UFPB
Orientador/ Coordenador da Banca Examinadora**


Dr.ª MARTA MARIA DA CONCEICAO

**Profa. Dra. Marta Maria da Conceição – DTA/ CTDR/ UFPB
Examinador Externo**


Dr. RAUL ROSENHAIM

**Prof. Dr. Raul Rosenhaim - DEQ/ UFPB
Examinador Externo**


Dr.ª NATALY ALBUQUERQUE DOS SANTOS

**Profa. Dra. Nataly Albuquerque dos Santos – DTS/ CTDR/ UFPB
Examinador Externo**


Dr. MANOEL BARBOSA DANTAS

**Prof. Dr. Manoel Barbosa Dantas – UAQ/ IFPB – *Campus Sousa*
Examinador Externo**

JOÃO PESSOA–PB

2013

*A Deus, por ter me guiado com fé e
perseverança em mais uma etapa bem
sucedida de minha vida!*

*A meus pais, Ariosvaldo e Maria de Lourdes,
por todo amor, carinho, dedicação, apoio e
incentivo.*

*A meu amado esposo, pelos conselhos, pelo
exemplo de força e por todo amor e carinho
dedicados a mim.*

*Aos amigos, que souberam compreender,
pacientemente, minha ausência.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de sabedoria, que me ofereceu a oportunidade de mais uma conquista e viabilizou a execução de mais um trabalho bem sucedido, dando-me força de vontade e coragem, colocando em meu caminho pessoas maravilhosas, que contribuíram para o meu crescimento.

Aos meus pais, Ariosvaldo e Maria de Lourdes, pelo amor incondicional, pelo incentivo constante aos estudos sem pressões, pela educação exemplar e pela preocupação em sempre oferecer o melhor à família.

Ao irmão, Karlione, à cunhada Galba e à sobrinha Ariella, que torceram por mim e acreditaram na minha capacidade.

Ao meu querido esposo, Carlos Christiano, por todo amor, carinho, cuidado e atenção dedicados a mim nesta fase tão importante, pelas noites sem dormir, auxiliando-me em meus trabalhos, pelos exemplos de força, coragem e motivação, que servem de incentivo para minha vida acadêmica e social.

Ao meu orientador, prof. Antonio Gouveia de Souza, pela orientação com profissionalismo, pela estrutura física oferecida e apoio à pesquisa, pela amizade, pela oportunidade de mostrar o meu trabalho, pelo incentivo a mim oferecido diante da aprovação em concurso, além de toda confiança e credibilidade a mim atribuídas.

Aos professores Manoel Barbosa Dantas, Nataly Albuquerque dos Santos e Marta Maria da Conceição, membros da banca examinadora, pelas importantíssimas contribuições e pela disponibilidade, por todo apoio oferecido e pelas sugestões sempre proferidas de modo muito elegante e construtivo.

Ao professor Raul Rosenhaim, também membro da banca, pelas valiosíssimas contribuições durante a execução e discussão das análises, por compartilhar seu vasto conhecimento quanto aos equipamentos e programas, por estar sempre presente e disposto a ajudar sem interesses, pelas sugestões também proferidas de modo elegante e construtivo, pela agradável convivência e por ter se tornado um grande amigo.

Às professoras Antônia Lúcia de Souza e Neide Queiroz, pelas sugestões e contribuições oferecidas.

A Jaqueline Azevedo e Kassandra Gadelha, parceiras no trabalho em equipe, por suas valiosas amizades, por terem acreditado em minha capacidade, contribuindo para que eu

adquirisse confiança e segurança na execução dos experimentos, e por estarem sempre na torcida pela minha vitória.

A Alline Souza, minha grande amiga, que me auxiliou amplamente na execução das análises e que esteve sempre presente em minha vida desde a época de graduação, mostrando-se disposta a ajudar, sempre oferecendo uma palavra amiga de conforto, torcendo pelas minhas conquistas e confiando em minha capacidade e amizade.

A Teta, Ângela, Isnândia Andrea, Andrea Suamme, que estiveram presentes na execução das análises, pelas contribuições e pela competência.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade concedida para a realização do Doutorado.

À prof^a Marta Suely Madruga, pelo apoio, confiança, honestidade, credibilidade e por toda assistência e incentivo oferecidos.

À secretária do PPGCTA, Lindalva Nóbrega, pela gentileza, pelo tratamento doce e respeitoso, pela competência, pela agilidade e por todo apoio e incentivo.

Ao sr. Gilvandro, técnico de laboratório, pelo auxílio no tratamento das amostras, pelo apoio logístico e pelos conhecimentos compartilhados.

Aos funcionários e alunos do Laboratório de Combustíveis e Materiais (Lacom – DQ), pelo apoio, pela execução das análises, pela disponibilização da estrutura física e pelos materiais cedidos à pesquisa.

Aos amigos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB – Campus Sousa) por terem me acolhido e acreditado em minha capacidade, pelo apoio e incentivo à qualificação.

Aos amigos da Agroindústria – IFPB-Sousa (Bruno Alexandre, Sonalle Costa, Íris Braz, Maria das Dores Barreto, Ana Paula Câmara, Heloíza Barreto, Suely Cristina, Cristiane Araújo, Liz Hiluey, Sônia Cristina, Ana Paula Borges, João Ferreira Neto, Diego Bezerra, Raniery Queiroga, Pedro Lima, Damião Gomes), pela confiança e pelo apoio oferecidos nessa etapa final.

A minha amiga e irmãzinha do coração, Sonalle Costa, pela amizade, pelas palavras de incentivo, por acreditar em minha capacidade e por todo apoio logístico oferecido.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para mais essa conquista.

À Capes, pelo apoio financeiro à pesquisa.

MUITO OBRIGADA!

Título: Avaliação do potencial antioxidante de extratos vegetais, isolados ou associados sinergicamente a antioxidantes sintéticos, aplicados ao óleo de linhaça

Autora: Poliana Sousa Epaminondas

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza

RESUMO

Diante da necessidade de descobrir novas fontes naturais, capazes de substituir os antioxidantes artificiais parcial ou totalmente, atenuando o fenômeno da oxidação e garantindo o aumento da vida de prateleira de óleos comestíveis, buscou-se investigar o comportamento de extratos naturais de alho, chá verde e gengibre sobre o óleo de linhaça, quanto à capacidade de proteção contra a oxidação lipídica. Para isso, os extratos etanólicos e metanol/ acetônicos de alho (EEGL e MAEGL), chá verde (EEGT e MAEGT) e gengibre (EEGG e MAEGG), respectivamente, foram inicialmente comparados quanto ao conteúdo de fenólicos totais (TPC), pelo método de Folin-Ciocalteu, quanto à capacidade antioxidante, pelos métodos de sequestro do radical DPPH (RSA-DPPH), do poder de redução do ferro (FRAP) e do sistema β -caroteno/ácido linoleico, e quanto à estabilidade térmica, por meio de Termogravimetria/ Análise Térmica Diferencial (TG/ DTA). As estabilidades térmica e oxidativa do óleo de linhaça adicionado dos extratos etanólicos isolados ou associados aos compostos sintéticos terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e butil-hidroxitolueno (BHT) foram avaliadas, respectivamente, por meio das técnicas TG/ DTA e de ensaios de oxidação acelerada, como Calorimetria Exploratória Diferencial Pressurizada (P-DSC), PetroOxy, Rancimat e teste de estocagem acelerada em estufa. Os extratos avaliados apresentaram a seguinte ordem decrescente de TPC: EEGT ($483.45 \pm 15.23 \text{ mg GAE.g}^{-1}$) $\sim$ MAEGT ($469.28 \pm 17.84 \text{ mg GAE.g}^{-1}$) $>$ EEGG ($235.49 \pm 1.34 \text{ mg GAE.g}^{-1}$) $>$ MAEGG ($60.36 \pm 1.90 \text{ mg GAE.g}^{-1}$) $>$ EEGL ($10.55 \pm 0.76 \text{ mg GAE.g}^{-1}$) $>$ MAEGL ($3.01 \pm 0.15 \text{ mg GAE.g}^{-1}$ extrato seco). Para os ensaios de determinação da capacidade antioxidante, os extratos de chá verde apresentaram maior RSA-DPPH e FRAP, em relação às demais amostras. Os extratos apresentaram a seguinte ordem decrescente de estabilidade térmica: EEGT (111°C) $\sim$ MAEGT (110°C) $>$ EEGL (104°C) $>$ EEGG (96°C) $>$ MAEGL (68°C) $>$ MAEGG (63°C). Apesar do baixo TPC e da pequena resposta frente a RSA-DPPH e FRAP, o extrato etanólico de alho apresentou considerável capacidade de inibição da peroxidação lipídica, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, e alta estabilidade térmica, atribuídos aos compostos organossulfurados. Considerando os ensaios de estabilidade oxidativa das amostras de óleo aditivado, verificou-se que o extrato etanólico de alho, isolado ou sinergicamente associado ao TBHQ ou ao BHT, protegeu o óleo de linhaça de forma similar ou até superior aos antioxidantes sintéticos isolados, diante dos ensaios de P-DSC e PetroOxy, mantendo-o em bom estado de conservação geral até o 8º dia de armazenamento acelerado em estufa a 60°C . Os extratos de chá verde e gengibre ofereceram proteção ao óleo de linhaça até o 4º dia de estocagem acelerada, quando associados sinergicamente ao TBHQ, demonstrando ainda boa estabilidade oxidativa diante das técnicas P-DSC, PetroOxy e Rancimat. Os resultados sugerem a viabilidade de utilização dos extratos de chá verde e gengibre como substitutos parciais (LOGT/ TBHQ (50/50) e LOGG/ TBHQ (50/50)) e o extrato de alho como substituto total (LOGL 100) de antioxidantes sintéticos, sendo fontes alternativas naturais de antioxidantes para a aplicação na indústria de óleos comestíveis.

Palavras-chave: Óleo de linhaça, alho, chá verde, gengibre, antioxidantes, estabilidade térmica e oxidativa.

Title: Evaluation of the antioxidant potential of plant extracts, alone or combined synergistically to synthetic antioxidants, applied to linseed oil

Author: Poliana Sousa Epaminondas

Advisor: Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza

ABSTRACT

Faced with the need to find new natural sources, able to replace partially or totally artificial antioxidants, reducing the phenomenon of oxidation and ensuring increased shelf life of edible oils, we sought to investigate the behavior of natural extracts of garlic, green tea and ginger on linseed oil, for their ability to protect against lipid oxidation. For this, the ethanol and methanol/ acetic extracts of garlic (EEGL and MAEGL), green tea (EEGT and MAEGT) and ginger (EEGG and MAEGG), respectively, were initially compared for total phenolic content (TPC), by Folin-Ciocalteu method, as the antioxidant capacity, by Radical-Scavenging Activity of the DPPH (RSA-DPPH), by Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) and by β -carotene/ linoleic acid system method, and the thermal stability, by Thermogravimetry/ Differential Thermal Analysis (TG/ DTA). The thermal and oxidative stability of the linseed oil added with ethanolic extracts, singly or with synthetic compounds tert-butylhydroquinone (TBHQ) and butylated hydroxytoluene (BHT), were evaluated, respectively, by Thermogravimetry/ Differential Thermal Analysis (TG/ DTA) and accelerated oxidation tests, such as accelerated storage test in oven, Pressurized Differential Scanning Calorimetry (P-DSC), PetroOxy and Rancimat. The extracts showed the following descending order of TPC: EEGT (483.45 ± 15.23 mg GAE.g⁻¹) ~ MAEGT (469.28 ± 17.84 mg GAE.g⁻¹) > EEGG (235.49 ± 1.34 mg GAE.g⁻¹) > MAEGG (60.36 ± 1.90 mg GAE.g⁻¹) > EEGL (10.55 ± 0.76 mg GAE.g⁻¹) > MAEGL (3.01 ± 0.15 mg GAE.g mg⁻¹ dry matter). For the tests to determine the antioxidant capacity, green tea extracts showed higher RSA-DPPH and FRAP, compared to other samples. The extracts showed the following decreasing order of thermal stability : EEGT (111 °C) ~ MAEGT (110 °C) > EEGL (104 °C) > EEGG (96 °C) > MAEGL (68 °C) > MAEGG (63 °C). Despite the low response TPC and small compared to RSA-DPPH and FRAP, the ethanol extract of garlic showed considerable ability to inhibit lipid peroxidation, by β -carotene/ácido linoleic system, and high thermal stability, attributed to organosulfur compounds. Considering the oxidative stability tests of samples of additived oil, it was found that the ethanolic extract of garlic, alone or synergistically associated with the BHT or TBHQ, protected the linseed oil in a manner similar to or even higher than synthetic antioxidants alone, by P-DSC and PetroOxy assays, keeping it in good condition overall until the 8th day accelerated storage in an oven at 60 °C. Extracts of green tea and ginger offered protection to linseed oil until the 4th day of storage accelerated when combined synergistically to TBHQ, also demonstrating good oxidative stability by P-DSC, PetroOxy and Rancimat techniques. The results suggest the feasibility of using green tea and ginger extracts as partial substitutes (LOGT / TBHQ (50/50) and LOGG / TBHQ (50/50)) and garlic extract as total substitute (LOGL 100) of synthetic antioxidants, being alternative natural sources of antioxidants for application to the edible oil industry.

Keywords: Linseed oil, garlic, green tea, ginger, antioxidants, thermal and oxidative stability.

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 - Ácidos graxos essenciais n-3 e n-6 e suas conformações <i>cis</i>	21
Figura 2 - Metabolismo dos ácidos graxos n-3 e n-6.	22
Figura 3 - Mecanismo anti-inflamatório exercido por EPA.	23
Figura 4 - Esquema geral do mecanismo de auto-oxidação lipídica.	26
Figura 5 - Mecanismo de ação de antioxidantes primários.	28
Figura 6 - Híbrido do radical fenoxi, estabilizado por ressonância.	28
Figura 7 - Estrutura fenólica de antioxidantes sintéticos.	30
Figura 8 - Estrutura química de alguns compostos fenólicos.	33
Figura 9 - Estrutura química geral para os flavonoides.	34
Figura 10 - Classes de flavonoides presentes nos vegetais.	34
Figura 11 - Descrição botânica do alho.	36
Figura 12 - Principais COS presentes no alho, durante a produção, processamento e extração.	38
Figura 13 - Compostos organossulfurados do alho e seus derivados.	39
Figura 14 - Folhas frescas de <i>C. sinensis</i> L. Kuntze.	41
Figura 15 - Estrutura química das catequinas constituintes das folhas <i>C. sinensis</i>	42
Figura 16 - Etapas de processamento das folhas de <i>C. sinensis</i> para obtenção de chás diversos.	43
Figura 17 - Partes da planta originária do gengibre: destaque para flores e rizoma.	45
Figura 18 - Compostos fenólicos isolados de <i>Z. officinale</i>	46
Figura 19 - Comparação entre métodos de avaliação da estabilidade oxidativa.	50

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figure 1 -	Kinetics of bleaching of the β -carotene-linoleic acid system: protection against lipid peroxidation by action of garlic extracts, compared to positive (TBHQ, BHT and Trolox) and negative controls.	84
Figure 2 -	TG (a) and DTA (b) curves of garlic extracts and BHT.....	86
Figure 3 -	Alterations in peroxide values (PV) (a), anisidine values (AV) (b), Totox value (c), dienes (d) and conjugated trienes (e) of linseed oil samples, with or without additives stored at 60 °C for 16 days.....	89
Figure 4 -	Alterations in the main spectral bands linseed oil samples with (partially or completely) with or without additives at a temperature of 60 °C during 16 days of storage.....	92

ARTIGO 2

Figura 1 -	Curvas (a) TG/ DTA e (b) isotérmica a 65 °C do extrato etanólico de alho...	102
Figura 2 -	Curvas TG/ DTA do óleo de linhaça puro (a) e aditivado com antioxidantes sintéticos isolados (b-c), extrato de alho isolado (d-f) ou extrato de alho associado a antioxidantes sintéticos (g-h).....	104
Figura 3 -	Curvas P-DSC do óleo de linhaça puro ou aditivado com extrato etanólico de alho e/ou antioxidantes sintéticos.....	106
Figura 4 -	Percentuais de proteção das amostras de LOA em relação a LO, para HPOIT (a), IP (b) e OSI (c), por ação do extrato etanólico de alho e/ou antioxidantes sintéticos.....	107

ARTIGO 3

Figura 1 -	TPC em equivalentes de ácido gálico por grama de chá verde e gengibre desidratados.....	124
Figura 2 -	Cinética de descoloração do sistema β -caroteno-ácido linoleico: proteção contra peroxidação lipídica por ação dos extratos de chá verde e gengibre, comparados aos controles positivos (TBHQ, BHT e Trolox) e negativo.....	126
Figura 3 -	Curvas TG (a) e DTA (b) dos extratos de chá verde e gengibre e do BHT....	130
Figura 4 -	Alterações do índice de peróxidos (PV) (a), do índice de anisidina (AV) (b) e do valor Totox (c) de amostras de óleo de linhaça com ou sem aditivos naturais e/ ou sintéticos, estocados à temperatura de 60°C por 16 dias.....	131

Figura 5 - Alterações do índice de dienos (a) e trienos conjugados (b) de amostras de óleo de linhaça com ou sem aditivos naturais e/ ou sintéticos, estocados à temperatura de 60 °C por 16 dias	134
---	-----

ARTIGO 4

Figura 1 - Curvas TG (a) e DTA (b) dos controles negativo (LO) e positivo (LOTBHQ 100 e LOBHT 100).....	145
Figura 2 - Curvas TG (a-c) e DTA (b-d) das amostras de óleo de linhaça aditivadas com extrato de chá verde (a-b) e gengibre (c-d).....	146
Figura 3 - Percentuais de proteção do óleo de linhaça aditivado com extratos vegetais e/ou antioxidantes sintéticos em relação ao óleo não aditivado, quanto à estabilidade térmica.	147
Figura 4 - Percentuais de proteção do óleo de linhaça aditivado com extratos vegetais e/ou antioxidantes sintéticos em relação ao óleo não aditivado, para HPOIT (a), IP (b) e OSI (c).....	150

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Table 1 - Yield, TPC and antioxidant capacity (RSA-DPPH assay and FRAP) of garlic extracts, TBHQ and BHT.....	82
Table 2 - Data related to TG and DTA curves of garlic extracts and BHT.....	87

ARTIGO 2

Tabela 1 - Rendimento e TPC do extrato etanólico de alho.....	102
Tabela 2 - Dados referentes às curvas TG e DTA de EEGL.....	103
Tabela 3 - Dados referentes às curvas TG e DTA do óleo de linhaça puro ou aditivado com extrato etanólico de alho e/ou antioxidantes sintéticos.....	105
Tabela 4 - Dados de HPOIT (h), IP (h) e OSI (h) com os respectivos percentuais de proteção para o óleo de linhaça puro ou aditivado com extrato etanólico de alho e/ou antioxidantes sintéticos.....	107

ARTIGO 3

Tabela 1 - Rendimento, TPC e capacidade antioxidante (RSA-DPPH e FRAP) de extratos de chá verde e gengibre, TBHQ e BHT.....	124
Tabela 2 - Dados referentes às curvas TG e DTA dos extratos de alho e BHT.....	129

ARTIGO 4

Tabela 1 - Estabilidade térmica do óleo de linhaça puro ou aditivado com extratos vegetais e/ou antioxidantes sintéticos.....	147
Tabela 2 - Dados de HPOIT (h), IP (h) e OSI (h) para o óleo de linhaça puro ou aditivado com extratos vegetais e/ou antioxidantes sintéticos.....	149

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AA	Ácido araquidônico
AV	Índice de anisidina
ALA	Ácido alfa-linolênico
AG	Ácido graxo
AGE	Ácido graxo essencial
AP	Ascorbil palmitato
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
C	Catequina
CD	Dienos conjugados
COS	Compostos organossulfurados
COX	Cicloxigenases
CT	Trienos conjugados
DADS	Dissulfeto de dialila
DAS	Dialil sulfeto
DAT	Dialil trissulfeto
D.E.	Extrato seco
DHA	Ácido docosaheptaenóico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DTA	Análise Térmica Diferencial
EC	Epicatequina
EC50	Concentração do extrato com capacidade de reduzir 50% do DPPH• inicial
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
EE	Extrato etanólico
EEGL	Extrato etanólico de alho
EEGG	Extrato etanólico de gengibre
EEGT	Extrato etanólico de chá verde
EFA	Ácidos graxos essenciais
EGC	Epigallocatequina

EGCG	Galato de epigallocatequina
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
Fru-Arg	Frutosil-arginina
GAE	Equivalente de ácido gálico
GG	Gengibre
GL	Alho
GT	Chá verde
HPOIT	Tempo de indução oxidativa a altas pressões
IP	Período de indução
LA	Ácido linoleico
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LO	Óleo de linhaça
LOA	Óleo de linhaça aditivado
LOBHT 100	Óleo de linhaça aditivado com BHT (100 mg.kg ⁻¹)
LOGG 50	Óleo de linhaça aditivado com extrato etanólico de gengibre (50 mg.kg ⁻¹)
LOGG 100	Óleo de linhaça aditivado com extrato etanólico de gengibre (100 mg.kg ⁻¹)
LOGG 150	Óleo de linhaça aditivado com extrato etanólico de gengibre (150 mg.kg ⁻¹)
LOGL 50	Óleo de linhaça aditivado com extrato etanólico de alho (50 mg.kg ⁻¹)
LOGL 100	Óleo de linhaça aditivado com extrato etanólico de alho (100 mg.kg ⁻¹)
LOGL 150	Óleo de linhaça aditivado com extrato etanólico de alho (150 mg.kg ⁻¹)
LOGT 50	Óleo de linhaça aditivado com extrato etanólico de chá verde (50 mg.kg ⁻¹)
LOGT 100	Óleo de linhaça aditivado com extrato etanólico de chá verde (100 mg.kg ⁻¹)
LOGT 150	Óleo de linhaça aditivado com extrato etanólico de chá verde (150 mg.kg ⁻¹)
LOGG/BHT (50/50)	Óleo de linhaça aditivado com extrato etanólico de gengibre e BHT (50/50 mg.kg ⁻¹)
LOGG/TBHQ (50/50)	Óleo de linhaça aditivado com extrato etanólico de gengibre e TBHQ (50/50 mg.kg ⁻¹)
LOGL/BHT (50/50)	Óleo de linhaça aditivado com extrato etanólico de alho e BHT (50/50 mg.kg ⁻¹)
LOGL/TBHQ (50/50)	Óleo de linhaça aditivado com extrato etanólico de alho e TBHQ (50/50 mg.kg ⁻¹)

LOGT/BHT (50/50)	Óleo de linhaça aditivado com extrato etanólico de chá verde e BHT (50/50 mg.kg ⁻¹)
LOGT/TBHQ (50/50)	Óleo de linhaça aditivado com extrato etanólico de chá verde e TBHQ (50/50 mg.kg ⁻¹)
LOTBHQ 100	Óleo de linhaça aditivado com TBHQ (100 mg.kg ⁻¹)
LOX	Lipoxigenases
LT	Leucotrienos
MAE	Extrato metanol/ acetônico
MAEGL	Extrato metanol/ acetônico de alho
MAEGG	Extratos metanol/ acetônicos de gengibre
MAEGT	Extratos metanol/ acetônicos de chá verde
MRP	Produtos da reação de Maillard
n-3	Ômega 3
n-6	Ômega 6
OH	Hidroxila
OIT	Tempo de indução oxidativa
OSI	Índice de estabilidade oxidativa
PDSC	Calorimetria Exploratória Diferencial Pressurizada
PG	Propilgalato
PGI	Prostaglandinas
PGI E2 e E3	Prostaglandinas E2 e E3
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
PV	Índice de peróxido
RSA	Atividade sequestrante de radical
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SAC	S-alilcisteína
SDG	Diglicosídeo secoisolariciresinol
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona
T _{onset}	Tempo de oxidação <i>onset</i>
TPC	Conteúdo de fenólicos totais
TG	Termogravimetria
TOTOX	Valor total de oxidação

TPTZ	2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina
TX	Tromboxanos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO	19
3.1	ÓLEOS VEGETAIS: PROPRIEDADES FISIOLÓGICAS E TECNOLÓGICAS.....	19
3.2	ÓLEO DE LINHAÇA COMO ALIMENTO FUNCIONAL	19
3.2.1	Óleo de linhaça como fonte de ALA	20
3.3	DEGRADAÇÃO LIPÍDICA.....	24
3.4	COMPOSTOS ANTIOXIDANTES UTILIZADOS EM ALIMENTOS.....	27
3.4.1	Antioxidantes sintéticos	30
3.4.2	Antioxidantes naturais.....	32
3.5	ALIMENTOS FUNCIONAIS COMO FONTES DE BIOATIVOS ANTIOXIDANTES	35
3.5.1	Alho como fonte natural antioxidante	36
3.5.2	Potencial antioxidante do chá verde	40
3.5.3	Atividade antioxidante do gengibre	44
3.6	AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE ÓLEOS COMESTÍVEIS	47
3.6.1	Teste de estocagem acelerado em estufa ou “Schaal Oven Test”	48
3.6.2	DSC e P-DSC	48
3.6.3	PetroOxy.....	49
3.6.4	Rancimat.....	50
4	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	MATERIAIS.....	51
4.2	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS.....	51
4.3	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS.....	52
4.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS	53
4.4.1	Atividade sequestrante do radical DPPH.....	53
4.4.2	Potencial antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)	53
4.4.3	Auto-oxidação do sistema β -caroteno/ ácido linoleico.....	54
4.5	AVALIAÇÃO TÉRMICA DOS EXTRATOS.....	54
4.6	AVALIAÇÃO TÉRMICA E OXIDATIVA DO ÓLEO DE LINHAÇA	55
4.6.1	Preparação das amostras	55
4.6.2	Avaliação térmica do óleo de linhaça	57
4.6.3	Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo de linhaça	57
4.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	60
	REFERÊNCIAS	61
5	RESULTADOS	72
	Artigo 1	73
	Artigo 2	97
	Artigo 3	114
	Artigo 4.....	140
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	155

1 INTRODUÇÃO

O óleo de linhaça é considerado um óleo vegetal de nobre perfil lipídico, por ser constituído de cerca de 62% de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), 24 % de ácidos graxos (AG) monoinsaturados, especialmente ácido oleico, e apenas cerca de 14% estão sob forma de AG saturados. Dentre os PUFA, aproximadamente 43% dos lipídios correspondem ao ácido graxo essencial (AGE) ômega-3 (n-3) ácido alfa-linolênico (ALA) e 18% correspondem ao AGE ômega-6 (n-6) ácido linoleico (AL) (EPAMINONDAS et al., 2011a). As propriedades cardioprotetora, anticarcinogênica e imunomoduladora atribuídas ao óleo de linhaça devem-se principalmente à capacidade anti-inflamatória de ALA que, associadas às demais propriedades de compostos presentes na linhaça, faz desta semente um alimento de alta qualidade nutricional e funcional (ADKINS; KELLEY, 2010; HSIEH; LIN, 2011; NAQSHBANDI; RIZWAN; KHAN, 2013; RODRIGUEZ-LEYVA et al., 2010).

Óleos constituídos por AG muito insaturados, como o ALA e o AL, presentes na semente de linhaça, apresentam menor estabilidade, quando comparados aos óleos formados por AG menos insaturados, estando aqueles mais susceptíveis à deterioração pelo processo de rancidez auto-oxidativa (SILVA; JORGE, 2012), que resultam em alterações indesejáveis de cor, sabor, odor e consistência, além da depreciação do produto, com perda de seu valor comercial e redução em seu valor nutritivo e funcional (ZHANG et al., 2010).

A preocupação constante de proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade tem contribuído para o desenvolvimento de várias técnicas com o intuito suprimir ou atenuar *flavors* indesejáveis, reduzir a reatividade e aumentar a estabilidade de produtos oleosos (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Antioxidantes sintéticos, como terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e butil-hidroxitolueno (BHT), têm sido utilizados há muitos anos pelas indústrias alimentícias para inibir o processo oxidativo e aumentar a vida de prateleira de óleos comestíveis. Estes, porém, têm sido restritos em vários países, devido aos efeitos tóxicos à saúde humana (HRAS et al., 2000; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999). No Brasil, TBHQ e BHT podem ser utilizados com limite máximo de 200 mg.kg⁻¹ e 100 mg.kg⁻¹, respectivamente (BRASIL, 2001). Por esse motivo, pesquisas de antioxidantes naturais têm sido incentivadas, com a finalidade de obtenção de fontes antioxidantes seguras à saúde humana e eficazes contra a oxidação (BREWER, 2011).

Diante da necessidade de desenvolvimento de fontes naturais, capazes de atenuar o fenômeno da oxidação e garantir o aumento da vida de prateleira do óleo de linhaça e de outros óleos comestíveis, torna-se viável investigar a atuação antioxidante de extratos naturais de alho, chá verde e gengibre, a fim de avaliar sua capacidade de substituir os antioxidantes artificiais parcial ou totalmente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antioxidante *in vitro* de extratos de *Allium sativum* L. (alho), *Camellia sinensis* L. (chá verde) e *Zingiber officinale* R. (gengibre), verificar seus efeitos sobre as estabilidades térmica e oxidativa do óleo de linhaça e analisar a viabilidade de utilizá-los para substituição parcial ou total de antioxidantes sintéticos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Caracterizar os extratos etanólicos (EE) e metanol-acetônicos (MAE), obtidos a partir de bulbilhos de alho (GL), folhas de chá verde (GT) e rizomas de gengibre (GG), quanto ao teor de fenólicos totais (TPC), pelo método Folin-Ciocalteu;

Comparar o potencial antioxidante de EE e MAE de alho, chá verde e gengibre, pelos métodos de sequestro do radical livre DPPH, poder redutor do ferro (FRAP) e oxidação acoplada ao sistema β -caroteno/ ácido linoleico;

Avaliar o comportamento térmico de EE e MAE de alho, chá verde e gengibre, bem como do óleo de linhaça aditivado (LOA) com os extratos etanólicos, associados ou não a antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT, por meio da técnica de Termogravimetria/ Análise Térmica Diferencial (TG/ DTA);

Avaliar a estabilidade oxidativa de LOA com extratos etanólicos de alho, chá verde e gengibre, isolados ou associados aos antioxidantes sintéticos TBHQ ou BHT, pelos métodos acelerados de Calorimetria Exploratória Diferencial Pressurizada (P-DSC), PetroOxy, Rancimat e estocagem acelerada em estufa a 60 °C, associada a métodos físico-químicos e à espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR).

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ÓLEOS VEGETAIS: PROPRIEDADES FISIOLÓGICAS E TECNOLÓGICAS

Óleos são substâncias insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, que se diferenciam das gorduras por se apresentarem em estado líquido à temperatura de 25 °C, enquanto que as gorduras se apresentam na forma sólida, nesta mesma temperatura. Quimicamente, são formados por mono, di e triacilglicerois, ácidos graxos livres, glicolipídeos, fosfolipídeos, esteróis e outras substâncias, podendo ser originados de fontes animais, vegetais e microbianas (BATISTA, 2013; MORETTO; FETT, 1998).

Os óleos são importantes fontes alimentares de calorias e ácidos graxos essenciais ALA (n-3) e AL (n-6), não produzidos pelo organismo, necessitando, portanto, serem adquiridos a partir da dieta. Fisiologicamente, atuam como veículos de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K), compõem as membranas celulares, armazenam-se sob forma de tecido adiposo, isolando termicamente o organismo e protegendo os órgãos internos, além de participarem da composição de hormônios sexuais. Tecnicamente, contribuem para melhorar a palatabilidade dos alimentos, podendo ainda ser utilizados como emulsificantes, texturizantes, aromatizantes, umectantes e transmissores de calor à alta temperatura (BATISTA, 2013).

3.2 ÓLEO DE LINHAÇA COMO ALIMENTO FUNCIONAL

O óleo de linhaça é um produto obtido a partir do processamento do farelo de sementes do linho (*Linum usitatissimum* L.), da família das Lináceas, mais conhecidas como sementes de linhaça ou, simplesmente, linhaça. Tais sementes são mundialmente difundidas como um alimento funcional, já que seu consumo frequente proporciona benefícios para a saúde humana. Além dos nutrientes básicos (minerais, vitaminas, proteínas e lipídeos), a linhaça é constituída de compostos fitoquímicos com propriedades benéficas, como polifenóis e tocoferóis (antioxidantes), AGE n-3 (antiinflamatório), fibras (laxante) e ligninas (anticarcinogênicas) (ADKINS; KELLEY, 2010; CÄMMERER; KROH, 2009; MASON; CHEN; THOMPSON, 2010), sendo, portanto, frequentemente utilizada como suplemento alimentar para a redução do risco de doenças crônico-degenerativas (câncer, diabetes, hipertensão, obesidade), cardiovasculares e intestinais (EPAMINONDAS et al., 2011b;

UDENIGWE et al., 2009). Segundo (BRASIL, 1999), “alimento funcional é todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumidos na dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”.

A qualidade nutricional dos alimentos está intimamente relacionada, dentre outros fatores, ao seu perfil lipídico. A proporção entre os AG saturados, monoinsaturados e poli-insaturados exerce influência sobre as propriedades físicas, químicas, nutricionais e funcionais de um alimento (EPAMINONDAS, 2009).

O óleo de linhaça é constituído de triacilgliceróis com baixo teor de ácidos graxos saturados (cerca de 9 a 14 %), e um elevado teor de ácidos graxos insaturados (86 a 91 %), destacando-se o ALA (cerca de 57 %) e o AL (cerca de 16%), considerados ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) n-3 e n-6, respectivamente (EPAMINONDAS et al., 2011a).

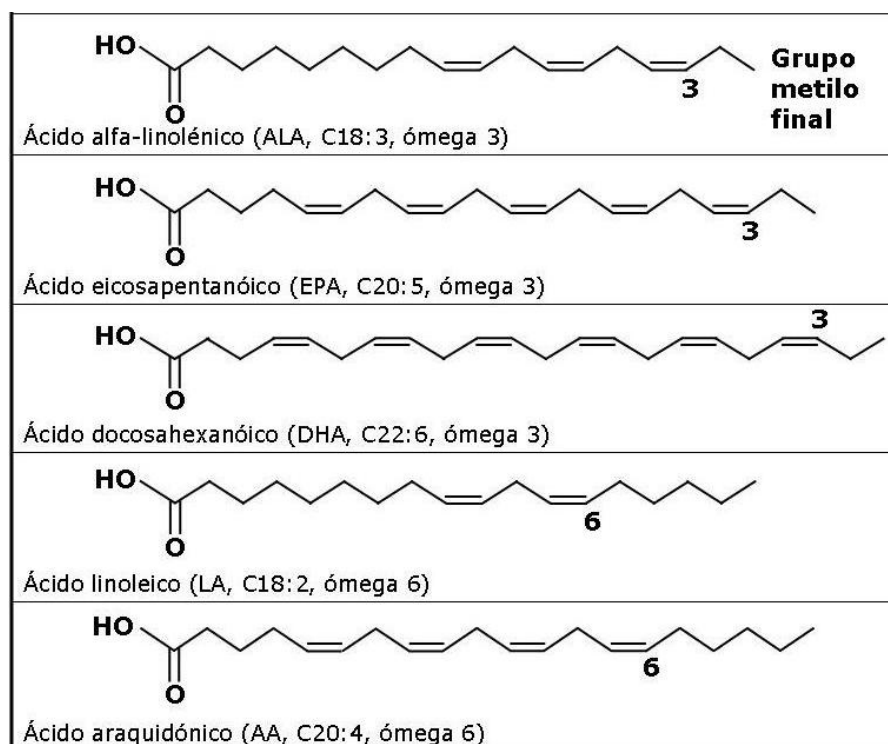
3.2.1 Óleo de linhaça como fonte de ALA

O óleo de linhaça é considerado uma fonte vegetal alternativa do AGE n-3 ácido α -linolênico (ALA, C18:3), destacando-se do azeite de oliva (0,74%), óleo de soja (9,04%) e óleo de canola (9,56%), por apresentar 53,3% de ALA (RODRIGUEZ-LEYVA et al., 2010).

Denominam-se n-3 e n-6 os AGE de cuja primeira dupla ligação, a partir do grupo metila terminal, encontra-se, respectivamente, entre o terceiro e o quarto e entre o sexto e o sétimo carbonos da cadeia lipídica (Figura 1). Por não serem biossintetizados pelo organismo humano, os AGE precisam ser adquiridos por meio da dieta (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005).

Metabolicamente, ALA e AL podem passar por biorreações de alongamento (aumento do número de carbonos) da cadeia carbônica e de desidrogenação ou dessaturação (aumento do número de duplas ligações), podendo ser alongados a cadeias de pelo menos 20 a 22 carbonos (Figura 2). ALA é, portanto, precursor metabólico dos ácidos eicosapentaenoico (EPA, C20:5 n-3) e docosahexaenoico (DHA, C22:6 n-3), comuns no óleo de peixe, enquanto que AL pode ser metabolizado em outros ácidos n-6, dentre eles os ácidos γ -linolênico (C18:3 n-6), dihomog γ -linolênico (C20:3 n-6) e araquidônico (C20:4 n-6) (AA) (EPAMINONDAS, 2009; MARZA; LESA, 2006; MORETTO; FETT, 1998; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; RODRIGUEZ-LEYVA et al., 2010).

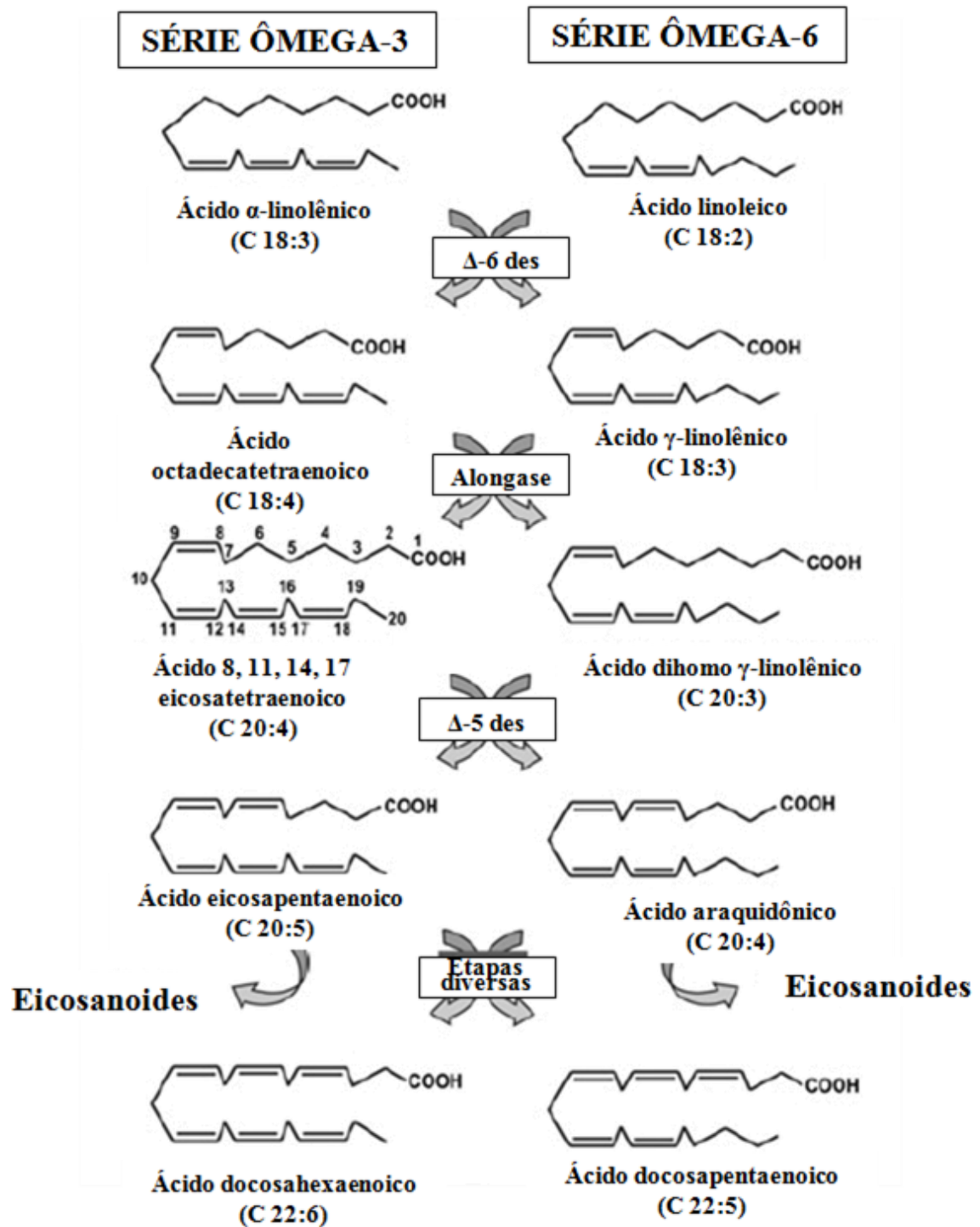
Figura 1 – Ácidos graxos essenciais n-3 e n-6 e suas conformações *cis*.



Fonte: EUFIC (2008).

PUFA n-3 e n-6 atuam no organismo humano modulando a produção de prostaglandinas (PGI), leucotrienos (LT) e tromboxanos (TX), eicosanoides mediadores da inflamação tecidual. O n-6 AA ativa o processo inflamatório ao ser liberado das membranas celulares lesionadas, sendo convertido a prostaciclina, PGL (PG A₂, D₂, E₂ e F₂) e TX (TX A₂) por enzimas cicloxigenases (COX), e em LT (LT A₄, B₄, C₄, D₄ e E₄) por enzimas lipoxigenases (LOX). Esses eicosanoides estão em pequenas concentrações nos tecidos normais e em altas concentrações quando há lesões teciduais, contribuindo para a agregação plaquetária e consequente formação de trombos e ateromas, além de processos alérgicos e da proliferação celular (EPAMINONDAS, 2009; EPAMINONDAS et al., 2011b; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005).

Figura 2 – Metabolismo dos ácidos graxos n-3 e n-6.

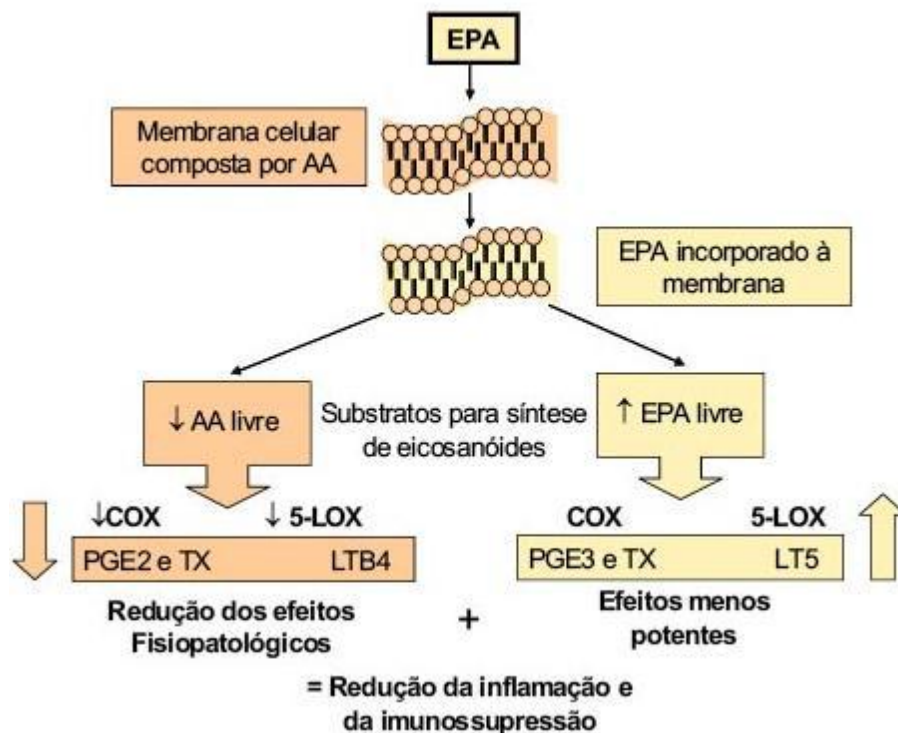


Fonte: EPAMINONDAS, 2009, p. 32, adaptado de MARZA; LESA, 2006, p. 78.

Legenda: Δ -6 des - Δ -6 dessaturase; Δ -5 des - Δ -5 dessaturase.

Entretanto, estando em níveis adequados no organismo, EPA e DHA ativam mecanismos anti-inflamatórios, competindo com o AA nas vias enzimáticas COX e LOX, contribuindo para a redução da formação de mediadores pró-inflamatórios LT da série 4 e TX da série 2 e favorecendo a produção de LT das séries 3 e 5 (TX A3, PGL G3 e H3, LT B5) (Figura 3). Estes mediadores apresentam menor potencial inflamatório, com pouca ou nenhuma atividade biológica. Dessa forma, AGE n-3 contribuem para a inibição da agregação plaquetária, melhorando a dilatação vascular e, conseqüentemente, a frequência cardíaca, a circulação e a pressão sanguíneas, havendo também a regulação das respostas imunológicas. A compreensão do mecanismo anti-inflamatório é fundamental para se entender os efeitos cardioprotetores dos n-3, bem como seus benefícios na redução do risco de cânceres, psoríase e problemas articulares (DEFILIPPIS; SPERLING, 2006; EPAMINONDAS, 2009; MORRIS, 2006).

Figura 3 – Mecanismo anti-inflamatório exercido por EPA.



Fonte: FORTICARE (2012).

Legenda: Cox – Cicloxigenase; Lox – Lipoxigenase; PGE2 e E3 – Prostaglandinas E2 e E3; LTB4 e 5 – Leucotrienos B4 e 5; Tx – tromboxano.

Hábitos alimentares baseados em carnes gordas, *fast foods*, frituras feitas com óleos vegetais, além da diminuição do consumo de frutas, verduras e espécies marinhas, têm

caracterizado a dieta do homem ocidental atual como rica em AG n-6 e pobre em n-3. O consumo exagerado de n-6 pode interferir na conversão do n-3 ALA em EPA e DHA, propiciando o aumento dos níveis de ácido araquidônico (AA) nos fosfolipídios de membranas que, a longo prazo, ocasionam excessiva produção de eicosanoides pró-inflamatórios e os consequentes endurecimento e contração dos vasos sanguíneos, aumento da proliferação celular e da transmissão da dor, além da imunodepressão (MORRIS, 2006; TRUCOM, 2006).

Estima-se que a proporção de consumo atual de n-3: n-6 na dieta ocidental seja de 1:20 a 1:25, sendo o consumo recomendado em torno de 1:5 a 1:10 (MORRIS, 2006). Para equilibrar a baixa ingestão de n-3 nessas dietas, o consumo de alimentos funcionais e suplementos constituídos de PUFA, fontes de n-3 em especial, tem sido estimulado. Devido ao alto teor de ALA, o uso do óleo de linhaça na dieta contribui para uma proporção dietética equilibrada de AG n-3: n-6, já que, para este óleo, tal proporção é de cerca de 1:0,3 (DEFILIPPIS; SPERLING, 2006; EPAMINONDAS, 2009; GALLARDO et al., 2013).

Utilizado como complemento alimentício de AG n-3, o óleo de linhaça apresenta-se comercialmente sob forma de cápsulas ou embalado a vácuo em garrafas opacas. A vida de prateleira deste óleo é geralmente de cerca de 6 meses, sendo recomendada a conservação sob refrigeração e em ambiente escuro por até seis semanas, após aberta a embalagem (FLAX COUNCIL OF CANADA, 2005; MORRIS, 2003). Estudos realizados por Bravi et al. (2011) evidenciaram que o óleo de linhaça apresentou maior conservação de diglicosídeo secoisolariciresinol (SDG) e de compostos fenólicos diante do armazenamento sob refrigeração no escuro, após 90 dias de estocagem, enquanto que a adição de antioxidante α -tocoferol atuou como pró-oxidante. Outro estudo comprovou que o armazenamento no escuro, livre de ar e em garrafas de vidro aumentou a vida de prateleira de amostras de óleo de girassol (KUCUK; CANER, 2005).

3.3 DEGRADAÇÃO LIPÍDICA

A degradação lipídica pode ter sua origem associada ao acondicionamento inadequado de sementes oleaginosas e de seus óleos derivados, durante a produção, processamento e armazenamento, envolvendo complexas reações químicas entre o oxigênio atmosférico e os AG insaturados constituintes dos lipídios dos alimentos. Como resultado de tal degradação, ocorrem alterações indesejáveis de cor, sabor, odor e consistência dos mesmos, além da depreciação do produto, com perda de valor comercial e redução do valor nutritivo,

ocasionado pela oxidação de proteínas e vitaminas por ação dos peróxidos formados. Estas alterações comprometem a integridade e a segurança dos alimentos, que podem trazer prejuízos à saúde humana, devido à formação de compostos poliméricos potencialmente tóxicos (SCHAICH, 2012; SILVA; JORGE, 2012; ZHANG et al., 2010).

Lipídios contidos em alimentos podem sofrer degradação por várias vias, em função do meio e de agentes catalisadores (luz, temperatura, presença de pró-oxidantes, como metais e pigmentos, além de enzimas, metaloproteínas, microrganismos e condições de armazenamento (BARRIUSO; ASTIASARÁN; ANSORENA, 2013; MORETTO; FETT, 1998; RAMALHO; JORGE, 2006; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

A auto-oxidação pode ser definida como a reação espontânea dos lipídios com o oxigênio atmosférico por meio de uma reação de radicais livres em cadeia, podendo ser acelerada por temperaturas elevadas. Já a foto-oxidação envolve a excitação de um fotossensibilizador, como a clorofila, e a transferência de energia para as moléculas de lipídios ou de oxigênio (BARRIUSO; ASTIASARÁN; ANSORENA, 2013; SCHAICH, 2012; SHAHIDI; ZHONG, 2010). Wanasundara e Shahidi (1998) verificaram que extratos de chá verde com e sem clorofila, adicionados a amostras de óleos marinhos, apresentaram comportamento pró e antioxidante, respectivamente, diante do armazenamento acelerado em estufa a 65 °C.

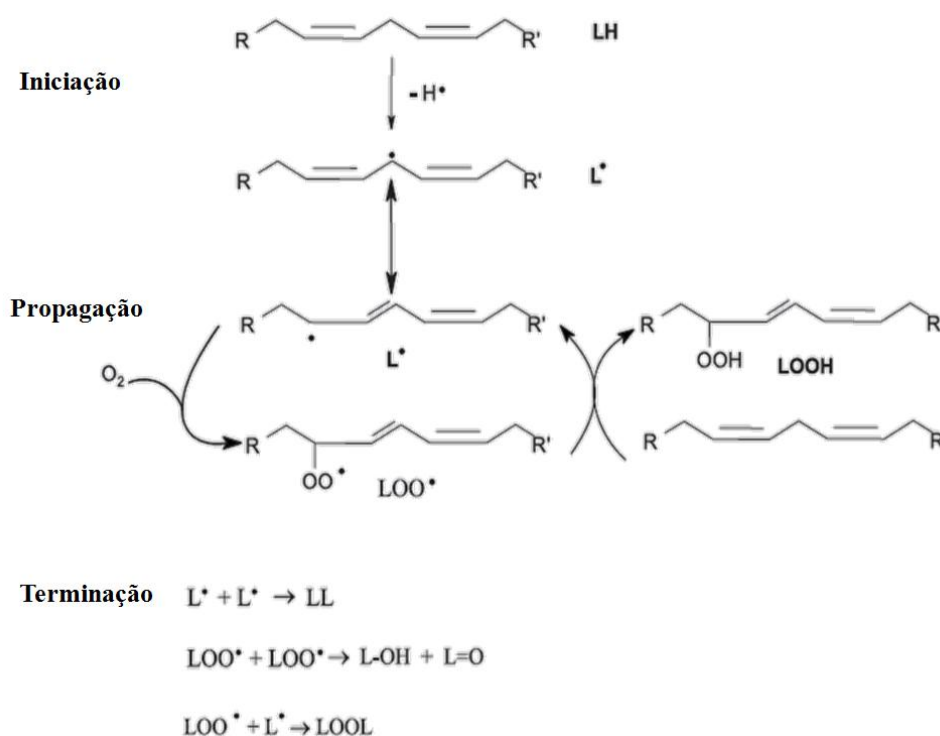
Por ser constituído por altas concentrações de AG poli-insaturados, como o ALA e o AL, o óleo de linhaça é considerado um óleo vegetal de baixa estabilidade, estando mais susceptível à deterioração pelo processo de rancidez auto-oxidativa, quando comparado a óleos menos insaturados (GALLARDO et al., 2013). Segundo Dunn (2005), ácidos graxos poli-insaturados de cadeias longas são cerca de duas vezes mais reativos quanto à oxidação, quando comparados a ésteres monoinsaturados. Ésteres de ácido linolênico > linoleico > oleico, quanto à taxa de oxidação relativa, devido ao maior número de sítios reativos para iniciação da reação de auto-oxidação, para cadeias de ácidos graxos di e tri-insaturados (COSGROVE; CHURCH; PRYOR, 1987; KNOTHE, 2002).

A oxidação enzimática é resultante da ação das enzimas lipoxigenases, que catalisam a adição de oxigênio às cadeias de ácidos graxos poli-insaturados, formando peróxidos e hidroperóxidos, com duplas ligações conjugadas, que podem se envolver em reações degradativas, dando origem a produtos secundários semelhantes aos gerados no processo de auto-oxidação (RAMALHO; JORGE, 2006).

O mecanismo geral de auto-oxidação (Figura 4) ocorre a partir de reações de radicais livres em cadeia e divide-se em três fases, a iniciação, a propagação e a terminação. Na fase

de iniciação, a abstração de um átomo de hidrogênio da molécula do ácido graxo insaturado contribui para a formação de um radical livre, que reage rapidamente com o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$), formando um radical peróxido. Esta etapa é caracterizada, assim, pela formação de RL, consumo pequeno e lento de oxigênio, baixo nível de peróxidos e inalteração de aroma e sabor do alimento. Na fase de propagação, os peróxidos, hidroperóxidos e outros radicais formados atuam sobre moléculas de ácidos graxos não oxidados, desencadeando uma reação em cadeia que propaga a oxidação. Assim, esta etapa caracteriza-se pela reação em cadeia de RL, alto consumo de oxigênio, alto teor de peróxidos e início das alterações de aroma e sabor. Na terminação, os radicais livres começam a reagir entre si, gerando uma grande variedade de compostos secundários, como cetonas, ácidos carboxílicos e, principalmente, aldeídos de baixo peso molecular, responsáveis pelo sabor e odor desagradáveis do ranço, pelo aumento da viscosidade e pela alteração da cor (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

Figura 4 - Esquema geral do mecanismo de auto-oxidação lipídica.



Fonte: LIMA; ABDALLA, 2001, p. 294.

LH– ácido graxo insaturado, $\text{L}^\bullet$ – radical livre, $\text{LOO}^\bullet$ – radical peróxido e LOOH– hidroperóxido.

A busca pelo prolongamento da vida útil de óleos e gorduras tem levado à adoção de medidas que permitam limitar o fenômeno da oxidação durante a produção, o processamento e o armazenamento destes produtos. Como consequência, tem surgido uma série de estudos

para avaliar o potencial antioxidante de vários compostos e para se conhecer a concentração adequada, a influência do sistema lipídico e da temperatura, existindo também forte tendência de substituição dos antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais, visto que pesquisas têm demonstrado a possibilidade de os sintéticos apresentarem algum efeito tóxico (RAMALHO; JORGE, 2006).

3.4 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES UTILIZADOS EM ALIMENTOS

Para inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos e gorduras, é necessário diminuir a incidência de seus fatores desencadeantes, mantendo ao mínimo os níveis de energia (temperatura e luz), responsáveis pelo processo de formação de radicais livres, evitando a presença de traços de metais no óleo e o contato deste com oxigênio, e bloqueando a formação de radicais livres por meio de antioxidantes, os quais, em pequenas quantidades, atuam interferindo nos processos de oxidação de lipídios (RAMALHO; JORGE, 2006).

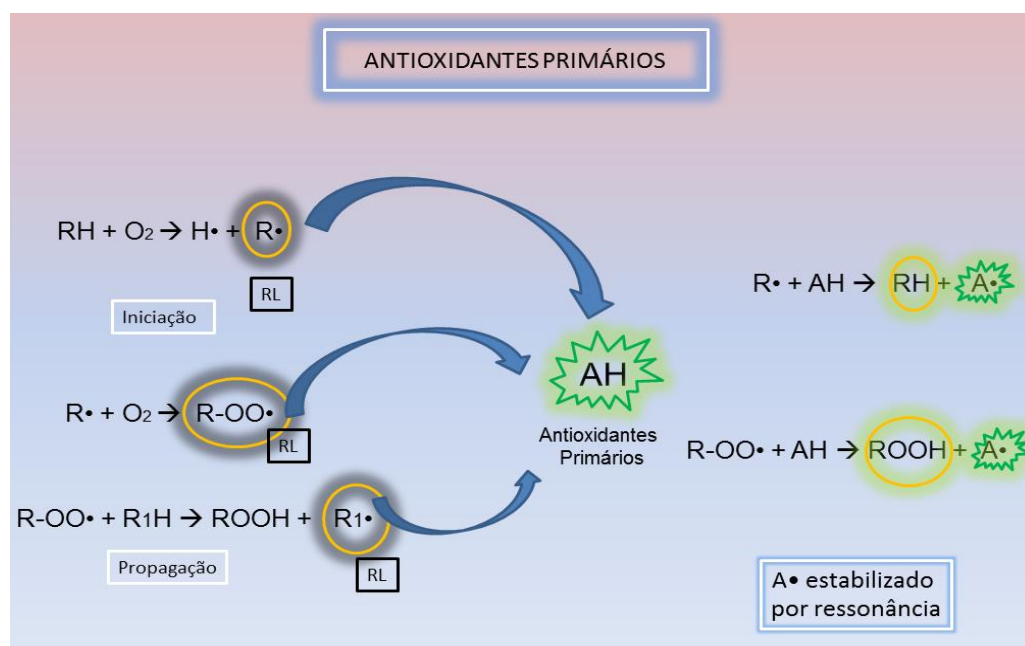
O uso de aditivos antioxidantes é bastante comum na indústria alimentícia, por ser um dos métodos mais eficazes para a detenção do processo oxidativo e para o aumento da vida de prateleira de óleos comestíveis. Antioxidante é qualquer substância presente em baixa concentração, em comparação com o substrato oxidável, capaz de regenerá-lo ou inibir, prevenir ou retardar significativamente a deterioração do mesmo por oxidação (HALLIWELL, 2000; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

A seleção do antioxidante a ser empregado na proteção de alimentos deve obedecer a alguns critérios, tais como a eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%); a ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características sensoriais do alimento; a fácil aplicabilidade; a estabilidade nas condições de processo e armazenamento, além da não-toxicidade do composto e de seus produtos de oxidação, mesmo em doses muito maiores às que normalmente seriam ingeridas no alimento. É importante considerar também a legislação, a preferência do consumidor por antioxidantes naturais, além da eficiência antioxidante associada à fácil obtenção a baixos custos industriais (RAMALHO; JORGE, 2006; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

Os antioxidantes podem ser agrupados de acordo com seu mecanismo de ação. Entretanto, alguns exibem mais de um mecanismo de atividade, sendo considerados, portanto, antioxidantes de múltipla função. Uma das classificações mais aceitas agrupa-os em antioxidantes primários ou de quebra de reações em cadeia, e antioxidantes secundários ou preventivos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Os antioxidantes primários atuam, devido à natureza química de suas moléculas, como aceptores ou captadores de radicais livres, atrasando ou inibindo a etapa de iniciação, ou ainda interrompendo a etapa de propagação de auto-oxidação. Os radicais livres $R\cdot$ e $ROO\cdot$, formados durante as etapas de iniciação e propagação da auto-oxidação, abstraem o átomo de hidrogênio ativo do antioxidante com maior facilidade que os hidrogênios alílicos das moléculas insaturadas, formando-se espécies inativas para a reação em cadeia (Figura 5). O radical proveniente do antioxidante ($A\cdot$) é, então, estabilizado por deslocamento do elétron desemparelhado em torno do anel fenólico, formando um híbrido de ressonância estável, de baixa energia, incapacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (Figura 6) (WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

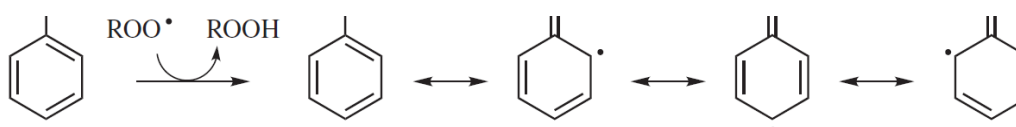
Figura 5 - Mecanismo de ação de antioxidantes primários.



Fonte: Própria (2010).

Legenda: RH – ácido graxo insaturado; $R\cdot$ e $R-OO\cdot$ – radicais livres; AH – antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo; $A\cdot$ – radical inerte.

Figura 6 - Híbrido do radical fenoxi, estabilizado por ressonância.



Fonte: WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005, p. 439.

A maioria dos antioxidantes primários que atuam como sequestrantes de radicais livres são polifenóis, com uma ou mais hidroxilas (OH) no anel aromático, destacando-se butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), considerados antioxidantes sintéticos, e ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides e tocoferóis, que são naturais, podendo estes últimos também ser considerados antioxidantes biológicos. Quanto maior o número de hidroxilas ligadas ao anel, maior é a atividade antioxidante do composto fenólico (RAMALHO; JORGE, 2006; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

Antioxidantes secundários, também chamados preventivos, exercem sua atividade antioxidante por meio de vários mecanismos de ação, para diminuir as reações de oxidação. A principal diferença em relação aos primários é que secundários não são capazes de converter radicais livres em moléculas estáveis. Atuam como (RAMALHO; JORGE, 2006; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005):

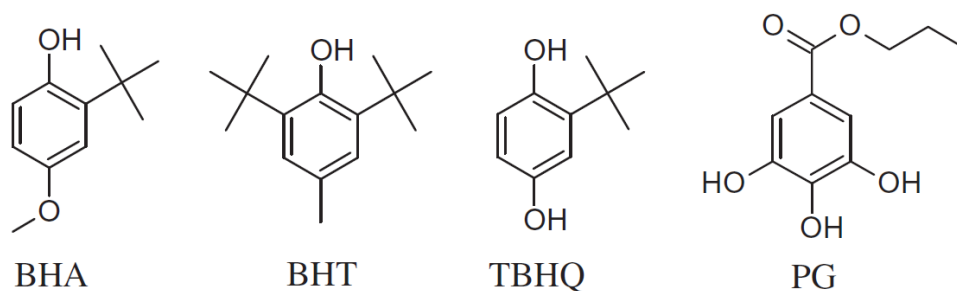
- **Agentes quelantes/ sequestradores de metais:** complexam íons metálicos catalisadores da oxidação lipídica, especialmente cobre e ferro, a partir de um par de elétrons não compartilhado em sua estrutura molecular. Sais de ácido etileno diamino tetra acético (EDTA) e ácido cítrico e seus sais derivados são exemplos de agentes quelantes;
- **Removedores de oxigênio:** a inativação do oxigênio singlete, em estado de excitação, é uma forma mais eficaz de prevenir a iniciação da oxidação lipídica. Os removedores de oxigênio capturam o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis, tornando-os indisponíveis para propagarem a auto-oxidação. Como representantes deste grupo, destaca-se o ácido ascórbico (isômeros e derivados);
- **Sinergistas:** são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante que, ao serem combinadas adequadamente, podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários. O sinergismo é, portanto, o efeito cooperativo entre antioxidantes, ou de um antioxidante com outros compostos, para a produção de uma atividade melhorada em relação às atividades de cada componente isolado. O ácido ascórbico, por exemplo atua sinergicamente com o α -tocoferol, regenerando e reciclando o radical tocoferoxil. Combinando um captador de radicais livres com um quelante de metais, as taxas de oxidação diminuem devido à ação do quelante, que inibe a oxidação catalisada por metais, gerando-se menos radicais livres no sistema.

- **Antioxidantes biológicos:** incluem várias enzimas, como glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases, que removem oxigênio ou radicais livres de um sistema alimentício ou biológico. A enzima superóxido dismutase, encontrada em tecidos, catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio. A catalase catalisa a conversão de peróxidos de hidrogênio a água e oxigênio. A glicose oxidase, associada à catalase, é utilizado comercialmente para remover oxigênio a partir de alimentos, em particular sucos de fruta, maionese e molhos para saladas. A glutathione peroxidase, encontrada em tecidos biológicos, também ajuda a controlar peróxidos de hidrogênio.
- **Antioxidantes mistos:** geralmente, exibem mais de um possível mecanismo de ação para proteção de sistemas lipídicos, incluindo compostos extraídos de vegetais. Dentre eles, destacam-se proteínas hidrolisadas, flavonoides e ácidos fenólicos (ácidos cafeico, ferúlico e gálico) (SANTOS et al., 2012).

3.4.1 Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são BHA, BHT, TBHQ e PG (Figura 7). Tratam-se de compostos com estrutura mono ou poli-hidroxi fenólica, classificados como antioxidantes primários, que atuam doando prótons aos radicais livres, regenerando-os e interrompendo a iniciação e propagação de reações oxidativas. Entretanto, apresentam o inconveniente de serem voláteis e facilmente decompostos em altas temperaturas (ANDREO; JORGE, 2006; RAMALHO; JORGE, 2006). Santos et al. (2012) verificaram que amostras de BHT, BHA e TBHQ, avaliadas por termogravimetria, volatilizaram durante as primeiras horas de análise, apresentando baixa estabilidade térmica a 110 °C.

Figura 7 - Estrutura fenólica de antioxidantes sintéticos.



Apesar da inconveniente volatilidade e da perda parcial por desidratação diante de processos térmicos, o BHA é muito utilizado em gorduras animais e em óleos vegetais, exercendo boa atividade antioxidante e mantendo-se ativo mesmo em condições adversas. O BHT é mais eficaz em gorduras animais do que em óleos vegetais. Por ser mais volátil e menos estável que o BHA, é geralmente utilizado em combinação com este, agindo sinergicamente: enquanto o BHA atua como sequestrante de radicais peróxidos, o BHT age como sinergista, ou regenerador de radicais BHA (RAMALHO; JORGE, 2006; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

PG é levemente solúvel em água e pouco resistente ao calor, não suportando tratamentos de cocção. Atuam também como agentes quelantes de metais, retardando oxidações lipídicas catalisadas por íons metálicos, porém costumam formar complexos escuros, que podem afetar negativamente o apelo estético do alimento. Atuam sinergicamente com outros antioxidantes, como o BHT e BHA, com concentrações limitadas, a partir das quais passam a ser pró-oxidantes (RAMALHO; JORGE, 2006; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

TBHQ é moderadamente solúvel em óleos e gorduras, sendo considerado um bom antioxidante para óleos de fritura, pois resiste ao calor e proporciona alta estabilidade para os produtos lipídicos. Santos et al. (2012) verificaram a elevada resistência térmica do TBHQ, pela técnica de Termogravimetria. Isto pode justificar a alta proteção oferecida por este antioxidante a óleos de fritura. É mais eficaz em óleos vegetais que BHA ou BHT, enquanto que, para gordura animal, é tão efetivo quanto o BHA e mais efetivo que o BHT ou o PG. Ácido cítrico e TBHQ apresentam excelente sinergismo em óleos vegetais (RAMALHO; JORGE, 2006; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

Estudos toxicológicos têm demonstrado possíveis efeitos carcinogênicos e hiperplásicos por parte do consumo de alimentos aditivados com antioxidantes sintéticos (HRAS et al., 2000; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999; SUN-WATERHOUSE; THAKORLAL; ZHOU, 2011). Desta forma, o uso destes antioxidantes têm sido restrito em vários países, sendo no Brasil controlado pelo Ministério da Saúde, que determina os valores de 200 mg.kg⁻¹ para BHA e TBHQ, e 100 mg.kg⁻¹ para BHT como concentrações máximas permitidas (ANDREO; JORGE, 2006; BRASIL, 2001; RAMALHO; JORGE, 2006).

Estes possíveis efeitos prejudiciais do consumo de antioxidantes sintéticos e a crescente preocupação com a saúde têm contribuído para o desenvolvimento de pesquisas voltadas para a descoberta do potencial antioxidante de produtos naturais, com o intuito de substituir os antioxidantes sintéticos ou reduzir seu uso em alimentos. Extratos naturais de

matrizes alimentares diversas, constituídos de ácidos fenólicos, ácido ascórbico, carotenoides, tocoferóis, entre outros, são uma alternativa genuinamente capaz de combater radicais livres e impedir a oxidação, sem ocasionar danos à saúde humana (MICHOTTE et al., 2011; SUN-WATERHOUSE; THAKORLAL; ZHOU, 2011).

3.4.2 Antioxidantes naturais

Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de partes de vegetais, como raízes, cascas, folhas, frutos, sementes, dentre outras, sendo excelentes fontes de tocoferóis, carotenoides e compostos fenólicos, dentre outros. O alto potencial antioxidante das substâncias fenólicas faz delas ótimos conservantes naturais, que podem ser bastante úteis para a indústria de alimentos (ANDREO; JORGE, 2006; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

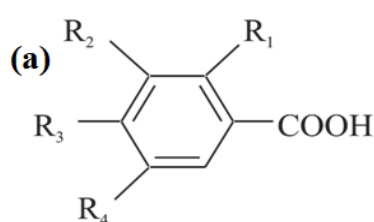
Os tecidos vegetais dos alimentos encontram-se sob constante estresse oxidativo devido aos radicais livres, às espécies reativas de oxigênio e a pró-oxidantes gerados tanto exógena (calor e luz) ou endogenamente (H_2O_2 e metais). Buscando controlar os radicais livres naturalmente gerados, muitos destes tecidos desenvolvem efetivos sistemas antioxidantes, que incluem substâncias como flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides e tocoferóis, dentre outros (OZSOY; CANDOKEN; AKEV, 2009).

Os principais antioxidantes fenólicos contidos em espécies vegetais podem ser divididos em quatro grupos principais: ácidos fenólicos (ácidos gálico, cafeico, rosmarínico), diterpenos fenólicos (carnosol e de ácido carnósico), flavonoides (quercetina, catequina) e óleos voláteis (eugenol, carvacrol, timol, mentol) (BREWER, 2011). Estes compostos fenólicos podem agir como sequestradores de radicais livres, quelantes de metais ou podem ter papel multifuncional.

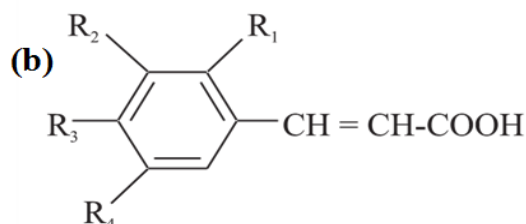
Os ácidos fenólicos têm como característica a presença de um anel benzênico, um grupamento carboxílico e os principais responsáveis pelas propriedades antioxidantes, que são um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula (Figura 8). Os antioxidantes fenólicos atuam sequestrando radicais livres e, algumas vezes, quelando metais, tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (RAMALHO; JORGE, 2006). A presença de um anel fenólico, com ligações $C=C$, e de cadeias laterais na estrutura molecular de ácidos fenólicos facilita a capacidade de captação de radicais livres, possibilitando a estabilização do antioxidante radical por ressonância. Devido à presença de mais grupos hidroxila em sua molécula, ácidos polihidroxi fenólicos apresentam maior capacidade

antioxidante que os ácidos monohidroxi fenólicos, apresentando maior poder de doação de hidrogênios para os radicais livres. Além disso, a presença do grupo $C=CH-COOH$ assegura aos ácidos cinâmicos (Figura 8b) uma maior atividade antioxidante em relação ao grupo $COOH$ para os ácidos benzoicos (Figura 8a) (CONTRERAS-CALDERÓN et al., 2011; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

Figura 8 - Estrutura química de alguns compostos fenólicos.



Ácido salicílico: $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = R_4 = H$
 Ácido gentísico: $R_1 = R_4 = OH$; $R_2 = R_3 = H$
 Ácido p-hidroxibenzoico: $R_1 = R_2 = R_4 = H$; $R_3 = OH$
 Ácido protocatequínico: $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = R_3 = OH$
 Ácido vanílico: $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OH$
 Ácido gálico: $R_1 = H$; $R_2 = R_3 = R_4 = OH$
 Ácido siríngico: $R_1 = H$; $R_2 = R_4 = OCH_3$; $R_3 = OH$



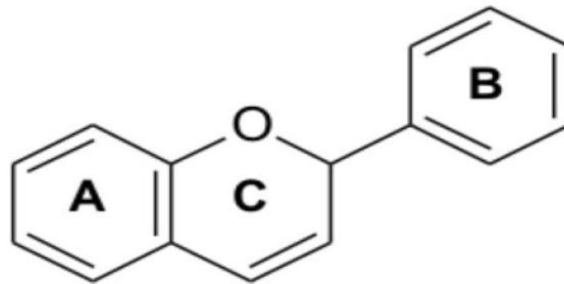
Ácido cinâmico: $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = H$
 Ácido o-cumárico: $R_1 = OH$; $R_2 = R_3 = R_4 = H$
 Ácido m-cumárico: $R_1 = R_3 = R_4 = H$; $R_2 = OH$
 Ácido p-cumárico: $R_1 = R_2 = R_4 = H$; $R_3 = OH$
 Ácido cafeico: $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = R_3 = OH$
 Ácido ferúlico: $R_1 = R_4 = H$; $R_2 = OCH_3$; $R_3 = OH$
 Ácido sinápico: $R_1 = H = R_2 = R_4 = OCH_3$; $R_3 = OH$

Fonte: RAMALHO; JORGE, 2006, p. 758 (adaptado).

(a) Ácidos benzoicos, (b) ácidos cinâmicos.

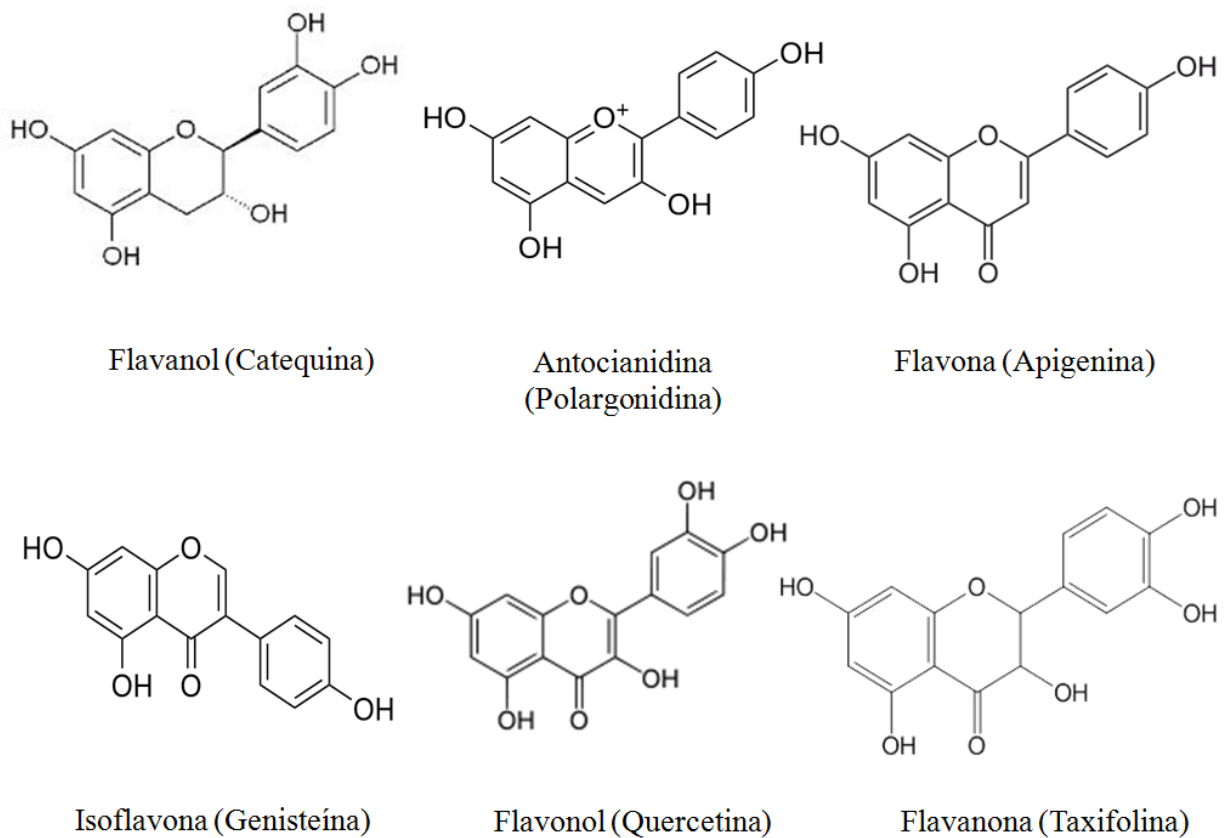
Os flavonoides são compostos amplamente distribuídos no reino vegetal, estando presentes em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glicosídeos ou agliconas. Apresentam baixo peso molecular, com 15 átomos de carbono, organizados na configuração $C_6-C_3-C_6$. Quimicamente, os flavonoides apresentam uma estrutura básica, formada por dois anéis aromáticos, denominados anéis A e B, derivados do ciclo acetato/malonato e da fenilalanina, respectivamente, sendo ligados por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (Figura 9). Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas (Figura 10). Substituições dos anéis A e B por oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfação originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides. Assim como os ácidos fenólicos, eles funcionam como sequestradores de radicais, e às vezes, como quelantes de metais, atuando nas etapas de iniciação e propagação do processo oxidativo (ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 9 - Estrutura química geral para os flavonoides.



Fonte: ANGELO; JORGE, 2007, p.3.

Figura 10 - Classes de flavonoides presentes nos vegetais.



Fonte: Própria (2013).

3.5 ALIMENTOS FUNCIONAIS COMO FONTES DE BIOATIVOS ANTIOXIDANTES

De modo geral, o mecanismo de ação de compostos antioxidante de origem natural apresenta um papel preponderante na redução da oxidação lipídica em tecidos vegetais e animais. Assim, quando incorporados na alimentação humana a partir de frutas, hortaliças, ervas e outros alimentos funcionais, de forma direta ou sob forma de aditivos naturais, os compostos bioativos antioxidantes atuam não apenas na preservação da qualidade do alimento, mas também na redução do risco de desenvolvimento de patologias relacionadas ao estresse oxidativo, como doenças cardiovasculares, cânceres, doenças articulares, auto-imunes e outras (ANGELO e JORGE, 2007).

Em sistemas biológicos, espécies reativas de oxigênio (ROS) são continuamente formadas durante os processos metabólicos, normais ou patogênicos, podendo ser provenientes ainda de fontes exógenas físicas e químicas. ROS (H_2O_2 , ClO^- e $^1\text{O}_2^*$) atuam como mediadores da transferência de elétrons em processos bioquímicos como a fagocitose, sendo produzidos para eliminar o agente agressor por oxidação. Entretanto, quando produzidos em excesso, essas espécies podem causar danos celulares, com ataque a membranas e moléculas (proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos), levando a alterações funcionais de diversos tecidos (adiposo, vascular, cerebral, muscular) e ao aparecimento de algumas doenças (OLIVEIRA et al., 2009). Neste contexto, os antioxidantes advindos de alimentos funcionais surgem não apenas como potencial para uso na indústria de alimentos, sendo uma alternativa para redução dos antioxidantes sintéticos, mas também exercerem papel importante na saúde humana.

A substituição de antioxidantes sintéticos por naturais pode apresentar vantagens quanto à saúde e à funcionalidade. Os antioxidantes naturais são mais solúveis em água e em óleo, sendo úteis na preparação de emulsões e outras formulações, como hidrogéis. Além disso, o uso de antioxidantes naturais traz vantagens preservacionistas, no que se diz respeito ao aproveitamento de co-produtos das indústrias alimentícias, que podem ser utilizados de forma benéfica, favorecendo o homem e o meio ambiente. Cascas, folhas e sementes de alimentos, muitas vezes descartadas pela indústria durante a fabricação de sucos naturais, polpas, doces, dentre outros, são fontes naturais de antioxidantes, podendo ser beneficiados, evitando o desperdício de alimentos (OLIVEIRA et al., 2009).

3.5.1 Alho como fonte natural antioxidante

O alho (*Allium sativum* L.), da família Liliaceae, é originado a partir de uma planta herbácea, que pode atingir até 60 cm de altura. Apresenta folhas pontiagudas, longas e achatadas e bulbo dividido em cerca de 15 bulbilhos (dentes) compridos e reunidos em um involúcro comum de várias túnicas esbranquiçadas, facilmente destacáveis. Cada bulbilho, com coloração variando de branco a violeta, é envolvido por uma túnica própria (Figura 11) (EMBRAPA, 2006).

Figura 11 - Descrição botânica do alho.



Fonte: TEMPERANTE (2013).

A aliina (γ -glutamilcisteína) e outros compostos organossulfurados derivados, responsáveis pelo *flavor* característico do alho, além dos compostos fenólicos (quercetina, miricetina, apigenina), estão entre os principais compostos antioxidantes encontrados no alho e atuam sequestrando radicais livres e modulando enzimas metabólicas (BOZIN et al., 2008; OMAR; AL-WABEL, 2010).

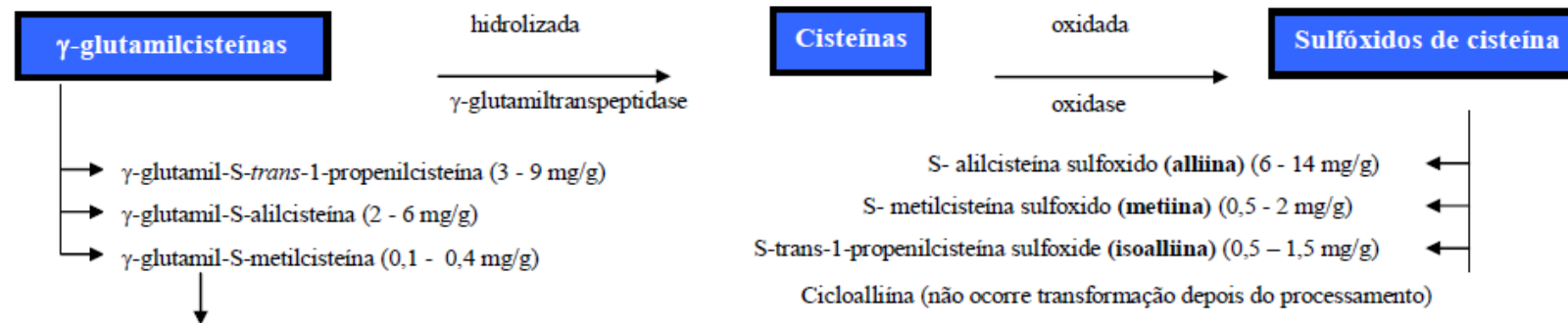
3.5.1.1 Compostos organossulfurados (COS)

O alho contém 33 COS, sendo encontrados de 11 a 35 mg desses compostos para cada grama de alho fresco (OMAR; AL-WABEL, 2010). Nos bulbilhos de alho fresco intacto, COS estão reservados sob forma de γ -glutamilcisteínas (γ -glutamil-S-*trans*-1-propenilcisteína), sendo parte destes convertidos a sulfóxidos de cisteína, principalmente aliina, durante a brotação e germinação, sendo naturalmente acumulados nos bulbos de alho durante o armazenamento a baixas temperaturas (Figura 12) (HOLUB et al., 2002). Bozin et al. (2008), analisando extratos metanólicos de alho fresco imaturo e maduro, atribuíram a redução de teor de fenólicos totais ao provável aumento de compostos organossulfurados e terpenoides, diante do amadurecimento do alho.

As modificações de γ -glutamilcisteínas e sulfóxidos de cisteína em seus derivados são bastante complexas. Acredita-se que tais modificações sejam desenvolvidas pelo alho como um provável mecanismo de defesa contra o ataque de microrganismos e outras injúrias. Quando os bulbos de alho são cortados ou esmagados mecanicamente e, portanto, submetidos ao ataque de agentes agressores, como microrganismos, ar, água ou altas temperaturas, a aliinase exposta cliva instantaneamente a aliina (S-allil-L-sulfóxido cisteína) em alicina (dialil tiossulfonato). A alicina e outros tiossulfonatos se decompõem rapidamente em outros COS, como dialil sulfeto (DAS), dissulfeto de dialila (DADS), dialil trissulfeto (DAT), ditiinas e ajoeno. Simultaneamente, γ -glutamilcisteínas são convertidas para S-alilcisteína (SAC), por outra via (Figura 13). A alicina é uma molécula instável e altamente reativa, que se apresenta sob forma de um líquido volátil, responsável pelo odor pungente característico do alho. Trata-se do composto bioativo mais comum presente no alho, representando cerca de 70% dos compostos sulfurados constituintes dessa hortaliça (AMAGASE et al., 2001; OMAR; AL-WABEL, 2010; SILVA; MORETTI; MATTOS, 2010).

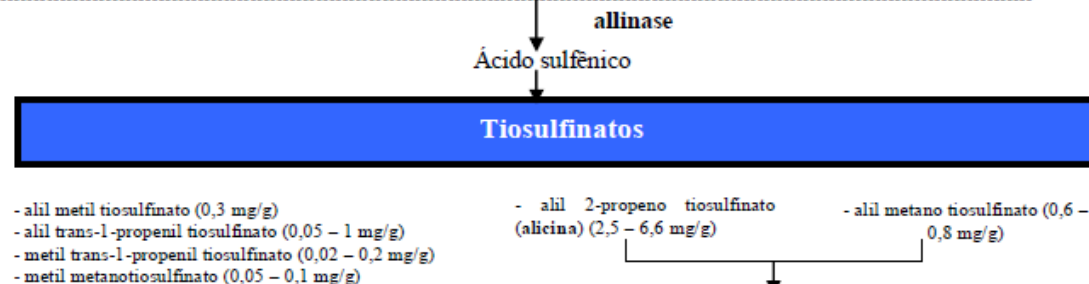
Figura 12 - Principais COS presentes no alho, durante a produção, processamento e extração.

a) Durante o plantio, a germinação e armazenamento dos bulbos intactos



b) Picado ou macerado

Não ocorre reação durante o processamento (picar e macerar)

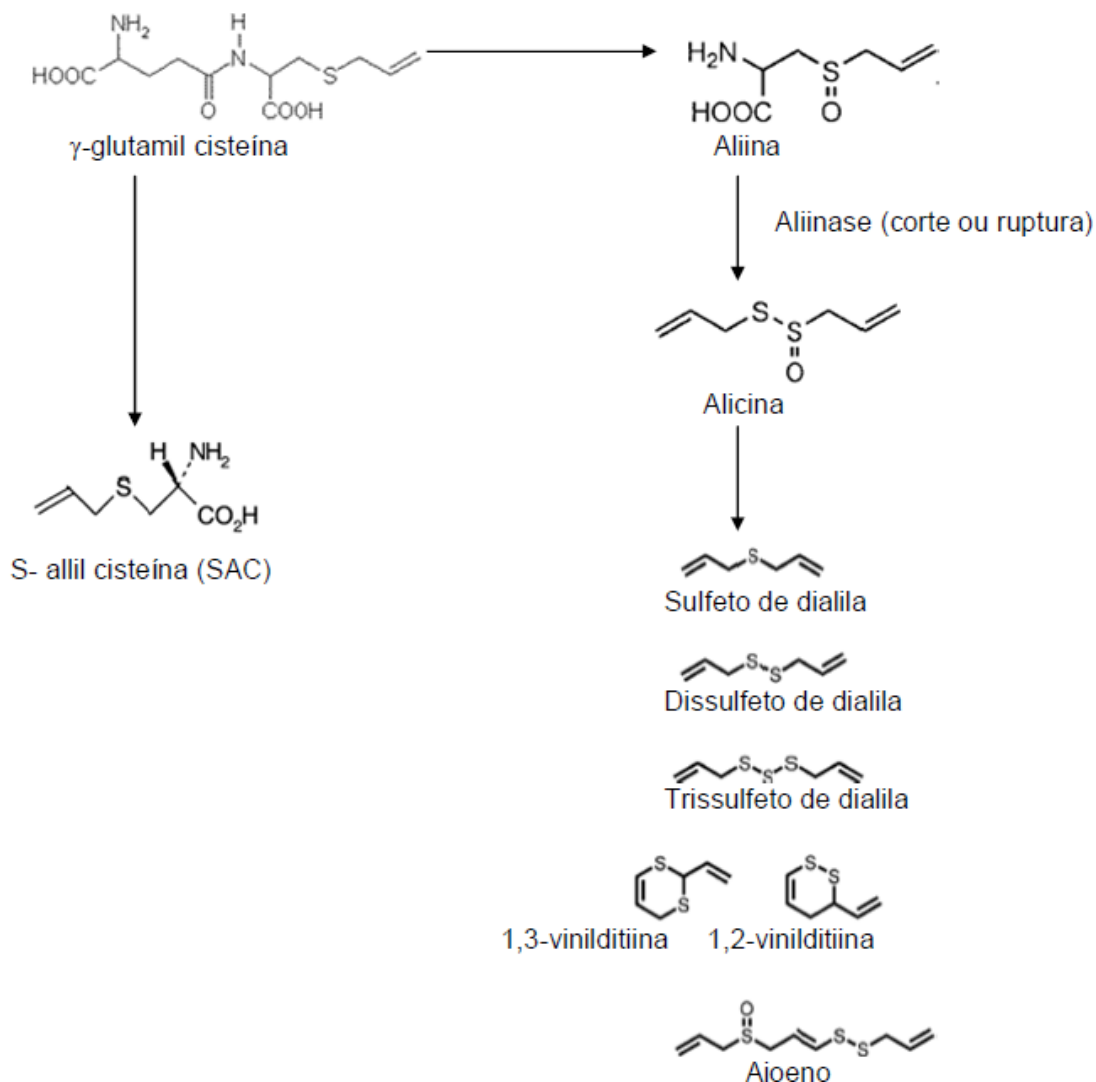


c) Longo tempo de extração em água



(a) bulbos intactos, (b) depois de picado ou macerado e (c) após processamento

Figura 13 – Compostos organossulfurados do alho e seus derivados.



Fonte: SILVA, 2009, p. 36.

Vários estudos têm destacado a propriedade antioxidante do alho na preservação de alimentos e na manutenção da saúde, além das propriedades antifúngica, antibacteriana, antivirótica, imunoestimulante, antiagregatória e hipotensiva já conhecidas historicamente, atribuindo-as aos compostos organossulfurados (BOZIN et al., 2008; CERVANTES et al., 2013; CORZO-MARTÍNEZ; CORZO; VILLAMIEL, 2007; ICIEK; KWIECIEN; WLODEK, 2009; QUEIROZ et al., 2009).

Queiroz et al. (2009) verificaram que a capacidade de inibição da peroxidação do ácido linoleico aumentou com o tempo de estocagem de extratos metanólicos de alho e derivados, provavelmente devido à ativação de compostos organossulfurados e formação de

melanoidinas. Os compostos organossulfurados dissulfeto de alil, alliina, allicina, and alil cisteína, estudados por Chung (2006), mostraram diferentes padrões de capacidade de eliminação de radicais e poder de inibição da peroxidação, sendo todos eficientes contra radicais livres.

Shahid e Bhanger (2007) verificaram que o extrato metanólico de alho é um potente antioxidante para a estabilização de óleo de girassol. Coimbra, Del Ré e Jorge (2009) revelaram que o extrato metanólico de alho aumentou a estabilidade oxidativa do óleo de soja submetido a teste de estufa a 65 °C por 12 dias, atuando mais efetivamente que o BHT, sendo o efeito protetor dose-dependente. Processamentos envolvendo aquecimento e envelhecimento podem aumentar a atividade antioxidante de derivados do alho, por aumentar formas livres de compostos fenólicos e pela formação de novos compostos organossulfurados, como S-alil cisteína e S-alil mercaptocisteína, além de produtos antioxidantes resultantes da reação de Maillard (BOZIN et al., 2008; IDE et al., 1999; KIM; KANG; GWEON, 2013; XU et al., 2007).

3.5.2 Potencial antioxidante do chá verde

O chá verde é um dos produtos resultantes do preparo diferencial da planta *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, que é uma planta perene do tipo arbustiva, pertencente à família *Theaceae*, sendo originária da China e difundida para Índia e Japão, podendo chegar até 3-4 m de altura (Figura 14) (CAMARGO, 2011).

Figura 14 – Folhas frescas de *C. sinensis* L. Kuntze.

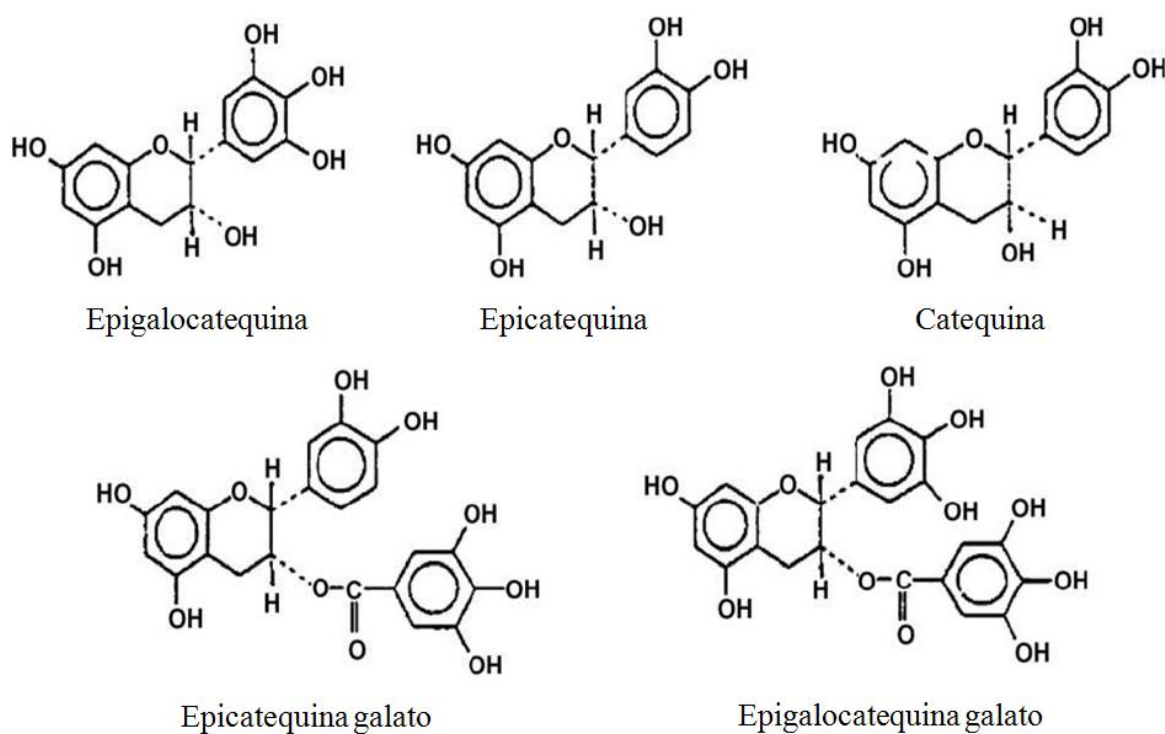


Fonte: CAMARGO, 2011, p. 19.

As folhas da *C. sinensis* apresentam uma grande variedade de compostos bioativos, como polifenóis (catequinas e flavonoides), alcaloides (cafeína, teofilina e teobromina), óleos voláteis, polissacarídeos, aminoácidos, lipídios, vitaminas (vitamina C), elementos inorgânicos (flúor e manganês), sendo os compostos fenólicos os principais responsáveis por muitos dos efeitos benéficos dos chás advindos dessas folhas (PEREIRA et al., 2009). As catequinas compreendem 30% do peso seco das folhas jovens (CHAN; LIM; CHEW, 2007), estando sob forma de catequinas primárias, monoméricas, do tipo galato de epigalocatequina (EGCG), epigalocatequina (EGC), galato de epicatequina (ECG), epicatequina (EC) e catequina (C), por ordem de atividade (Figura 15) (CAMARGO; DAGUER; BARBOSA, 2006), sendo responsáveis pelo sabor amargo e adstringente dos chás derivados de *C. sinensis* (ASHIHARA et al., 2010). EGCG é a mais importante e mais estudada catequina, por apresentar-se em concentração superior a 50%, além de ser responsável pela maioria das

propriedades fisiológicas das folhas de *C. sinensis* (PERUMALLA; HETTIARACHCHY, 2011).

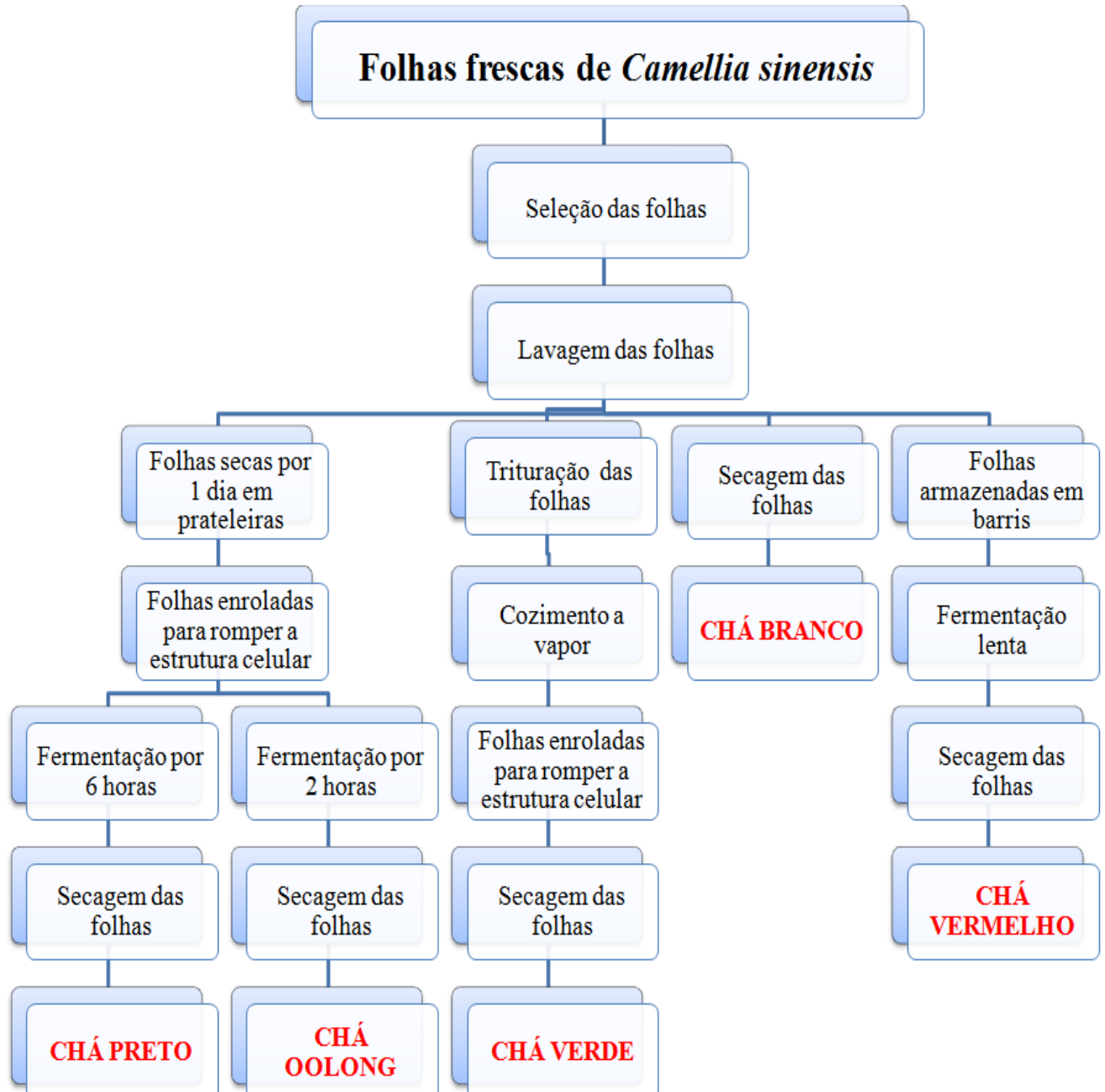
Figura 15 - Estrutura química das catequinas constituintes das folhas de *C. sinensis*.



Fonte: CAMARGO, 2011, p. 19.

A partir das folhas de *C. sinensis*, é possível a obtenção dos chás verde, branco, vermelho e preto, diferindo-se uns dos outros pelas formas de processamento empregadas. Assim, os chás verde e branco são obtidos a partir do processo não fermentativo; o chá vermelho obtém-se pelo método parcialmente fermentativo e o chá preto, pelo processo fermentativo (Figura 16) (BANCIROVA, 2010).

Figura 16 - Etapas de processamento das folhas de *C. sinensis* para obtenção de chás diversos.



Fonte: PAGANINI-COSTA; CARVALHODA-SILVA, 2011, p. 31 (adaptado).

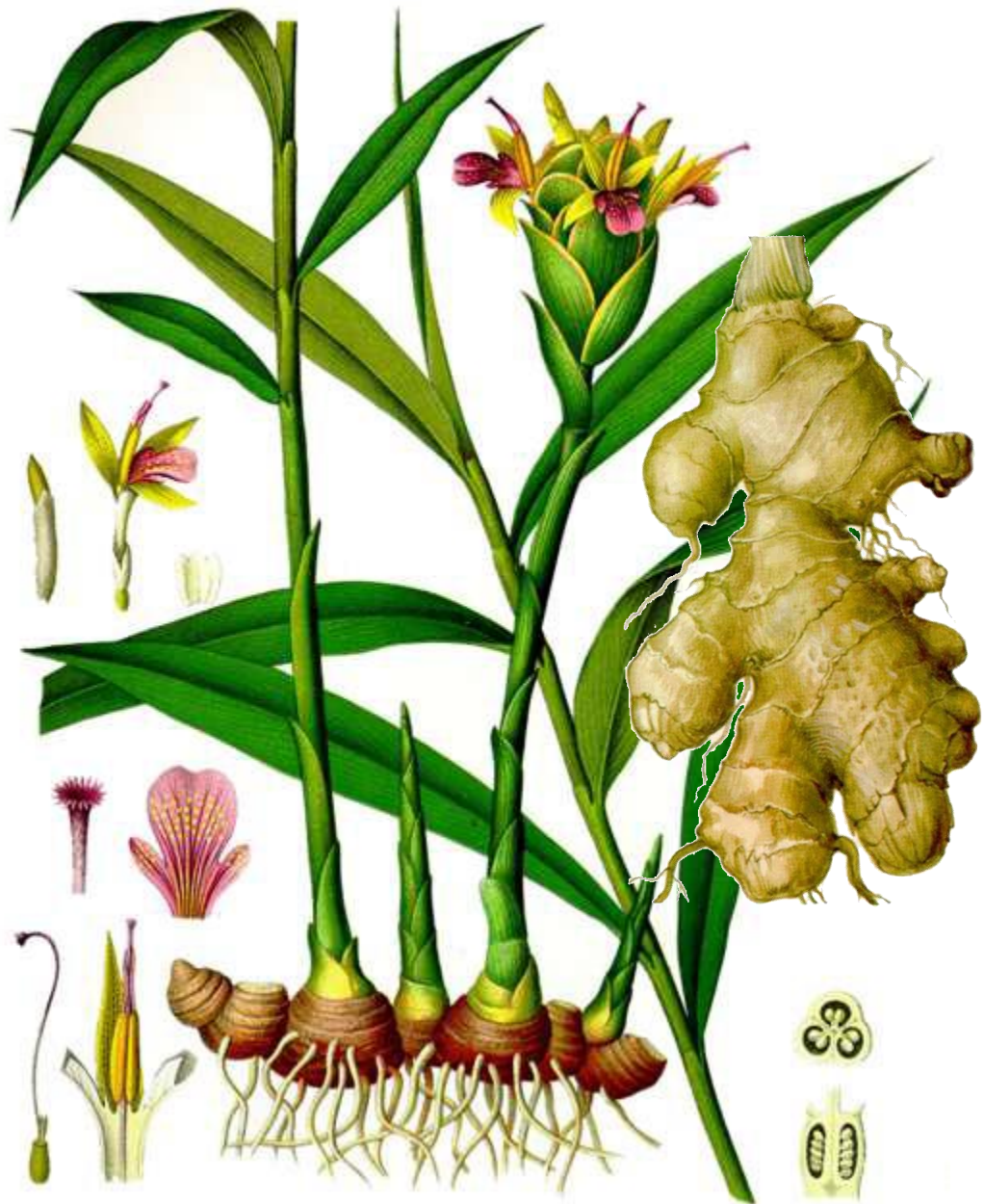
O chá verde é obtido a partir das folhas frescas de *C. sinensis* não fermentadas. O processo não fermentativo inicia-se pela inativação da enzima polifenoloxidase, por meio de secagem e estabilização das folhas. Esse procedimento impede a oxidação das catequinas monoméricas, conservando quase todo o conteúdo original de polifenóis, além de realçar a coloração verde das folhas, torna-as mais flexíveis e maleáveis para serem trabalhadas. As folhas são, então, enroladas e aquecidas, para o rompimento da estrutura celular e obtenção do sabor desejado do chá, com posterior secagem das folhas para retenção de apenas 2% da umidade inicial (BANCIROVA, 2010).

A presença de catequinas e outros polifenóis garante ao chá verde propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticarcinogênica, imunoestimulatória, hipoglicêmica e hipocolesterolêmica. A atividade antioxidante, entretanto, merece destaque, uma vez que a maioria das doenças crônico-degenerativas tem relação com o estresse oxidativo. A atividade antioxidante das catequinas reduz citotoxicidade gerada pelo estresse oxidativo em diferentes tecidos, já que esses polifenóis atuam sequestrando radicais livres ou quelando metais (ferro e cobre), impedindo assim a formação de ROS (SENGER; SCHWANKE; GOTTLIEB, 2010).

3.5.3 Atividade antioxidante do gengibre

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) é uma planta herbácea, perene, pertencente à família Zingiberaceae, que apresenta rizoma articulado e carnoso, de corpo alongado e levemente achatado, com ramos fragmentados irregularmente, medindo de 3 a 16 cm de comprimento e de 3 a 4 cm de largura. Externamente, os rizomas do gengibre apresentam coloração variando do amarelo ouro ao marrom brilhante, com estrias longitudinais, sendo internamente marrom-amarelado, com numerosos feixes fibrosos e células oleaginosas constituídas de oleorresina e óleo essencial (Figura 17). Apresentam, ainda, atributos sensoriais peculiares, como odor agradável, sabor fortemente pungente e cor amarelo-suave a creme, que tornam esta especiaria amplamente difundida nos setores alimentício e industrial. Os rizomas são geralmente consumidos na forma “*in natura*”, podendo ser utilizado sob forma de extratos, chás, óleos essenciais ou oleorresina, como condimento culinário para fabricação de bebidas, produtos de confeitaria (pães, biscoitos e geleias), além de perfumes (BEAL, 2006; ELPO, 2004; ZANCAN et al., 2002).

Figura 17 - Partes da planta originária do gengibre: destaque para flores e rizoma.



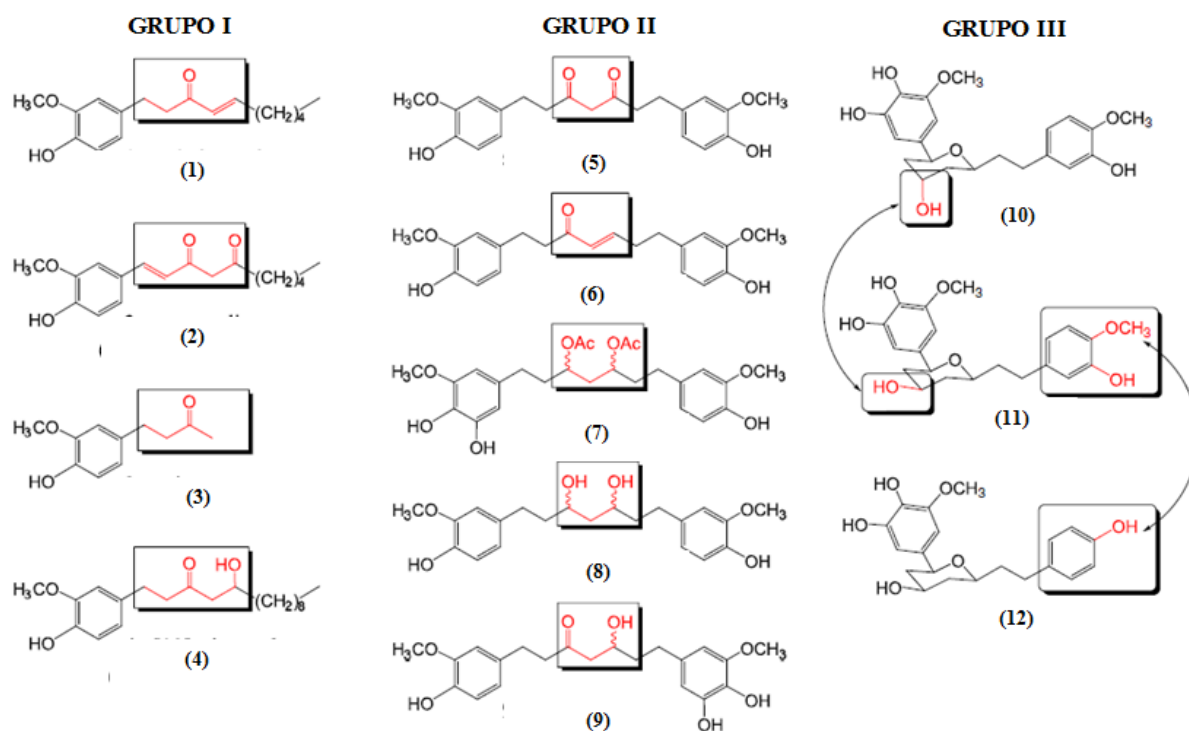
Fonte: BEAL, 2006, p. 34 (adaptado).

As propriedades anti-inflamatória, antiemética, antimutagênica, hipoglicêmica, antibacteriana, dentre outras atribuídas ao gengibre, já foram comprovadas em experimentos científicos diversos. Extratos de gengibre exibiram tanto efeitos neuroprotetores e quimiopreventivos contra o câncer, como efeitos citotóxicos para células cancerígenas, além da capacidade antioxidante contra a peroxidação lipídica em células hepáticas de ratos (PENG et al., 2012; TAO et al., 2008). Kapuppiah e Rajaram (2012) demonstraram o efetivo poder

antimicrobiano do gengibre contra patógenos resistentes a antibióticos, podendo ser usado como agente preventivo de infecções microbianas.

As propriedades atribuídas ao gengibre e derivados devem-se a uma série de compostos bioativos constituintes desses rizomas. Andrade et al. (2012) verificaram a presença de geranial (25,06%), neral (16,47%), 1,8-cineol (10,98%), geraniol (8,51%), acetato de geranila (4,19%) e o canfeno (4,30%) como compostos majoritários presentes no óleo essencial de gengibre. El-Ghorab et al., (2010) descreveram teores relativamente elevados de canfeno, p-cineol, alfa-terpineol, zingibereno e ácido pentadecanoico nos óleos voláteis extraídos de gengibre fresco ou seco. Peng et al. (2012) avaliaram doze compostos fenólicos extraídos do gengibre fresco (Figura 18) e verificaram que vários desses compostos isolados apresentaram alto potencial antioxidante e propriedades citotóxicas a baixas concentrações contra células cancerígenas.

Figura 18 - Compostos fenólicos isolados de *Z. officinale*.



Fonte: PENG et al., 2012, p. 569.

Legenda: (1) 6-shagaol; (2) 1-Dehidrogingerdiona; (3) Zingerona; (4) 10-gingerol; (5) 3,5-dioxi-1,7-bis (3-metoxi-4-hidroxi)- fenil-heptano; (6) Gingerenona; (7) 3,5-diacetoxi-1-(3-metoxi-4,5-dihidroxi-fenil)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil) heptano; (8) 1,7-bis (4-hidroxi-3- metoxifenil) heptano-3,5-diol; (9) 7-(3,4-dihidroxi-5-metoxifenil)-5-hidroxi-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil) heptano-3-ona; (10) 1,5-epoxi-3-hidroxi-1-(3,4-hidroxi-5-metoxifenil)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil) heptano; (11) 1,5-epoxi-3-hidroxi-1-(3,4-hidroxi-5-metoxifenil)-7-(4-hidroxi-3-metoxifenil) heptano; (12) 5-[4-hidroxi-6-(4-hidroxifenetil) tetrahidro-2H-piran-2-il]-3-metoxibenzeno-1,2-diol.

Alguns estudos têm destacado o uso de extratos de gengibre como aditivo natural antioxidante. Rehman; Salariya e Habib (2003) comprovaram a boa estabilidade térmica de extratos diclorometânicos de gengibre, seu efetivo poder de inibição da peroxidação de ácido linoleico (85,2%) durante o armazenamento e forte efeito antioxidante em óleo de girassol, semelhante ao exercido pelos controles BHA e BHT, sendo seu uso recomendando como antioxidante natural em alimentos. Andreo e Jorge (2007) destacaram a capacidade do extrato etanólico de gengibre de prevenir a oxidação lipídica à 60 °C, sugerindo seu uso como antioxidante natural em óleos, gorduras e alimentos gordurosos.

3.6 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE ÓLEOS COMESTÍVEIS

Uma das principais causas de perda de qualidade em alimentos e de redução da vida de prateleira dos mesmos é a oxidação lipídica, representando, portanto um grande desafio a ser contornado pela indústria alimentícia (ARAIN et al., 2009).

A estabilidade oxidativa é a resistência da amostra à oxidação, sendo considerado um parâmetro global para avaliação de qualidade de óleos e gorduras, que reflete não apenas a composição química de matrizes lipídicas, mas também a qualidade da matéria-prima, as condições a que foi submetido o produto durante o processamento e as condições de estocagem. Ela é expressa, de modo geral, pelo período de indução (PI), tempo entre o início da medição e o instante em que ocorre um aumento brusco na formação de produtos da oxidação, ou o tempo necessário para se atingir o ponto crítico de oxidação, caracterizando a duração da fase de iniciação da auto-oxidação (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Com a intensão de determinar a vida útil de óleos e gorduras de forma mais rápida, alguns métodos acelerados de determinação da estabilidade oxidativa foram desenvolvidos, uma vez que acompanhar as alterações naturalmente ocorridas nestes produtos em condições reais de armazenamento, utilizando-se métodos convencionais, seria incompatível com o controle de qualidade a nível industrial, devido à demora e ao consumo excessivo de reagentes. Assim, utilizando-se testes de oxidação acelerada, é possível avaliar a suscetibilidade de óleos e gorduras à oxidação, estimando de forma rápida a estabilidade oxidativa da matéria graxa e a eficácia ‘teórica’ de um antioxidante, isolado ou em associação, sob condições padronizadas de elevação de temperatura, adição de metais,

oxigenação a altas pressões, estocagem sob luz e agitação (ANTONIASSI, 2001; ARAÚJO, 2007).

Dentre os métodos acelerados utilizados industrialmente para prever a estabilidade oxidativa de matérias graxas, merecem destaque o teste de estocagem acelerada em estufa, a Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), a Calorimetria Exploratória Diferencial Pressurizada (P-DSC), o PetroOxy e o Rancimat.

3.6.1 Teste de estocagem acelerado em estufa ou “Schaal Oven Test”

O teste de estocagem acelerada em estufa ou “Schaal oven test” é um método que apresenta boa correlação com o armazenamento em condições ambientes (REGITANO-D'ARCE, 2006). Este método consiste em submeter amostras com ou sem aditivos a temperaturas variadas, geralmente de 60 a 70 °C, sendo a evolução do processo oxidativo monitorada periodicamente, por meio da avaliação dos índices de peróxidos e anisidina, teor de ácidos graxos livres, dienos e trienos conjugados, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), perfil lipídico por cromatografia gasosa, dentre outros (ANTONIASSI, 2001; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Michotte et al. (2011) compararam o efeito protetor de quatro compostos fenólicos naturais puros (miricetina, catequina, genisteína e ácido cafeico), com o ascorbil palmitato (AP), o BHA e da associação AP com os demais antioxidantes, adicionados ao óleo de linhaça refinado, após armazenamento em estufa a 60 °C. Após o monitoramento das amostras (dias 0, 6 e 12), por meio do índice de peróxido, teor de ácido alfa-linolênico por cromatografia gasosa e o teor residual de antioxidantes por cromatografia líquida, os autores concluíram que ácido cafeico, catequina e miricetina foram mais eficiente que BHA na proteção do óleo de linhaça.

3.6.2 DSC e P-DSC

DSC é uma técnica utilizada para medir a diferença de energia fornecida a uma substância e a um material de referência, enquanto ambos são submetidos a uma programação controlada de temperatura. Dessa forma, é possível acompanhar os efeitos do calor, associados às alterações físicas ou químicas da amostra, sendo detectados eventos endotérmicos (absorção de calor), exotérmicos (evolução de calor) ou mudanças na capacidade calorífica, tais como transições de fase (fusão, ebulição, sublimação,

congelamento, inversões de estruturas cristalinas) ou reações de desidratação, dissociação, decomposição, óxido-redução, dentre outros (IONASHIRO, 2005; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2001).

O P-DSC é outra técnica de análise térmica que surgiu como uma evolução do DSC, por acoplamento de uma célula de pressão ao equipamento de análise. É também utilizado para estimar a qualidade de óleos comestíveis por meio de parâmetros cinéticos e do período de indução oxidativa. As altas pressões utilizadas pelo P-DSC inibem a taxa de volatilização da amostra, elevando seu ponto de ebulição e a saturação da fase líquida com o oxigênio, permitindo o aumento da interação do gás oxidante com a amostra e possibilitando o uso de baixas temperaturas de teste ou tempos de testes mais curtos às mesmas temperaturas. Essa técnica tem se mostrado eficaz, tanto na sua modalidade não-isotérmica, em que se determina a temperatura de oxidação (OT) da amostra, quanto no modo isotérmico, quando se determina o tempo de indução oxidativa a altas pressões (HPOIT). Em ambos, mensura-se uma brusca variação de energia em relação à linha base do fluxo de calor (ARAÚJO et al., 2011; ARAÚJO, 2007; EPAMINONDAS, 2009; SANTOS et al., 2009).

Ambas as técnicas têm sido utilizadas para investigar e caracterizar a fase inicial da auto-oxidação de óleos e gorduras com mais precisão e sensibilidade que as convencionais, gerando resultados mais rápidos e requerendo menor quantidade de massa da amostra, sem a necessidade de preparo prévio. Dentre as desvantagens destes métodos estão a destruição da amostra e o alto custo dos equipamentos. (MOTHÉ; AZEVEDO, 2002; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2001).

3.6.3 PetroOxy

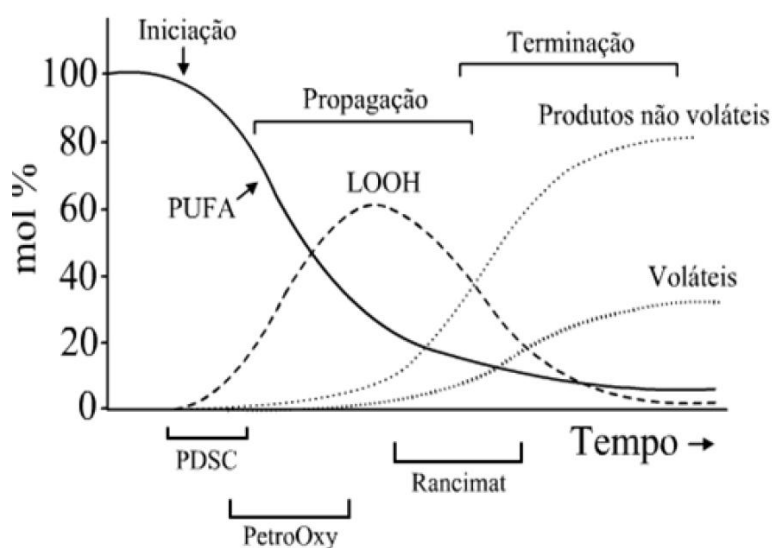
O PetroOxy é um método alternativo de oxidação acelerada, utilizado para avaliar a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras, por meio de variáveis de pressão e temperatura. A análise consiste na injeção de oxigênio, à temperatura ambiente, em uma câmara hermeticamente fechada e pressurizada, contendo a amostra. O alcance da pressão máxima pré-determinada é acompanhado pelo aumento da temperatura. À medida que a amostra vai consumindo o oxigênio, em decorrência do início do processo oxidativo, observa-se um gradativo decaimento da pressão, de modo que a queda de 10 % desta pressão indica o período de indução oxidativa (PI) da amostra (ARAÚJO et al., 2009; CALIXTO, 2011; CARVALHO, 2011).

3.6.4 Rancimat

Rancimat é outro método acelerado bastante utilizado industrialmente para a determinação de parâmetros de qualidade de óleos e gorduras. O avanço do processo oxidativo, ocasionado pelo aquecimento a altas temperaturas sob aeração constante, induz a formação de substâncias voláteis que, à medida que são arrastadas, contribuem para o aumento da condutividade elétrica da água deionizada utilizada na análise. O índice de estabilidade oxidativa (OSI) é determinado no ponto de cruzamento da projeção de retas que passam pela linha de base e pela tangente da curva de condutividade elétrica ($\mu\text{s.cm}^{-1}$) x tempo (min) (CALIXTO, 2011; CARVALHO, 2011; RAMALHO et al., 2011).

P-DSC, PetroOxy e Rancimat, entretanto, detectam o processo oxidativo em estágios diferenciados. P-DSC e PetroOxy evidenciam o mecanismo de propagação, mas não exatamente a mesma região. Enquanto P-DSC detecta a estabilidade da amostra no início do pico exotérmico, característico do início da propagação oxidativa, PetroOxy determina a estabilidade oxidativa quando 10% da pressão do oxigênio já foi consumido pela propagação. Já para o Rancimat, apenas a etapa de terminação é avaliada, quando compostos voláteis característicos da oxidação secundária passam a ser detectados pelo aumento da condutividade elétrica da água (Figura 19) (RAMALHO et al., 2011).

Figura 19 - Comparação entre métodos de avaliação da estabilidade oxidativa.



Fonte: GARDNER, 1987, p.38.

Legenda: PUFA – ácido graxo poli-insaturado; LOOH – hidroperóxidos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As análises experimentais desta pesquisa foram realizadas no Laboratório de Combustíveis e Materiais, situado no Departamento de Química, do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba (LACOM/DQ/CCEN/UFPB).

4.1 MATERIAIS

O óleo de linhaça dourada prensado a frio, sem adição de antioxidantes, produzido por Cisbra Group[®], bem como os bulbos de alho (*A. sativum* L.) (GL) frescos, as folhas de chá verde (*C. sinensis* L.) (GT) selecionadas e desidratadas e os rizomas de gengibre (*Z. officinale* R.) (GG) frescos, foram obtidos no comércio local de João Pessoa/PB, Brasil.

Os reagentes BHT, TBHQ, 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH), tween[®] 40, ácido linoleico, 2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ), p-anisidina, foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Folin-Ciocalteu, ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (ácido gálico), β -caroteno, cloreto férrico hepta-hidratado, sulfato ferroso hepta-hidratado e demais reagentes e solventes foram obtidos na Merck (Dusseldorf, Germany).

4.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Os bulbos de alho foram separados e descascados manualmente, sendo acondicionados à temperatura de 5 °C, até o momento da trituração e elaboração dos extratos. O gengibre seco, obtido a partir de rizomas de gengibre previamente lavados, descascados, fatiados em processador doméstico e submetidos à secagem a 40 °C, por 24 hs, em estufa de ar circulante, assim como as folhas desidratadas de chá verde, foram separadamente triturados em processador doméstico e peneirados em peneiras de 80 *mesh*, obtendo-se um pó, que foi reservado em recipiente de vidro até a elaboração dos extratos.

Extratos etanólicos (EE) e metanol/ acetônicos (MAE) foram elaborados com a finalidade de se caracterizar as matérias primas alimentícias (alho, chá verde e gengibre), quanto ao teor de fenólicos e quanto à atividade antioxidante. Apenas os EE foram utilizados para a aditivação do óleo de linhaça, devido à baixa toxicidade do etanol.

EE de alho (EEGL), de chá verde (EEGT) e de gengibre (EEGG) foram obtidos a partir de 10 g de cada alimento triturado, misturados a 40 mL de etanol e homogeneizados em banho termostatizado a 25 °C, sob agitação por 2 horas. Para a obtenção dos MAE, o mesmo

procedimento foi realizado, utilizando-se, porém, 40 mL de uma solução de metanol e acetona (1:1) (v/v), constituindo os MAE de alho (MAEGL), de chá verde (MAEGT) e de gengibre (MAEGG).

Todos os extratos obtidos foram, posteriormente, submetidos à centrifugação a 5000 rpm por 20 minutos, sendo o sobrenadante filtrado à vácuo e aferido em balão de 100 mL com etanol, sendo acondicionados em frasco âmbar, em atmosfera inerte, sob temperatura de -18 °C, até a utilização. Para determinar o rendimento em matéria seca, 1 mL dos extratos, em triplicata, foi acondicionado em béquer previamente seco e pesado, sendo mantidos em estufa a 105 °C, até peso constante. O resultado do rendimento foi expresso em valor percentual (g de extrato por 100 g da matriz alimentícia).

4.3 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo de fenólicos totais (TPC) dos extratos etanólico e metanol/ acetônico de alho, chá verde e gengibre foi estimado colorimetricamente, utilizando-se o método Folin-Ciocalteu (SLINKARD; SINGLETON, 1977). Alíquotas de 4 mL de EEGL, MAEGL, EEGT, MAEGT, EEGG e MAEGG, em diluições diversas, foram adicionadas de 0,25 mL do reagente Folin-Ciocalteu, seguidos, após 8 minutos de intervalo, da adição de 0,75 mL de carbonato de sódio a 20%. Após agitação, o sistema foi mantido em ambiente escuro por duas horas. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV-vis (model UV-2550, Shimadzu), a 765 nm, utilizando-se água, com os mesmos reagentes supracitados, como controle. A curva de calibração do padrão ácido gálico (50-500 mg.L⁻¹) foi obtida para expressar os resultados em média ± desvio padrão de equivalentes de ácido gálico, sendo os resultados expressos em mg GAE.g⁻¹ de extrato seco e mg GAE.g⁻¹ do alimento (fresco ou seco, para alho e chá verde/ gengibre, respectivamente). TPC foi também estimado para os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS

4.4.1 Atividade sequestrante do radical DPPH

A capacidade sequestrante de radical (RSA) por parte das amostras EEGL, MAEGL, EEGT, MAEGT, EEGG, MAEGG, TBHQ e BHT foi avaliada, utilizando-se o método RSA-DPPH (BLOIS, 1958), com modificações (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Alíquotas de 3,0 mL dos extratos e dos antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT, em diferentes diluições e em triplicata, foram adicionadas de 0,1 mL de solução etanólica de DPPH, à concentração de 0,1 mol.L⁻¹. Para cada diluição, fez-se um controle, utilizando-se 3,0 mL de amostra adicionados de 0,1 mL de etanol. O controle negativo consistiu em 3,0 mL de etanol com 0,1 mL da solução de DPPH. O decréscimo da absorbância à 515 nm foi determinado em espectrofotômetro UV-vis (modelo UV-2550, Shimadzu, Japão), após 120 min em ambiente escuro. RSA-DPPH foi calculado utilizando-se a Equação 1:

$$\text{EQUAÇÃO 1} \quad \text{RSA-DPPH (\%)} = \left[\left(1 - \frac{A_a - A_b}{A_c} \right) \times 100 \right]$$

em que A_a é a absorbância das amostras, A_b é a absorbância do controle das amostras de cada extrato e A_c é a absorbância do controle negativo.

Os resultados obtidos foram correlacionados com as respectivas diluições de extrato/antioxidante sintético (µg.mL⁻¹). O EC₅₀ (concentração da amostra capaz de reduzir 50% do DPPH[•] inicial) foi calculado substituindo o valor de y da equação da reta por 50. A eficiência antirradicalar foi determinada pela relação inversa do EC₅₀, em mg.mL⁻¹ (EC₅₀⁻¹).

4.4.2 Potencial antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

A atividade antioxidante dos extratos e dos compostos sintéticos TBHQ e BHT, quanto ao poder antioxidante de redução do ferro, foi determinada pelo ensaio FRAP (BENZIE; STRAIN, 1996), com modificações (PULIDO; BRAVO; SAURA-CALIXTO, 2000). Alíquotas de 2,7 mL de reagente FRAP, recém-preparado (TPTZ 10 mM, FeCl₃ 20 mM e tampão acetato), foram homogeneizadas com 90 µL de cada extrato estudado e 270 µL de água destilada. Após manter as amostras em banho termostatizado a 37 °C por 30 minutos, as absorbâncias a 595 nm foram estimadas, utilizando o reagente FRAP como controle

negativo para calibração do espectrofotômetro UV-vis (modelo UV-2550, Shimadzu, Japão). Para a determinação da curva padrão, foram utilizadas concentrações de 500-2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de mmol de sulfato ferroso por g de extrato seco.

4.4.3 Auto-oxidação do sistema β -caroteno/ ácido linoleico

A atividade antioxidante das amostras estudadas foi também avaliada pelo sistema β -caroteno/ ácido linoleico (MARCO, 1968), com modificações (MILLER, 1971), baseando-se na oxidação do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico. As soluções foram preparadas misturando-se 5 mL da solução sistema β -caroteno/ácido linoleico (40 μL de ácido linoleico, 530 μL de Tween 40, 50 μL de solução β -caroteno a 20 mg.mL^{-1} , 1 mL clorofórmio) e 0,4 mL de cada extrato/ antioxidante sintético ou solução de trolox (0,2 mg.mL^{-1}). O controle negativo consistiu de 5 mL da solução sistema de β -caroteno/ácido linoleico e 0,4 mL de etanol. A absorbância das amostras a 470 nm (espectrofotômetro UV-vis, model UV-2550, Shimadzu, Japão) foi lida no tempo inicial e a cada 15 minutos de submissão à temperatura de 40 °C em banho termostatzado, até completar 120 minutos de análise. Os resultados foram expressos como percentagens de inibição da peroxidação (PI %), usando a Equação 2:

$$\text{EQUAÇÃO 2} \quad (\text{PI \%}) = \left[\left(1 - \frac{A_i - A_f}{C_i - C_f} \right) \times 100 \right]$$

em que A_i é o absorbância inicial da amostra, A_f é absorbância final da amostra, C_i é a absorbância inicial do controle e C_f é a absorbância final do controle negativo.

4.5 AVALIAÇÃO TÉRMICA DOS EXTRATOS

As curvas termogravimétricas (TG) e de Análise Térmica Diferencial (DTA) dos extratos previamente secos (estufa de ar circulante a 40 °C/ 48 h) e do BHT foram obtidas em Analisador Térmico Simultâneo DTA-TG-DTG, modelo H-60, marca Shimadzu. Utilizou-se cerca de 10 mg de cada amostra em cadinho de platina, atmosfera de ar sintético com fluxo de 50 mL.min^{-1} e razão de aquecimento a 10 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ até 700 °C, a partir de análises não-isotérmicas. A temperatura *onset* (T_{onset}) (NASCIMENTO et al., 2013) ou a temperatura inicial (T_0) da primeira ou da segunda etapa de variação de massa foi utilizada como

parâmetro para determinação da estabilidade térmica dos extratos e do BHT. As análises isotérmicas de EEGL foram realizadas a 65 °C.

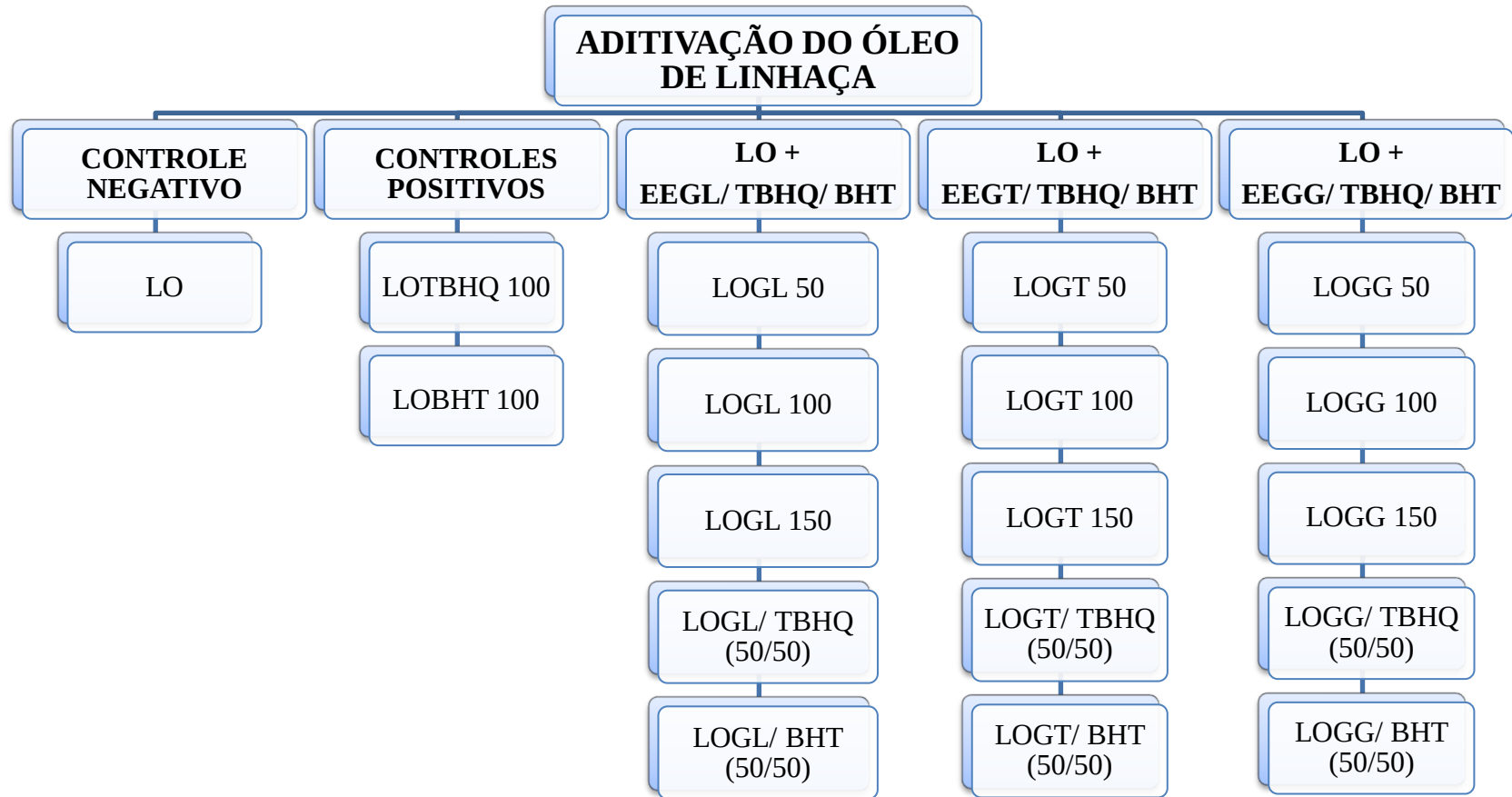
4.6 AVALIAÇÃO TÉRMICA E OXIDATIVA DO ÓLEO DE LINHAÇA

Devido ao maior potencial antioxidante em relação aos extratos metanol/ acetônicos, os extratos etanólicos de alho, chá verde e gengibre, além dos antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT, foram utilizados para a aditivação do óleo de linhaça, com a finalidade de avaliar as estabilidades térmica (Termogravimetria) e oxidativa (teste de estocagem acelerada em estufa, P-DSC, PetroOxy e Rancimat) das amostras.

4.6.1 Preparação das amostras

Os extratos EEGL, EEGT e EEGG, nas concentrações de 50, 100 e 150 mg.kg⁻¹, em relação aos respectivos conteúdos de fenólicos totais (TPC), previamente determinados, foram adicionados separadamente a porções de 20 g de óleo de linhaça dourada, sendo cada mistura (óleo + extrato) homogeneizada em agitador magnético por 30 minutos, constituindo as amostras LOGL 50, LOGL 100, LOGL 150; LOGT 50, LOGT 100, LOGT 150 e LOGG 50, LOGG 100, LOGG 150. Os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT, adicionados ao óleo de linhaça na concentração de 100 mg.kg⁻¹, foram utilizados como controles positivos, constituindo as amostras LOTBHQ 100 e LOBHT 100. O óleo de linhaça sem aditivos (LO) foi utilizado como controle negativo. Para avaliar um possível efeito sinérgico entre extratos e antioxidantes sintéticos, EEGL, EEGT e EEGG, na concentração de 50 mg.kg⁻¹, foram associados aos antioxidantes sintéticos TBHQ ou BHT, também a 50 mg.kg⁻¹, para a mesma massa de óleo de linhaça, constituindo as amostras LOGL/TBHQ (50/50), LOGT/TBHQ (50/50), LOGG/TBHQ (50/50), LOGL/BHT (50/50), LOGT/BHT (50/50) e LOGG/BHT (50/50). As amostras foram acondicionadas em frascos âmbar em atmosfera inerte a -18 °C até o momento das análises. O delineamento de aditivação das amostras de óleo de linhaça encontra-se ilustrado no Esquema 1.

Esquema 1 – Delineamento de aditivização das amostras de óleo de linhaça.



Legenda: LO - óleo de linhaça não aditivado; LOA - óleo de linhaça aditivado; LOTBHQ 100 - LOA com TBHQ (100 mg.kg⁻¹); LOBHT 100 - LOA com BHT (100 mg.kg⁻¹); LOGL 50/100/150 - LOA com extrato etanólico de alho (50/ 100/ 150 mg.kg⁻¹); LOGG 50/100/150 - LOA com extrato etanólico de gengibre (50/ 100/ 150 mg.kg⁻¹); LOGT 50/100/150 - LOA com extrato etanólico de chá verde (50/ 100/ 150 mg.kg⁻¹); LOGL/TBHQ ou BHT - LOA com extrato etanólico de alho e TBHQ ou BHT (50/50 mg.kg⁻¹); LOGG/TBHQ ou BHT - LOA com extrato etanólico de gengibre e TBHQ ou BHT (50/50 mg.kg⁻¹); LOGT/TBHQ ou BHT - LOA com extrato etanólico de chá verde e TBHQ ou BHT (50/50 mg.kg⁻¹).

4.6.2 Avaliação térmica do óleo de linhaça

Curvas termogravimétricas (TG) e de Análise Térmica Diferencial (DTA) das amostras de LO e LOA (Esquema 1) foram obtidas em Analisador Térmico Simultâneo DTA-TG-DTG, modelo H-60, marca Shimadzu, utilizando-se cerca de 10 mg de cada amostra em cadinho de platina, atmosfera de ar sintético com fluxo de 50 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ até 700 °C, a partir de análises não-isotérmicas. A temperatura inicial (T₀) de perda de massa foi utilizada como parâmetro para determinação da estabilidade térmica.

4.6.3 Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo de linhaça

4.6.3.1 Teste de estocagem acelerada em estufa

As amostras aditivadas com os extratos naturais e os antioxidantes sintéticos, isolados ou associados entre si (Esquema 1), foram estocadas em estufa de circulação de ar à temperatura de 60 ± 2 °C, durante 16 dias. A cada quatro dias de estocagem, análises de índices de peróxidos e *p*-anisidina, dienos e trienos conjugados, e ainda espectroscopia de infravermelho, foram realizadas.

4.6.3.1.1 Índice de peróxido

O índice de peróxido (PV) foi determinado segundo o método Cd 8-53 da AOCS (2003). Alíquotas de 2 g das amostras de óleo descritas foram dissolvidas em 30 mL de solução de ácido acético/clorofórmio (3:2 v/v) e adicionadas de 0,5 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Após 1 min em repouso, foram adicionados 30 mL de água e 0,5 mL de solução de amido a 1 %. Titulação com solução de tiossulfato de sódio 0,01 N foi realizada, até o desaparecimento da coloração azulada. Uma prova em branco foi conduzida nas mesmas condições, sem a presença da amostra. Os resultados de PV foram obtidos a partir da Equação 3:

$$\text{EQUAÇÃO 3} \quad \text{Índice de peróxido (meq.kg}^{-1}\text{)} = \frac{N \times (V_A - V_B) \times 1000}{P \text{ da amostra (g)}}$$

onde 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 m é a massa da amostra (g).

4.6.3.1.2 Índice de *p*-anisidina

O Índice de *p*-anisidina (AV) foi determinado seguindo metodologia Cd 18-90 da AOCS (2003). Inicialmente, a absorbância de alíquotas de 0,5 g dos óleos, dissolvidas em 25 mL de isooctano, foi medida a 350 nm (espectrofotômetro UV-vis, model UV-2550, Shimadzu, Japão), utilizando o isooctano como branco. Posteriormente, 5 mL da solução acima descrita foi adicionada de 1 mL de solução de anisidina (*p*-anisidina em ácido acético glacial 0,25 %) e após 10 minutos, procedeu-se nova leitura a 350 nm. AV foi calculado de acordo com a Equação 4:

$$\text{EQUAÇÃO 4} \quad \text{Índice de Anisidina (a. u.)} = \frac{25 (1,2A_s - A_b)}{P}$$

onde A_s é a medida de absorbância da solução gordura-anisidina, A_b é a medida de absorbância da solução de gordura inicial, P é massa da amostra em gramas e a. u. são unidades arbitrárias.

4.6.3.1.3 Determinação do Valor Total da Oxidação (Totox)

O valor Totox, que avalia o efetivo estado de conservação do óleo, foi determinado a partir da correlação entre PV e AV (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999), por meio da Equação 5:

$$\text{EQUAÇÃO 5} \quad \text{Valor Totox} = 2(\text{PV}) + (\text{AV})$$

em que PV equivale ao índice de peróxido, e AV corresponde ao índice de anisidina.

4.6.3.1.4 Determinação do valor de dienos e trienos conjugados

Para a determinação dos valores de dienos conjugados (CD) e de trienos conjugados (CT), utilizou-se o método proposto por Zuta et al. (2007), com modificações. Alíquotas de 0,002 g das amostras de óleo aditivadas foram diluídas para 5 mL com isooctano. A leitura das absorbâncias a 232 nm e a 270 nm, para CD e CT, respectivamente, foi realizada utilizando o isooctano como branco, e os resultados, expressos em percentual de ácido dienoico e trienoico, foram calculados a partir da absorbância e da concentração final da amostra ($\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), segundo a Equação 6:

$$\text{EQUAÇÃO 6} \quad \text{CD/CT (\%)} = \frac{A_{232/270}}{C \times P}$$

onde A é a absorbância da amostra a 232 ou a 270 nm, para CD ou CT, respectivamente; C é a concentração final da diluição da amostra ($\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) e P é o comprimento da célula de medição (cm).

4.6.3.1.5 Caracterização estrutural dos óleos por espectroscopia vibracional na região do infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), modelo IR Prestige-21, Class 1, Laser Product, marca Shimadzu. A análise foi realizada na região de 4.000 a 650 cm^{-1} , utilizando acessório ATR com prisma de ZnSe, na resolução de 4 cm^{-1} .

4.6.3.2 *Calorimetria Exploratória Diferencial Pressurizada (P-DSC)*

As curvas isotérmicas P-DSC do óleo de linhaça, com e sem aditivos, foram obtidas em Calorímetro Exploratório Diferencial Pressurizado, modelo DSC Q20, TA Instruments, a partir de aproximadamente 10 mg de amostra, em cadinho de alumínio e atmosfera de oxigênio com pressão de 700 kPa, a 110 °C. A estabilidade oxidativa (OS), representada pelo tempo de indução oxidativa a altas pressões (HPOIT), foi determinada a partir do tempo de oxidação *onset* (T_{onset}), obtido a partir da extrapolação da tangente à curva P-DSC.

4.6.3.3 Método PetroOxy

A estabilidade oxidativa de LO e LOA foi também determinada por PetroOxy, utilizando 5 mL de amostra, submetida ao aumento de pressão de oxigênio até 700 kPa e posterior aumento gradativo de temperatura até 110 °C, em equipamento Petrotest, modelo 13-3000. A estabilidade oxidativa das amostras foi expressa como período de indução (IP), após queda de 10% da pressão inicial, ocasionada pelo consumo de oxigênio provocado pela oxidação da amostra.

4.6.3.4 Método Rancimat

O método proposto por AOCS CD 12b-92 (AOCS, 2003), em equipamento Rancimat (873 Biodiesel, Metrohm) também foi utilizado, submetendo-se 2 gramas de cada amostra, à temperatura de 110 °C e fluxo de ar constante (10 L.h⁻¹), sendo os resultados expressos como índice de estabilidade oxidativa (OSI).

Os resultados de P-DSC, PetroOxy e Rancimat foram também expressos em percentuais de proteção, relacionando as amostras aditivadas com o óleo puro, conforme a Equação 7:

$$\text{EQUAÇÃO 7} \quad \text{Proteção (\%)} = (\text{OS amostra} - \text{OS controle}) \times 100 / \text{OS controle}$$

em que OS_{amostra} é a estabilidade oxidativa (HPOIT, IP ou OSI) da amostra avaliada e OS_{controle} é a estabilidade oxidativa (HPOIT, IP ou OSI) do óleo de linhaça não aditivado (LO).

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados dos ensaios, realizados em triplicata, foram expressos como média ± desvio-padrão, sendo comparados por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey, com auxílio do programa estatístico SigmaStat 3.5, considerando $P < 0,05$. Os gráficos foram elaborados com auxílio dos programas GraphPad Prism 5.0 e OriginPro 8.0.

REFERÊNCIAS

- ADKINS, Y.; KELLEY, D. S. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 781–792, set. 2010.
- AMAGASE, H.; PETESCH, B. L.; MATSUURA, H.; KASUGA, S.; ITAKURA, Y. Intake of garlic and its bioactive components. **American Society for Nutritional Sciences**, p. 955–962, 2001.
- AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the AOCS: fats, oils and lipid related analytical methods**. 6th ed. ed. [s.l.] AOCS Press, 2009.
- ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. DAS G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399–408, 2012.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim Ceppa**, v. 24, n. 2, p. 319–336, 2006.
- ANDREO, D.; JORGE, N. Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de gengibre (*Zingiber officinale*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 2, p. 152–157, 2007.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim Ceppa**, v. 19, n. 2, p. 353–380, 2001.
- AOCS. **Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society**. Champaign Illinois: AOCS, 2003.
- ARAIN, S.; SHERAZI, S. T. H.; BHANGER, M. I.; TALPUR, F. N.; MAHESAR, S. A. Oxidative stability assessment of *Bauhinia purpurea* seed oil in comparison to two conventional vegetable oils by Differential Scanning Calorimetry and Rancimat methods. **Thermochimica Acta**, v. 484, p. 1–3, fev. 2009.
- ARAÚJO, K. L. G. V. **Avaliação físico-química de óleo de peixe**. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.
- ARAÚJO, K. L. G. V.; EPAMINONDAS, P. S.; SILVA, M. C. D.; LIMA, A. E. A.; ROSENHAIM, R.; MAIA, A. S.; SOLEDADE, L. E. B.; SOUZA, A. L.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G.; QUEIROZ, N. Influence of thermal degradation in the physicochemical

properties of fish oil. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, n. 2, p. 557–561, 27 fev. 2011.

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, out. 2009.

ARUOMA, O. I. Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 12, p. 1617–1625, dez. 1996.

ASHIHARA, H.; DENG, W.-W.; MULLEN, W.; CROZIER, A. Distribution and biosynthesis of flavan-3-ols in *Camellia sinensis* seedlings and expression of genes encoding biosynthetic enzymes. **Phytochemistry**, v. 71, n. 5-6, p. 559–66, abr. 2010.

BALK, E. M.; LICHTENSTEIN, A. H.; CHUNG, M.; KUPELNICK, B.; CHEW, P.; LAU, J. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. **Atherosclerosis**, v. 189, p. 19–30, nov. 2006.

BANCIROVA, M. Comparison of the antioxidant capacity and the antimicrobial activity of black and green tea. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1379–1382, jun. 2010.

BARRIUSO, B.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. **European Food Research and Technology**, v. 236, p. 1–15, 7 nov. 2013.

BATISTA, J. A. N. **Potencial antioxidante dos extratos de *Moringa oleífera* Lamark em sistemas lipídicos de baixa estabilidade oxidativa**. Universidade Federal da Paraíba, 2013.

BEAL, B. H. **Atividade antioxidante e identificação de ácidos fenólicos do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe)**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

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, 15 jul. 1996.

BLOIS, M. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199–1200, 26 abr. 1958.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; GORAN, A.; IGIC, R. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 925–929, 15 dez. 2008.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação

de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. In: **Diário Oficial da União**. Brasília: Diário Oficial da União, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Comissão nacional de normas e padrões para alimentos. Resolução n. 04/88. In: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTAÇÃO (Ed.). São Paulo: ABIA, 2001.

BRAVI, E.; PERRETTI, G.; MARCONI, O.; PATRIZI, E.; FANTOZZI, P. Secoisolariciresinol diglucoside determination in flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) oil and application to a shelf life study. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1553–1558, jun. 2011.

BREWER, M. S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, p. 221–247, 14 jul. 2011.

CALIXTO, C. D. **Óleo de quiabo como fonte alternativa para produção de biodiesel e avaliação de antioxidantes naturais em biodiesel etílico de soja**. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2011.

CAMARGO, A. E. I.; DAGUER, D. A. E.; BARBOSA, D. S. Green tea exerts antioxidant action in vitro and its consumption increases total serum antioxidant potential in normal and dyslipidemic subjects. **Nutrition Research**, v. 26, n. 12, p. 626–631, dez. 2006.

CAMARGO, L. E. A. **Avaliação das atividades antioxidante e antifúngica da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze obtida por diferentes formas de produção**. Universidade Estadual do Centro Oeste, 2011.

CÄMMERER, B.; KROH, L. W. Shelf life of linseeds and peanuts in relation to roasting. **LWT - Food Science and Technology**, v. 42, n. 2, p. 545–549, mar. 2009.

CARVALHO, M. L. B. **Avaliação da estabilidade termo-oxidativa do óleo das sementes de quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench)**. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2011.

CERVANTES, M. I.; BALDERAS, P. M. DE O.; GUTIÉRREZ-BAÑOS, J. DE J.; OROZCO-IBARRA, M.; FERNÁNDEZ-ROJAS, B.; MEDINA-CAMPOS, O. N.; ESPINOZA-ROJO, M.; RUIZ-TACHIQUÍN, M.; ORTIZ-PLATA, A.; SALAZAR, M. I.; RUBIO-OSORNIO, M.; CASTAÑEDA-SAUCEDO, E.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; CALZADA, F.; AGUILERA, P. Comparison of antioxidant activity of hydroethanolic fresh and aged garlic extracts and their effects on cerebral ischemia. **Food Chemistry**, v. 140, p. 343–352, 2013.

CHAN, E. W. C.; LIM, Y. Y.; CHEW, Y. L. Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. **Food Chemistry**, v. 102, n. 4, p. 1214–1222, jan. 2007.

CHUNG, L. Y. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, alliin, and allyl disulfide. **Journal of Medicinal Food**, v. 9, n. 2, p. 205–213, 2006.

CODEX ALIMENTARIUS. Norma del codex para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales. In: **Codex Stan 19-1981**. [s.l: s.n.]. p. 1–5.

COIMBRA, M. C.; DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Influência do extrato de alho na estabilidade oxidativa do óleo de soja refinado. **Revista Ceres**, v. 56, n. 5, p. 547–550, 2009.

CONTRERAS-CALDERÓN, J.; CALDERÓN-JAIME, L.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2047–2053, ago. 2011.

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 effect on vegetable oils. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 113, p. 889–895, 7 nov. 2012.

CORZO-MARTÍNEZ, M.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M. Biological properties of onions and garlic. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 609–625, dez. 2007.

COSGROVE, J. P.; CHURCH, D. F.; PRYOR, W. A. The kinetics of the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. **Lipids**, v. 22, n. 5, p. 299–304, maio 1987.

DEFILIPPIS, A. P.; SPERLING, L. S. Understanding omega-3 's. **American Heart Journal**, v. 151, n. 3, p. 564–570, 2006.

DOBARGANES, M. C.; VELASCO, J. Analysis of lipid hydroperoxides. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, n. 7, p. 420–428, jul. 2002.

DUNN, R. O. Effect of antioxidants on the oxidative stability of methyl soyate (biodiesel). **Fuel Processing Technology**, v. 86, n. 10, p. 1071–1085, jun. 2005.

EL-BATOTY, G. S.; ABD EL-BAKY, H. H.; FARAG, R. S.; SALEH, M. A. Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 4, n. 6, p. 167–174, 2010.

EL-GHORAB, H.; NAUMAN, M.; ANJUM, F. M.; HUSSAIN, S.; NADEEM, M. Comparative study on chemical composition and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) and cumin (*Cuminum cyminum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 14, p. 8231–8237, 2010.

ELPO, E. R. S. **Cadeia produtiva do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) no Estado do Paraná: análise e recomendações para melhoria da qualidade**. Universidade Federal do Paraná, 2004.

EMBRAPA. **Produção, processamento e comercialização de ervas medicinais, condimentares e aromáticas**. Corumbá: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

EPAMINONDAS, P. S. **Caracterização físico-química e termo-oxidativa das sementes de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e de seus óleos**. Universidade Federal da Paraíba, 2009.

EPAMINONDAS, P. S.; ARAÚJO, K. L. G. V.; NASCIMENTO, J. A.; SILVA, M. C. D.; ROSENHAIM, R.; SOLEDADE, L. E. B.; QUEIROZ, N.; SOUZA, A. L.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G. Influence of toasting and the seed variety on the physico-chemical and thermo-oxidative characteristics of the flaxseed oil. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, n. 2, p. 545–550, 29 jun. 2011a.

EPAMINONDAS, P. S.; ARAÚJO, K. L. G. V.; SOUZA, A. L.; SILVA, M. C. D.; QUEIROZ, N.; SOUZA, A. L.; SOLEDADE, L. E. B.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G. Influence of toasting on the nutritious and thermal properties of flaxseed. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, n. 2, p. 551–555, 21 maio 2011b.

EUFIC. **A importância dos ácidos gordos ômega 3 e ômega 6**. Disponível em: <<http://www.eufic.org/article/pt/nutricao/gorduras/artid/importancia-dos-acido-gordos-omega-3-e-omega-6/>>. Acesso em: 5 ago. 2013.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Review: Microencapsulation of food ingredients. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103–112, 2008.

FLAX COUNCIL OF CANADA. Linaza canadiense: un alimento saludable. **Flax Council of Canada**, p. 3–6, 2005.

FONSECA, M. M.; YOSHIDA, M. I. Thermal analysis of raw and aged linseed oil. **Vértices**, v. 11, p. 61–75, 2009.

FORTICARE. **Perfil farmaconutricional do EPA**. Disponível em: <<http://www.forticare.com.br/images/jpgs/figura4.jpg>>. Acesso em: 5 ago. 2013.

GALLARDO, G.; GUIDA, L.; MARTINEZ, V.; LÓPEZ, M. C.; BERNHARDT, D.; BLASCO, R.; PEDROZA-ISLAS, R.; HERMIDA, L. G. Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. **Food Research International**, v. 52, n. 2, p. 473–482, jul. 2013.

GARDNER, H. W. Reactions of Hydroperoxides: products of high molecular weight. In: CHAN, H. W. S. (Ed.). **Autoxidation of Unsaturated Lipids**. [s.l.] Academic Press, 1987.

GHASEMZADEH, A.; JAAFAR, H. Z. E.; RAHMAT, A. Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Molecules**, v. 15, n. 6, p. 4324–4333, jun. 2010.

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

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular research**, v. 47, n. 3, p. 410–8, 18 ago. 2000.

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

HOLUB, B. J.; ARNOTT, K.; DAVIS, P.-J.; NAGPURKAR, A.; PESCHELL, J. Organosulfur compounds from garlic. In: SHI, J.; MAZZA G.; MAGUER, M. L. **Functional Foods**. Washington: CRC, 2002. p. 213–179.

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

HSIEH, C.-C.; LIN, B.-F. Dietary factors regulate cytokines in murine models of systemic lupus erythematosus. **Autoimmunity Reviews**, v. 11, n. 1, p. 22–27, nov. 2011.

ICIEK, M.; KWIECIEN, I.; WLODEK, L. Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 50, p. 247–265, 2009.

IDE, N.; LAU, B. H.; RYU, K.; MATSUURA, H.; ITAKURA, Y. Antioxidant effects of fructosyl arginine, a Maillard reaction product in aged garlic extract. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, n. 6, p. 372–6, jun. 1999.

IONASHIRO, M. G. **Fundamentos da termogravimetria, análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial**. São Paulo: Giz Editora, 2005. p. 80p.

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

JASTRZEBSKI, Z.; LEONTOWICZ, H.; LEONTOWICZ, M.; NAMIESNIK, J.; ZACHWIEJA, Z.; BARTON, H.; PAWELZIK, E.; ARANCIBIA-AVILA, P.; TOLEDO, F.; GORINSTEIN, S. The bioactivity of processed garlic (*Allium sativum* L.) as shown in vitro and in vivo studies on rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1626–1633, set. 2007.

KARUPPIAH, P.; RAJARAM, S. Antibacterial effect of *Allium sativum* cloves and *Zingiber officinale* rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**, v. 2, n. 8, p. 597–601, ago. 2012.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, n. 2, p. 153–161, fev. 2002.

KIM, J.-S.; KANG, O.-J.; GWEON, O.-C. Comparison of phenolic acids and flavonoids in black garlic at different thermal processing steps. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 80–86, jan. 2013.

KNOTHE, G. Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value? **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 9, p. 847–854, set. 2002.

KUCUK, M.; CANER, C. Effect of packaging materials and storage conditions on sunflower oil quality. **Journal of Food Lipids**, v. 12, n. 3, p. 222–231, set. 2005.

- LANFER-MARQUEZ, U. M.; BARROS, R. M. C.; SINNECKER, P. Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. **Food Research International**, v. 38, p. 885–891, out. 2005.
- LEE, J.; GUPTA, S.; HUANG, J.-S.; JAYATHILAKA, L. P.; LEE, B.-S. HPLC-MTT assay: anticancer activity of aqueous garlic extract is from allicin. **Analytical Biochemistry**, v. 436, p. 187–189, 15 maio 2013.
- LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2001.
- MAIZURA, M.; AMINAH, A.; WAN AIDA, W. A. Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract. **International Food Research Journal**, v. 18, p. 529–534, 2011.
- MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, p. 594–598, 1968.
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Review: Natural Antioxidants from the Lamiaceae Family - Application in Food Products. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 10, p. 96–103, 2007.
- MARZA, E.; LESA, G. M. Polyunsaturated fatty acids and neurotransmission in *Caenorhabditis elegans*. **Biochemical Society**, v. 34, p. 77–80, fev. 2006.
- MASON, J. K.; CHEN, J.; THOMPSON, L. U. Flaxseed oil-trastuzumab interaction in breast cancer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8-9, p. 2223–2266, 2010.
- MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 380–385, 2006.
- MICHIELS, J. A.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMES, J. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. **Food Chemistry**, v. 130, p. 986–993, fev. 2012.
- MICHOTTE, D.; ROGEZ, H.; CHIRINOS, R.; MIGNOLET, E.; CAMPOS, D.; LARONDELLE, Y. Linseed oil stabilisation with pure natural phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1228–1231, dez. 2011.
- MICHOTTE, D.; ROGEZ, H.; CHIRINOS, R.; MIGNOLET, E.; CAMPOS, D.; LARONDELLE, Y. Linseed oil stabilisation with pure natural phenolic compounds. **Food Chemistry**, v. 129, n. 3, p. 1228–1231, dez. 2011.
- MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 48, p. 91, 1971.
- MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, 1998. p. 150 p.

MORRIS, D. H. Linaza: una recopilación sobre sus efectos en la salud y nutrición. **Consejo Canadiense de la Linaza**, p. 117 p., 2003.

MORRIS, D. H. Linaza: una elección inteligente. **Flax Council of Canada**, p. 1–3, 2006.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise térmica de materiais**. São Paulo: iEditora, 2002.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJÓ, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145–171, 2001.

NAQSHBANDI, A.; RIZWAN, S.; KHAN, F. Dietary supplementation of flaxseed oil ameliorates the effect of cisplatin on rat kidney. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 316–326, jan. 2013.

NASCIMENTO, J. A.; ARAÚJO, K. L. G. V.; EPAMINONDAS, P. S.; SOUZA, A. S.; MAGNANI, M.; SOUZA, A. L.; SOLEDADE, L. E. B.; QUEIROZ, N.; SOUZA, A. G. Ethanolic extracts of *Moringa oleifera* Lam.: Evaluation of its potential as an antioxidant additive for fish oil. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 112, 13 mar. 2013.

NAZNIN, M. T.; MAEDA, T.; MORITA, N. Antioxidant functions of E- and Z-ajoene derived from japanese garlic. **International Journal of Food Properties**, v. 13, p. 821–829, 30 jun. 2010.

OH, J.; JO, H.; CHO, A. R.; KIM, S.-J.; HAN, J. Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. **Food Control**, v. 31, n. 2, p. 403–409, jun. 2013.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OMAR, S. H.; AL-WABEL, N. A. Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 1, p. 51–58, jan. 2010.

OZSOY, N.; CANDOKEN, E.; AKEV, N. Implications for degenerative disorders: antioxidative activity, total phenols, flavonoids, ascorbic acid, beta-carotene and beta-tocopherol in Aloe vera. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 2, p. 99–106, 2009.

PAGANINI-COSTA, P.; CARVALHODA-SILVA, D. Uma xícara (chá) de Química. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 1, p. 27–36, 2011.

PENG, F.; TAO, Q.; WU, X.; DOU, H.; SPENCER, S.; MANG, C.; XU, L.; SUN, L.; ZHAO, Y.; LI, H.; ZENG, S.; LIU, G.; HAO, X. Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant effects of isolated phenolic compounds from fresh ginger. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 568–585, abr. 2012.

PEREIRA, A. V.; ALMEIDA, T. C.; BELTRAME, F. L.; COSTA, M. E.; GARRIDO, L. H. Determinação de compostos fenólicos em amostras comerciais de chás verde e preto -

Camellia sinensis (L.) Kuntze, Theaceae. **Acta Scientiarum. Health Science**, v. 31, n. 2, p. 119–124, 21 set. 2009.

PERUMALLA, A. V. S.; HETTIARACHCHY, N. S. Green tea and grape seed extracts: potential applications in food safety and quality. **Food Research International**, v. 44, n. 4, p. 827–839, maio 2011.

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

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 4290–4302, 18 maio 2005.

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

QUEIROZ, Y. S.; ISHIMOTO, E. Y.; BASTOS, D. H. M.; SAMPAIO, G. R.; TORRES, E. A. F. S. Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: In vitro antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 115, p. 371–374, jul. 2009.

RAMALHO, E. F. S. M.; ALBUQUERQUE, A. R.; SOUZA, A. L.; BARRO, A. K.; MAIA, A. S.; SANTOS, I. M. G.; SOUZA, A. G. Use of different techniques in the evaluation of the oxidative stability of poultry fat biodiesel. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 787–791, 16 abr. 2011.

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

REHMAN, Z.; SALARIYA, A. M.; HABIB, F. Antioxidant activity of ginger extract in sunflower oil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 7, p. 624–629, 15 maio 2003.

RODRIGUEZ-LEYVA, D.; BASSETT, C. M. C.; MCCULLOUGH, R.; PIERCE, G. N. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. **Canadian Journal of Cardiology**, v. 26, n. 9, p. 489–496, nov. 2010.

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, fev. 2012.

SCHAICH, K. M. Thinking outside the classical chain reaction box of lipid oxidation. **Lipid Technology**, v. 24, n. 3, p. 55–58, 13 mar. 2012.

SENGER, A. E. V.; SCHWANKE, C. H. A.; GOTTLIEB, M. G. V. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. **Scientia Medica**, v. 20, n. 4, p. 292–300, 2010.

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

SILVA, A. C.; JORGE, N. Influence of *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei* extracts on the prevention of oxidation and retention of tocopherols in soybean oil in an accelerated storage test. **Journal of Food Science and Technology**, jan. 2012.

SILVA, E. Y. Y. **Propriedades funcionais “in vitro” e “in vivo” de alhos frescos e processados**. Universidade de Brasília, 2009.

SILVA, E. Y. Y.; MORETTI, C. L.; MATTOS, L. M. Compostos funcionais presentes em bulbilhos de alhos armazenados sob refrigeração, provenientes de cultivos no Brasil e na China. **Ciência Rural**, v. 40, n. 12, p. 2580–2587, 2010.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Methods for the evaluation of the degree of lipid oxidation and the antioxidant activity. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94–103, 1999.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de análise instrumental**. 5. ed. Madrid: MacGraw-Hill, 2001. p. 1028

SLINKARD, K.; SINGLETON, V. L. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 28, p. 49–55, 1977.

SUN-WATERHOUSE, D.; THAKORLAL, J.; ZHOU, J. Effects of added phenolics on the storage stability of avocado and coconut oils. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 8, p. 1575–1585, 18 ago. 2011.

TAO, Q. F.; XU, Y.; LAM, R. Y. Y.; SCHNEIDER, B.; DOU, H.; LEUNG, P. S.; SHI, S. Y.; ZHOU, C. X.; YANG, L. X.; ZHANG, R. P.; XIAO, Y. C.; WU, X.; STÖCKIGT, J.; ZENG, S.; CHENG, C. H. K.; ZHAO, Y. Diarylheptanoids and a monoterpenoid from the rhizomes of *Zingiber officinale*: antioxidant and cytoprotective properties. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 1, p. 12–7, jan. 2008.

TEMPERANTE. **Temperante**. Disponível em: <http://temperante.blogspot.com.br/2011/09/v-behaviorurldefaultvmlo_2612.html>. Acesso em: 27 ago. 2013.

TRUCOM, C. **A importância da linhaça na saúde**. São Paulo: Alaúde Editorial, 2006. p. 151.

UDENIGWE, C. C.; LIN, Y.-S.; HOU, W.-C.; ALUKO, R. E. Kinetics of the inhibition of renin and angiotensin I-converting enzyme by flaxseed protein hydrolysate fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 2, p. 199–207, abr. 2009.

UNTEN, L.; KOKETSU, M.; KIM, M. Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on B-carotene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2009–2012, 1997.

VECCHIO, S.; CAMPANELLA, L.; NUCCILLI, A.; TOMASSETTI, M. Kinetic study of thermal breakdown of triglycerides contained in extra-virgin olive oil. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 91, n. 1, p. 51–56, 2 fev. 2008.

VECCHIO, S.; CERRETANI, L.; BENDINI, A.; CHIAVARO, E. Thermal decomposition study of monovarietal extra virgin olive oil by simultaneous thermogravimetry/differential scanning calorimetry: relation with chemical composition. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4793–800, 10 jun. 2009.

WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; SHAHIDI, F. Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In: SHAHIDI, F. (Ed.). **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. 6. ed. New Jersey: John Wiley, 2005. p. 431–489.

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

WONGSA, P.; CHAIWARIT, J.; ZAMALUDIEN, A. In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against α -amylase and α -glucosidase of culinary herbs in Thailand. **Food Chemistry**, v. 131, p. 964–971, abr. 2012.

XU, G.; YE, X.; CHEN, J.; LIU, D. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 330–5, 24 jan. 2007.

ZANCAN, K. C.; MARQUES, M. O. .; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, n. 1, p. 57–76, set. 2002.

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, fev. 2010.

ZUTA, P. C.; SIMPSON, B. K.; ZHAO, X.; LECLERC, L. The effect of α -tocopherol on the oxidation of mackerel oil. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 800–807, jan. 2007.

5 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo foram descritos sob forma de artigos, os quais serão apresentados a seguir.

ARTIGO	TÍTULO/ REVISTA
ARTIGO 1	Stabilization of linseed oil by ethanolic garlic extract during accelerated storage <i>Submetido ao Periódico “Food Chemistry”</i>
ARTIGO 2	Avaliação do efeito antioxidante do extrato etanólico de <i>Allium sativum</i> L., isolado e/ ou sinergicamente associado a antioxidantes sintéticos, aplicados ao óleo de linhaça <i>Submetido ao Periódico: “Journal of Thermal Analysis and Calorimetry”</i>
ARTIGO 3	Avaliação da atividade antioxidante de extratos de chá verde e gengibre sobre o óleo de linhaça, durante armazenamento em estufa <i>Em processo de submissão ao Periódico: “Food Control”</i>
ARTIGO 4	Avaliação do comportamento de extratos etanólicos de <i>Camellia sinensis</i> L. e <i>Zingiber officinale</i> R. sobre a estabilidade oxidativa de óleo de linhaça, por P-DSC, PetroOxy e Rancimat <i>Em processo de submissão ao periódico “Thermochimica Acta”</i>

Stabilization of linseed oil by ethanolic garlic extract during accelerated storage

Poliana S. Epaminondas^{a,b*}, Kassandra L. G. V. Araújo^a, Jaqueline A. Nascimento^a, Alline L. Souza^{a,d}, Raul Rosenhaim^{c,e}, Antonio G. Souza^c

^a Post-graduate Program in Science and Food Technology, Technology Centre, Federal University of Paraíba (UFPB), 58051-970, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

^b Academic Unity of Food Technology and Agroindustry, Federal Institute of Education, Science and Technology (IFPB), 58800-970, Campus Sousa, Sousa - Paraíba, Brasil.

^c Laboratory of Fuel and Materials (LACOM), Departamento of Chemistry, CCEN, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58059-900, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

^d Laboratory of Chemical Physics, Department of Food Technology, CTDR, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58055-000, Campus V, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

^e Department of Chemical Engineering, CT, Federal University of Paraíba (UFPB), 58051-970, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brazil.

* Corresponding author. Tel/Fax.: + 55 83 3216 7441.

E-mail address: polis.epaminondas@yahoo.com.br (P. S. Epaminondas).

Abstract

The aim of this study was to evaluate the antioxidant power of garlic extract on the stability of linseed oil under accelerated storage. The total phenolic content (Folin-Ciocalteu), the antioxidant activity (Radical scavenging activity DPPH[•], Ferric reducing antioxidant power – FRAP, and β -Carotene bleaching) and the thermal stability (thermogravimetry) of ethanol extracts (EEGL) and methanol-acetic (MAEGL) for *Allium sativum* L. were previously compared. The effect of EEGL, associated or not with tertiary butylhydroquinone (TBHQ) or butylated hydroxytoluene (BHT) on the oxidative stability of linseed oil, was evaluated after storage in an oven at 60 ° C for 16 days. Every four days, the concentration of peroxide, anisidine, Totox, conjugated dienes and trienes were investigated. Changes in levels of polyunsaturated fatty acids (PUFA) *cis* and *trans*, and secondary oxidation compounds, were followed by infrared spectroscopy. The results showed that EEGL was over MAEGL, in

relation to the thermal stability, the total phenolic content and antioxidant activity by DPPH and FRAP. In general, EEGL protected linseed oil from oxidation until the 4th day of storage, when combined with BHT, and until the 8th day, when alone or associated with TBHQ, inhibiting the formation of primary (peroxides, *trans* PUFA) and secondary products (aldehydes, ketones, carboxylic acids) from oxidation. Given the antioxidant effectiveness of the natural extract assessed and the synergistic effect with the synthetic antioxidants, it becomes feasible the use of EEGL by the industry of edible oil, as an alternative to full or partial replacement of synthetic antioxidants.

Keywords: *Allium sativum* L., antioxidants, synergism, oxidative stability, storage in laboratory kiln.

1. Introduction

The numerous benefits of the consumption of essential fatty acid (EFA) omega-3 (n-3) on human health have been extensively reported by literature, especially in relation to the prevention of cardiovascular diseases, cancers, autoimmune and joint diseases, due to its anti-inflammatory action (Rodriguez-Leyva, Bassett, McCullough, & Pierce, 2010). To balance the low intake of n-3 in Western diets, the intake of functional foods and supplements consisting of PUFA, sources of n-3 in particular, has been stimulated. Alpha-linolenic acid (ALA, C18: 3), present in vegetable sources, such as oleaginous plants, eicosapentaenoic acid (EPA, C20: 5) and docosahexaenoic acid (DHA, C22: 6), found in animal sources, mainly in fish oil, are among the most relevant n-3 fatty acids (Gallardo et al., 2013). Metabolically, ALA is converted to DHA and EPA, through bioreactions of elongation and desaturation forming anti-inflammatory mediators that inhibit platelet aggregation, improving circulation and blood pressure, promoting vascular dilation and regulating heart rate and immune responses (Adkins & Kelley 2010).

Linseed oil presents a noble lipid profile, consisting of about 60% of PUFA, with around 43% of ALA and 18% of linoleic acid (LA) (Epaminondas, Araújo, Nascimento, et al., 2011). However, the unsaturation of PUFA present high sensitivity to oxidative processes during the processing and storage (Silva & Jorge, 2012), with changes in color, taste and odor, due to the formation of polymers that compromise the nutritional quality of oil and damage the human health (Zhang et al., 2010).

The food industry has sought some alternatives to minimize the negative effects of oxidation in lipid systems. Microencapsulation enables the increase of shelf life of edible oils and other foods by forming a physical barrier that protects the oil, emulsified with various food ingredients, against atmospheric agents (humidity, light, heat, oxidation) (Gallardo et al., 2013). On the other hand, natural or synthetic antioxidants, when added to food, slow oxidation reactions by removing oxygen from the environment (ascorbic acid), by donating hydrogen atoms to the free radical (butylated hydroxyanisole (BHA), propyl gallate (PG), BHT and TBHQ), by chelating pro-oxidant metals (ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) and citric acid), or in a mixed way, such as chelates/ captors (caffeic, ferulic and gallic acid) (Ramalho & George, 2006; Santos et al., 2012). The use of synthetic antioxidants has been questioned, however, because of possible toxic, allergenic and carcinogenic effects (Sun-Waterhouse, Thakorlal, & Zhou, 2011), by limiting their use. In this context, the search for natural sources of antioxidants that function as an alternative to partial or total replacement of synthetic additives has been encouraged. Natural extracts of various food matrices, consisting of phenolic compounds, ascorbic acid, carotenoids, tocopherols, among others, are genuinely an alternative which is able to fight free radicals and prevent oxidation without causing harm to human health (Michotte et al., 2011; Sun-Waterhouse et al., 2011).

Garlic (*A. sativum* L.), from the Liliaceae family, is a rich source of chemical compounds with antioxidant activity. Alliin, γ -glutamylcysteine and other derived organosulfur compounds, responsible for the characteristic flavor of garlic, as well as phenolic compounds, have free radical-scavenging activity and modulate metabolic enzymes involved in anticarcinogenic mechanisms (Bozin, Mimica-Dukic, Samojlik, Goran, & Igic, 2008; Omar & Al-Wabel, 2010). Processes involving heating and aging can alter the activity of antioxidant derived from garlic, by increasing free forms of phenolic compounds and by the formation of new organosulfur compounds, such as S-allylcysteine and S-allylmercaptocysteine, besides Maillard reaction products (Bozin et al., 2008; Ide, Lau, Ryu, Matsuura, & Itakura, 1999; Kim, Kang, & Gweon, 2013; Xu, Ye, Chen, & Liu, 2007).

Considering garlic as a natural source of antioxidant compounds, the aim of this study was to analyze the phenolic content and the antioxidant activity of garlic extracts by different methods, and to evaluate the feasibility of antioxidant ethanol extract of garlic in linseed oil, as a possible partial or total replacement of synthetic antioxidants.

2. Materials and methods

2.1 Materials

The cold pressed golden linseed oil, without the addition of antioxidants, produced by the Cisbra Group®, was bought in a local shop in the city of João Pessoa, in the northeast of Brazil. The reagents BHT, TBHQ, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchoman-2-carboxylic acid (Trolox), tween® 40, linoleic acid, 2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ), p-anisidine, were purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Folin-Ciocalteu, 3,4,5-trihydroxybenzoic acid (gallic acid), β -carotene, ferric chloride hexahydrate, ferrous sulphate heptahydrate and other reagents and solvents were obtained from Merck (Dusseldorf, Germany).

2.2 Preparation of extracts

Fresh bulbs of garlic (*A. sativum* L.), bought in a local shop in the city of João Pessoa, in the northeast of Brazil, were separated, manually peeled and processed in a domestic food processor. The ethanolic (EEGL) and methanol/ acetone extracts of garlic (MAEGL) were obtained from 10 g of crushed garlic, mixed with 40 mL of ethanol and methanol/ acetone (1:1) (v/v), respectively, and homogenized in a stirring bath thermostat at 25 °C for 2 hours. After centrifugation (5000 rpm/ 20 minutes) and filtration of the supernatant and measurement in a 100 mL flask with ethanol, the extracts obtained were packed in amber vial under an inert atmosphere until use. To determine the yield of dry matter, 1 mL of the extracts, in triplicate, they were placed in previously dried and weighed beakers and kept at 105 °C until constant weight. The result of the yield was expressed as a percentage of extract per 100 g of fresh garlic.

2.3. Determination of total phenolic content (TPC)

TPC was estimated colorimetrically using the Folin-Ciocalteu method (Slinkard & Singleton, 1977). Aliquots of 4 mL of EEGL and MAEGL, diluted in water, were added 0.25 mL of Folin-Ciocalteu reagent followed, after 8 minutes apart, by the addition of 0.75 mL of sodium carbonate at 20%. After stirring, the system was kept in the dark for two hours. The reading of absorbance of the samples was done in UV-vis spectrophotometer (model UV-

2550, Shimadzu), at 765 nm, using water with the same reagents described above, as control. A calibration curve of the gallic acid standard (50-500 mg. L⁻¹) was obtained to express the results with the mean of standard deviation of gallic acid equivalent (mg GAE. g⁻¹ dried extract (D.E.) and mg GAE.g⁻¹ fresh garlic). TPC was also estimated for the synthetic antioxidants BHT and TBHQ.

2.4. Radical-scavenging activity of the 2,2'-diphenyl-β-picrylhydrazyl radical (RSA-DPPH) assay

The antioxidant activity of samples EEGL, MAEGL, BHT and TBHQ, for the radical scavenging activity (RSA) was determined using the RSA- DPPH method (Blois, 1958), with modifications (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). Aliquots of 3.0 mL of EEGL, MAEGL, TBHQ and BHT, in different dilutions and in triplicate, were added of 0.1 mL of ethanolic solution of DPPH at the concentration of 0.1 mol.L⁻¹. A control was made for each dilution using the 3.0 mL sample added of 0.1 mL of ethanol. The negative control consisted of 3.0 mL of ethanol with 0.1 mL of the DPPH solution. The decrease in absorbance at 515 nm was measured in UV-vis spectrophotometer (model UV-2550, Shimadzu) after 120 minutes in the dark. RSA-DPPH was calculated using the equation:

$$\text{RSA - DPPH (\%)} = \left[\left(1 - \frac{A_a - A_b}{A_c} \right) \times 100 \right]$$

where A_a is the absorbance of samples, A_b is the absorbance of control samples of each extract and A_c is the absorbance of the negative control.

The results were correlated with the respective dilutions of the extract/ synthetic antioxidant (μg.mL⁻¹). The EC₅₀ (concentration of sample able to reduce 50% of initial DPPH[•]) was calculated by substituting the value of y of the equation of the straight line by 50. The antiradical efficiency was determined by the inverse relation of the EC₅₀ in mg.mL⁻¹ (EC₅₀⁻¹).

2.5. Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) assay

The antioxidant activity for each sample was determined by FRAP assay (Benzie & Strain, 1996), with modifications (Pulido, Bravo, & Saura-Calixto, 2000). Aliquots of 2.7 mL of FRAP reagent, freshly prepared (TPTZ 10 mM FeCl₃, and 20 mM and acetate buffer) were

homogenized with 90 μL of each extract studied and 270 μL of distilled water. After keeping the samples in a thermostatic bath at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 minutes, the absorbance rates at 595 nm were estimated using the FRAP reagent as negative control for calibration of the UV-vis spectrophotometer (model UV-2550, Shimadzu). For the determination of the standard curve concentrations of 500-2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ of ferrous sulphate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) were used. The results were expressed as the mean of standard deviation of ferrous sulfate mmol per gram of sample.

2.6. β -Carotene bleaching method

The antioxidant activity of the studied samples was also evaluated by β -caroteno/linoleic acid model system (Marco, 1968), with modifications (Miller, 1971). The solutions were prepared by mixing 5 mL of β -caroteno/linoleic acid system (40 μL of linoleic acid, 530 μL Tween 40, 50 μL of β -carotene solution 20 mg.mL^{-1} , 1mL chloroform) and 0.4 mL of each extract/ synthetic antioxidant or Trolox solution (0.2 mg.mL^{-1}). The negative control consisted of 5 mL of β -caroteno/linoleic acid system and 0.4 mL of ethanol. The absorbance of samples at 470 nm (UV-vis spectrophotometer, model UV-2550, Shimadzu) was read at the very beginning and every 15 minutes of subjection to a temperature of 40 $^{\circ}\text{C}$ in a thermostated bath until completing 120 minutes of analysis. Results were expressed as percentages of inhibition of peroxidation (PI %) using the equation:

$$\text{PI \%} = \left[\left(1 - \frac{A_i - A_f}{C_i - C_f} \right) \times 100 \right]$$

where A_i is the initial absorbance of the sample, A_f is the final absorbance of the sample, C_i is the initial absorbance of the control and C_f is the final absorbance of the negative control.

2.7 Thermal evaluation of extracts

Thermogravimetric curves (TG) and Differential Thermal Analysis (DTA) of dehydrated garlic extracts and BHT were obtained in Simultaneous Thermal Analyzer DTA-TG-DTG, model H-60, Shimadzu. Approximately 10 mg of each sample in a platinum crucible, synthetic air atmosphere with a flow of 50 mL.min^{-1} , heated at 10 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ to 700 $^{\circ}\text{C}$ were used, from non-isothermal analysis. The onset temperature (T_{onset}) (Nascimento et al., 2013) and initial (T_0) were used as a parameter for determining the thermal stability of garlic extracts and BHT, respectively.

2.8 Accelerated storage test in laboratory kiln

To conduct the accelerated storage test in laboratory kiln, EEGL was used to add linseed oil due to the highest antioxidant potential compared to MAEGL. EEGL (concentration of 100 mg.kg^{-1} , in relation to its content of TPC) was added at 20g golden linseed oil, the mixture being homogenized in a magnetic stirrer for 30 minutes, forming the sample LOGL 100. The synthetic antioxidants TBHQ and BHT added to linseed oil, at the same concentration of the extract, were used as positive controls (LOTBHQ 100 and LOBHT 100). Linseed oil without additives (LO) was used as negative control. To evaluate a possible synergistic effect, the garlic extract (50 mg.kg^{-1}) was associated with the synthetic antioxidants TBHQ or BHT (50 mg.kg^{-1}), for the same mass of linseed oil, constituting samples LOGL/TBHQ (50/50) and LOGL/BHT (50/50). The samples were stored in air circulation oven at a temperature of $60 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ for 16 days. Every four days of storage, analysis of rates of peroxide and *p*-anisidine, conjugated dienes and trienes and infrared spectroscopy were also carried out.

2.8.1 Peroxide value

The peroxide value (PV) was determined according to the AOCS method Cd 8-53 (2003). Two gram aliquots of oil samples described were dissolved in 30 mL of acetic acid/chloroform (3:2 v/v) and added of 0.5 mL of saturated potassium iodide. After 1 min at rest 30 mL of water and 0.5 mL of starch solution at 1% were added. Titration with 0.01 N sodium thiosulfate solution was performed until the disappearance of the blue color. A blank test was conducted under the same conditions without the presence of the sample. The results of PV were obtained from the following equation:

$$\text{PV (meq.kg}^{-1}\text{)} = \frac{N \times (V_A - V_B) \times 1000}{P \text{ da amostra (g)}}$$

where N is the normality of the $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ solution, V_A is the volume of the solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumed by sample (mL), V_B is the volume of the solution of $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumed by the blank (mL) and m is the mass of the sample (g).

2.8.2 *P-anisidine Value (AV)*

AV was determined according to the AOCS methodology Cd 18-90 (2003). Initially, the absorbance of 0.5 g aliquots of the oils, dissolved in 25 mL isooctane, was measured at 350 nm (UV-vis spectrophotometer, model UV-2550, Shimadzu) using isooctane as a blank. Subsequently, 5 mL of the above solution was added of 1 mL of anisidine (*p*-anisidine in glacial acetic acid 0.25%) and after 10 minutes a new reading at 350 nm was performed. AV was calculated according to the equation:

$$AV \text{ (a. u.)} = \frac{25 (1,2As-Ab)}{P}$$

where As is the measurement of absorbance of the fat-anisidine solution, Ab is the measurement of the absorbance of the solution of initial fat, P is the mass of the sample in grams and a. u. is “arbitrary units”.

2.8.3 *Determination of the Total Oxidation Value (Totox)*

The Totox value which evaluates the actual condition of the oil was determined from the correlation between PV and AV, by the equation:

$$\text{Totox Value (a. u.)} = 2(PV) + (AV)$$

where PV is the peroxide value, AV corresponds to the anisidine value and a. u. is “arbitrary units”.

2.8.4 *Determining the value of conjugated dienes (CD) and conjugated trienes (CT)*

For the determination of the value of CD and CT, we used the method proposed by Zuta et al. (2007) with modifications. Aliquots of 0.002 g of additivated oil samples were diluted to 5 mL with isooctane. The reading of absorbance at 232 nm and 270 nm for CD and CT, respectively, was performed using isooctane as blank, and the results expressed in percentages of dienoic and trienoic acid were calculated from the absorbance and the concentration of the final sample (g.100 mL⁻¹) according to the equation:

$$CD/CT (\%) = \frac{A_{232/270}}{C \times P}$$

where A is the absorbance of the sample at 232 or at 270 nm for CD and CT, respectively; C is the concentration of the final sample dilution ($\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) and P is the length of the measuring cell (cm) .

2.8.5 Structural characterization of oils by vibrational spectroscopy in the infrared region

The absorption spectra in the infrared region were obtained in infrared spectrophotometer with Fourier transform (FTIR), model IR Prestige-21, Class 1, Laser Product, Shimadzu. The analysis was performed in the $4000\text{-}650 \text{ cm}^{-1}$ region, using ATR accessory with ZnSe prism with a 4 cm^{-1} resolution.

2.9 Statistical analyzes

The results of tests, performed in triplicate, were expressed as mean of standard deviation, and compared by analysis of variance (ANOVA) and Tukey test, using the statistical program SigmaStat 3.5, considering $P < 0.05$. The graphs were drawn with the aid of GraphPad Prism 5.0 and OriginPro 8.0.

3. Results and discussion

3.1. Content of TPC

Table 1 shows the TPC, in gallic acid equivalents, of EEGL, MAEGL, BHT and TBHQ. Extracts of garlic had significantly lower content of TPC when compared to pure synthetic antioxidants (TBHQ > BHT > EEGL > MAEGL). It is believed that this difference is attributed to the fact that crude extracts having in their composition a blend of substances extracted from garlic, such as carbohydrates, including fiber, protein and free amino acids, vitamins, minerals, essential oils, and also organosulfur compounds and phenolics (Omar & Al-Wabel, 2010). In this work, the mixture of compounds varied according to the composition of solvents used in the extraction influencing the yield (23.42 ± 0.25 and $6.17 \pm 0.15\%$) and in the phenolic content (10.55 ± 0.76 e $3.01 \pm 0.15 \text{ mg GAE} \cdot \text{g}^{-1}$ of dry extract) for EEGL and MAEGL, respectively (Table 1).

Table 1

Yield, TPC and antioxidant capacity (RSA-DPPH assay and FRAP)^{A,B} of garlic extracts, TBHQ and BHT.

Samples	Yield (%)	TPC (mg GAE.g ⁻¹ D.E.*) ^C	TPC (mg GAE . g ⁻¹ F.G.)	EC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Antiradical efficiency [EC ₅₀ ⁻¹]	FRAP (mmol Fe ²⁺ .g ⁻¹ D.E.*)
EEGL	23.42 ± 0.25 ^a	10.55 ± 0.76 ^c	2.47 ± 0.20 ^a	59.66 ± 1.39 ^c	16.77 ± 0.39 ^b	0.18 ± 0.01 ^c
MAEGL	6.17 ± 0.15 ^b	3.01 ± 0.15 ^d	0.19 ± 0.01 ^b	2222.33 ± 27.04 ^a	0.45 ± 0.01 ^d	0.12 ± 0.01 ^d
TBHQ	-	373.03 ± 14.22 ^{a*}	-	1.27 ± 0.01 ^d	784.57 ± 7.76 ^a	30.29 ± 0.10 ^a
BHT	-	282.08 ± 0.18 ^{b*}	-	67.53 ± 3.20 ^b	14.83 ± 0.70 ^c	0.54 ± 0.05 ^b

^A Values corresponding to the mean of standard deviation (n = 9).

^B Means followed by different lower case letters in the same column differ significantly (p ≤ 0.05), by the Tukey test.

^C Total phenolic content recorded as mg of gallic acid equivalents, contained in 1 gram of TBHQ/BHT.

* D.E. - Dry extract; F G. - Fresh garlic.

Wongsa, Chaiwarit, & Zamaludien (2012) found, for aqueous extract of garlic, a phenolic content equivalent to 3.31 ± 0.09 mg GAE.g⁻¹ of dry extract, below the level found to EEGL and similar to MAEGL. Queiroz et al. (2009) obtained methanol extracts from fresh garlic with phenolic content similar to MAEGL of 6.99 mg GAE.g⁻¹ dry extract. Bozin et al. (2008), analyzing methanol extracts of immature and mature fresh garlic, attributed the reduction in TPC (0.98 ± 0.004 para 0.05 ± 0.005 mg GAE.g⁻¹ dry extract, respectively) to the likely increase of organosulfur compounds and terpenoids due to the ripening of garlic, such levels being below those covered in this study.

The yield, the phenolic composition and the antioxidant and antimicrobial activities of plant extracts are significantly affected by climate, soil, method of drying vegetables, as well as extraction solvent composition, temperature/extraction time, proportion of solvent to solid and variety/maturation state of the plant (Michiels, Kevers, Pincemail, Defraigne, & Dommes, 2012).

3.2 Antioxidant activity

Given this need to understand the behavior of antioxidant compounds against different detection methods, extracts of garlic and pure antioxidants were evaluated as to their free radical scavenging (RSA-DPPH[•]), metal reduction (FRAP) (Table 1) and protection on lipid peroxidation (β-carotene/ linoleic acid) (Figure 1).

3.2.1 Free radical-scavenging activity (RSA - DPPH[•])

The antioxidant activity, assessed by the test RSA - DPPH[•] to garlic extracts and synthetic antioxidants, is presented in Table 1. Comparing the EC₅₀ and antiradical activity (EC₅₀-1), respectively, and among the samples analyzed, EEGL ($59.66 \pm 1.39 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 16.77 ± 0.39) was more efficient against DPPH radical than the reference compound BHT ($67.53 \pm 3.20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 14.83 ± 0.70), while MAEGL ($2222.33 \pm 27.04 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0.45 ± 0.01), exhibited a mild antioxidant activity. Studies on the aqueous extract of garlic, obtained after 2 minutes of grinding, demonstrated significantly higher EC₅₀ ($> 100000 \mu\text{g. mL}^{-1}$) to those described in this work, suggesting a lower antioxidant activity (Noda et al., 2013).

It is noticeable an obvious correlation between the phenolic content and antioxidant activity exhibited by EEGL, MAEGL and TBHQ. It is believed that BHT has shown a high content of equivalents of phenolic antioxidant and a low power due to the presence of only one hydroxyl group (OH) in the molecule. Phenolic compounds and some synthetic substances present, in their chemical constitution, hydroxyl groups linked to aromatic rings capable of donating a hydrogen radical to the free radical, neutralizing it and keeping itself chemically stable by resonance (Contreras-Calderón et al., 2011). Nascimento et al. (2013) found similar results for ethanol extracts of *Moringa oleifera* L., compared to the same synthetic antioxidants, attributing the antioxidant superiority of the TBHQ, compared to extracts of moringa and BHT, to the greater power of donating hydrogen to free radicals due to the presence of two hydroxyl groups in its molecule.

3.2.2 FRAP assay

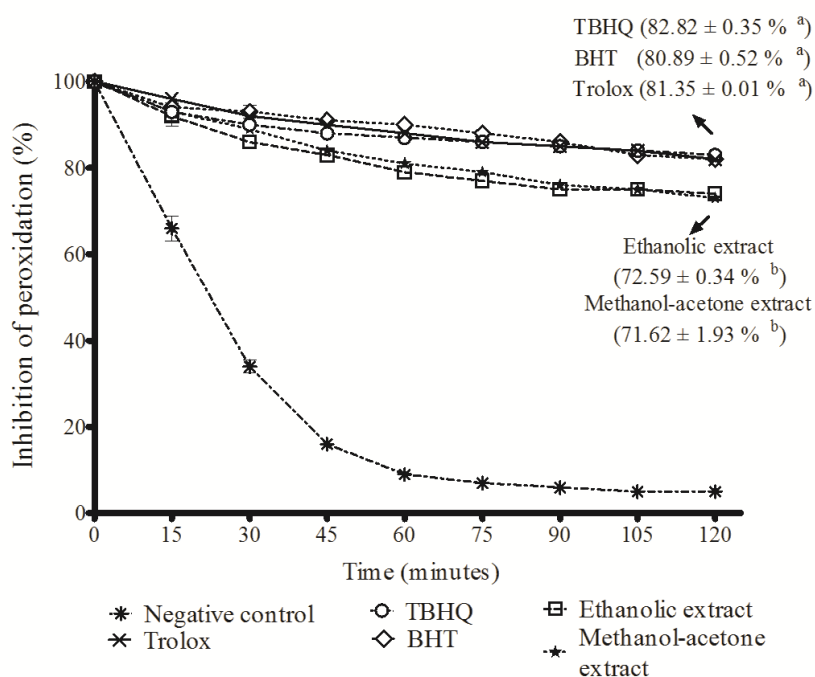
The test results for FRAP assays to EEGL, MAEGL, TBHQ and BHT are summarized in Table 1. From the samples, TBHQ ($30.29 \pm 0.10 \text{ mmol Fe}^{2+}.\text{g}^{-1}$ of dry extract) was the only one which presented considerable power reduction of iron. It is believed that the not very expressive results demonstrated by EEGL and MAEGL (0.18 ± 0.01 e $0.12 \pm 0.01 \text{ mmol.g}^{-1}$ of dry extract, respectively) are assigned to the restricted ability of this method to detect compounds that remove radicals by transferring electrons, such as organosulfur compounds, for example, present in extracts of garlic. The reduction of pH maintains the solubility of iron, however, it reduces the ionization potential that drives the elimination of free radicals by electron transfer, increasing the redox potential and causing changes in the dominant reaction mechanism that cause an underestimation of the results (Prior, Wu & Schaich, 2005).

Nencini et al. (2011), comparing hydroalcoholic extracts of four Italian species of the genus *Allium* by FRAP method, found that extracts from the aged leaves (range from 1.94 ± 0.18 to $7.99 \pm 0.54 \mu\text{mol.g}^{-1}$ of dry extract) showed greater capabilities of iron reduction while the bulbs were less expressive (range from 0.20 ± 0.04 to $0.87 \pm 0.32 \mu\text{mol.g}^{-1}$ of dry matter), the latter being less than the values reported in this work.

3.2.3 Protection against lipid peroxidation

Observing the kinetics of discoloration of β -carotene (Figure 1), it is noticeable that garlic extracts (EEGL and MAEGL) and reference compounds (TBHQ, BHT and Trolox) presented good antioxidant activity, inhibiting the peroxidation of linoleic acid in the entire discoloration curve compared to the negative control (blank).

Fig. 1. Kinetics of bleaching of the β -carotene-linoleic acid system: protection against lipid peroxidation by action of garlic extracts, compared to positive (TBHQ, BHT and Trolox) and negative controls.



* Extracts with concentration of 0.2 mg.mL^{-1} compared to TPC.

Extracts and reference compounds retained the stability of the β -carotene/linoleic acid system during the first 15 minutes of analysis, presenting a slight decrease in the course of

time. The significant difference of the percentage of inhibition was first observed between these two groups after 30 minutes of analysis. The reference compounds (82.82 ± 0.35 , 81.35 ± 0.01 and $80.89 \pm 0.52\%$ for TBHQ, Trolox and BHT, respectively) showed no significant difference between them for inhibitory capacity of lipid peroxidation during the 120 minutes of analysis, and the same behavior was observed for the group of garlic extracts (72.59 ± 0.34 e $71.62 \pm 1.93 \%$, for EEGL and MAEGL, respectively) (Figure 1). Inhibition of lipid peroxidation by EEGL and MAEGL can be attributed to the antioxidant action of organosulfur compounds and phenolic constituents of garlic (Al-Omar & Wabel, 2010). Percentages of inhibition similar to the ones for EEGL and MAEGL have been addressed in the literature for methanol extracts of *Allium atrovioleaceum* (71%) and *Allium dictyoprosum* (72%), incubated for 48 hours at room temperature (Tepe, Sokmen, Akpulat, & Sokmen, 2005). Queiroz et al. (2009) found that the ability of peroxidation inhibition of linoleic acid increased with storage time of methanol extracts of garlic and derivatives, probably due to the activation of organosulfur compounds and formation of melanoidins. The organosulfur compounds allyl disulfide, alliin, allicin, and allyl cysteine, studied by Chung (2006), showed different patterns of radical scavenging capacity and power of peroxidation inhibition, all being effective against free radicals.

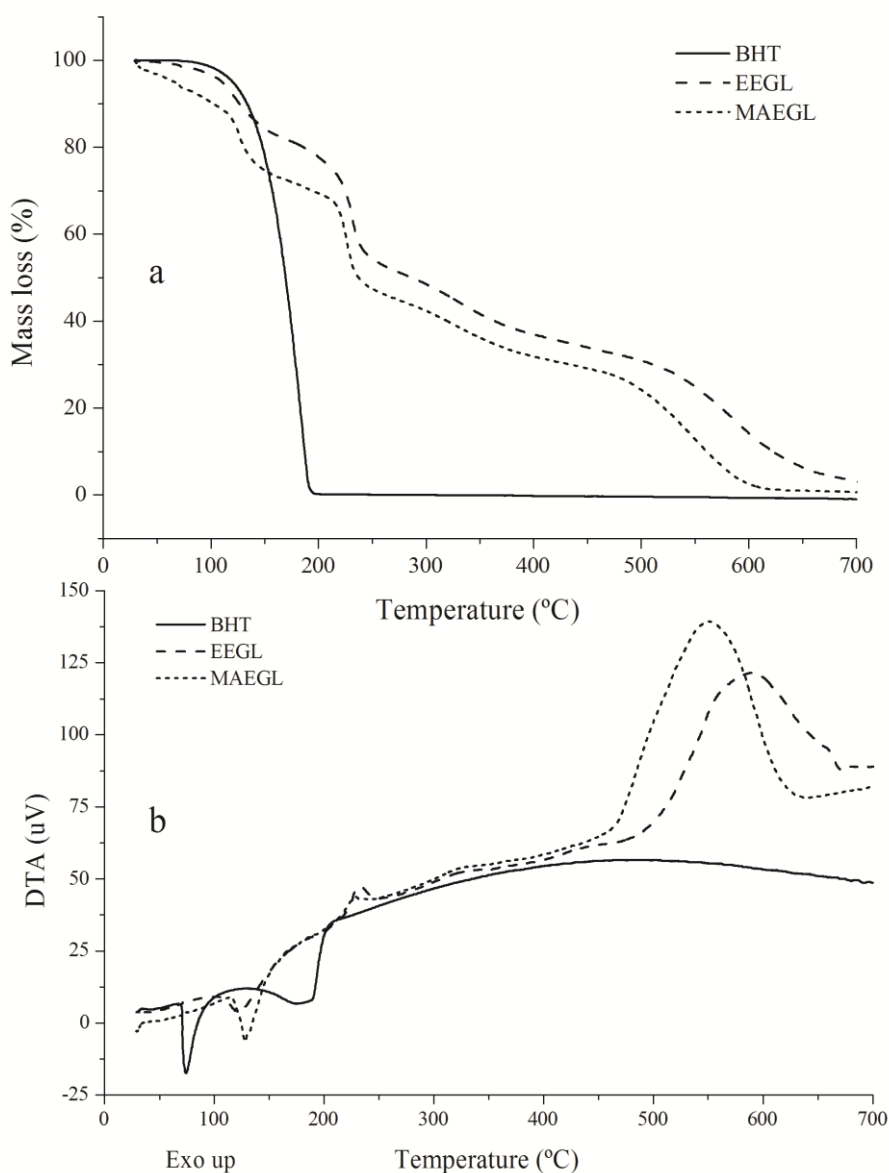
Because these are matrices of complex composition, it is recommended that foods derived from plants have antioxidant capacity assessed by various *in vitro* methods of detection, so that it is possible to obtain relevant data, since antioxidants may respond differently to various sources of radicals or oxidizing agents (Bozin et al., 2008; Prior et al., 2005).

3.3 Thermal evaluation of extracts

The TG and DTA curves of garlic extracts and of BHT are presented in Figure 2 and the data obtained from these curves are summarized in Table 2. EEGL and MAEGL present decomposition profiles characterized by five steps of mass loss, by Thermogravimetry. The DTA curves showed two endothermic transitions and the other ones exothermic. EEGL showed a higher thermal stability (104°C), characterized by the initial temperature (T_i) of the second stage of mass loss, since the first stage (5.5% of mass loss) probably corresponded to the loss of water and solvent waste from the sample. BHT (71°C and 99%) showed a single stage of degradation, by TG technic (Figure 3a), and two endothermic transitions, observed by DTA curve (Figure 3b), being the first related to fusion of antioxidants, without the mass

variation, and the second related to the volatilization/ decomposition thereof, being in agreement with the results observed by Santos et al. (2012). The greater loss of mass in the first step to MAEGL (10.7%) can be attributed to the higher volatilization/decomposition of not very stable antioxidants in the first step. Antioxidant complexes of low stability can be easily degraded, losing the antioxidant power or acting as pro-oxidants.

Fig. 2. TG (a) and DTA (b) curves of garlic extracts and BHT.



Other phenomena, such as more stable antioxidants volatilization, may characterize the first two endothermic events of the evaluated curves. The exothermic events described by

the DTA curve may be related oxidation, decomposition and combustion of the organic matter contained in the extract.

Table 2
Data related to TG and DTA curves of garlic extracts and BHT.

	TG - Non-isothermal				DTA	
	Steps	$T_i^a - T_f^b / ^\circ\text{C}$	$T_{\text{onset}} ^\circ\text{C}$	$\Delta m^c / \%$	Transition	T/ $^\circ\text{C}$
BHT	1 st	71 – 209	166	99	Endo	75
					Endo	175
	Residue	-	-	1.0	-	-
EEGL	1 st	45 – 104	90	5.5	Endo	45
	2 nd	104 – 185	141	15.1	Endo	111
	3 rd	185 – 253	220	26.4	Exo	223
	4 th	253 – 470	317	20.6	Exo	314
	5 th	470 – 701	570	29.7	Exo	577
	Residue	-	-	2.4	-	-
MAEGL	1 st	25 – 103	68	10.7	Endo	68
	2 nd	103 – 199	115	19.8	Endo	118
	3 rd	199 – 234	217	20.0	Exo	219
	4 th	234 – 457	295	20.3	Exo	317
	5 th	457 – 702	538	27.5	Exo	546
	Residue	-	-	1.0	-	-

^aInitial temperature; ^bFinal temperature; ^cMass loss

Nascimento et al. (2013) described a variation of the thermal stability 66 to 83 $^\circ\text{C}$ for ethanolic leaf extracts, flowers and pods of *Moringa oleifera* L., while Santos et al. (2012) reported thermal stabilities of 71 $^\circ\text{C}$, 85 $^\circ\text{C}$, 98 $^\circ\text{C}$ and 184 $^\circ\text{C}$, for pure synthetic antioxidants BHT, BHA, TBHQ and propyl gallate (PG), respectively, and 68 $^\circ\text{C}$, 147 $^\circ\text{C}$, 170 $^\circ\text{C}$ and 199 $^\circ\text{C}$, for gallic acid, ferulic, caffeic and α -tocopherol, respectively, classified as pure natural antioxidants.

3.4 Storage test in oven

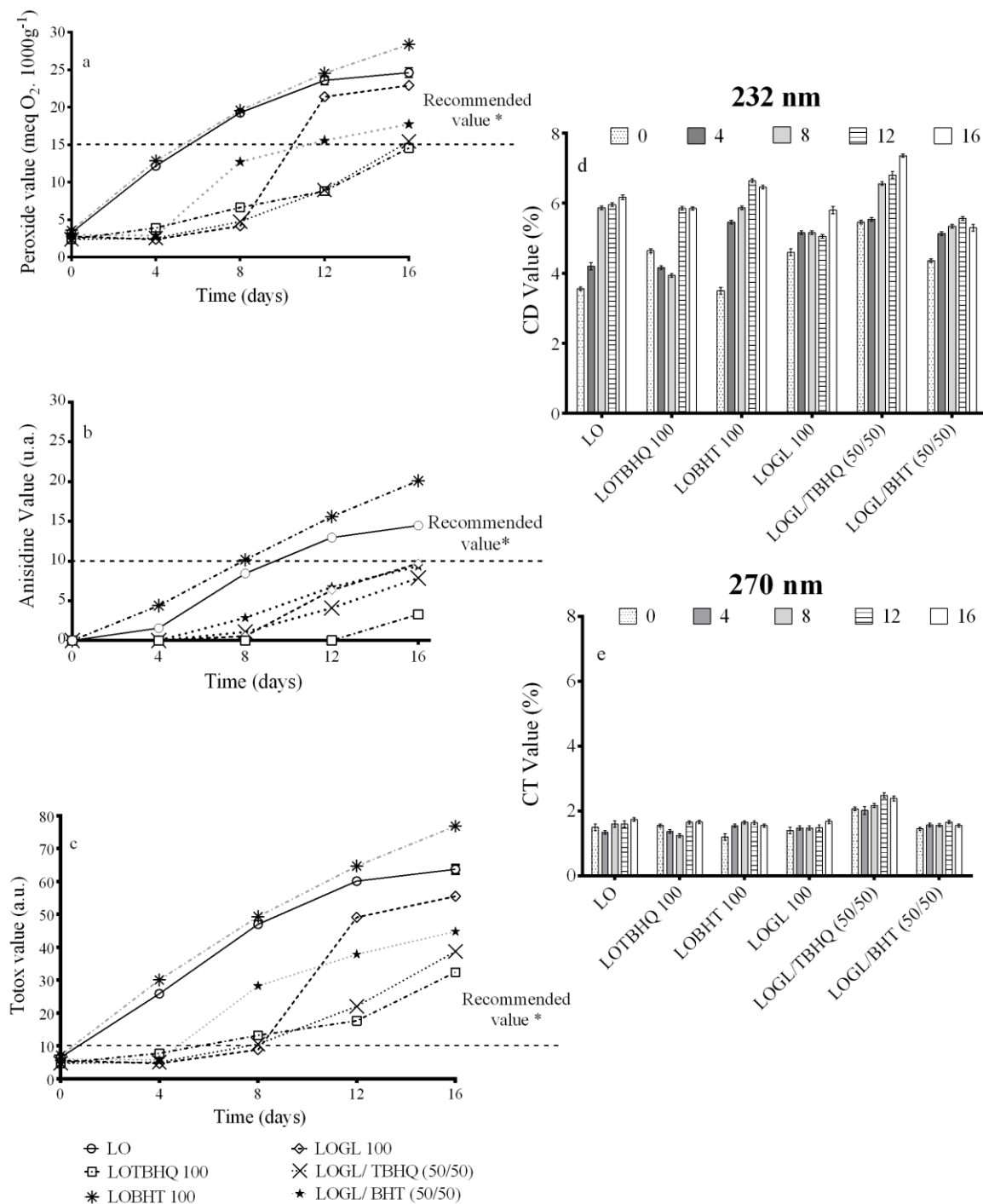
3.4.1 PV, AV and Totox Value

Figures 3a and 3b illustrate, respectively, the influence of different additives on the progression of primary oxidation (peroxides and hydroperoxides), represented by PV and a secondary (aldehydes, ketones, carboxylic acids) expressed by AV, from linseed oil, along 16 days of storage in a laboratory kiln. The correlation between these ratios is shown in Figure 3c, through Totox Value used to represent the actual condition of the oil samples studied.

Linseed oil showed good condition of conservation, characterized by the Totox Value less than 10 a.u. (Silva, Borges, & Ferreira, 1999) (Figure 3c), until the fourth day of storage for LOGL/BHT (50/50), and until the eighth day, to LOGL 100 and LOGL/TBHQ (50/50), and such protection being superior to the one exerted by TBHQ in LOTBHQ 100, which remained well maintained until around the sixth day.

LOGL/TBHQ (50/50) and LOTBHQ 100 showed similar behavior as the primary and secondary oxidation when individually observed (Figures 3a and 3b), remaining within the standards for PV, of up to 15 mEq O₂.1000 g⁻¹, for cold pressed oils (Codex Alimentarius, 2009), and to AV, less than 10 a.u. (Silva et al., 1999), during the 16 days of accelerated storage. Despite the sharp increase in the peroxide content to LOGL 100 from the eighth day, the level of secondary oxidation compounds (Figure 3b) also remained within the recommended standards to AV during the storage time, and this behavior was also observed in the sample LOGL/BHT (50/50). All samples of linseed oil partially or fully additivated with EEGL had PV, AV and Totox Value below those detected to the control (LO) during the entire storage period, demonstrating an effective antioxidant power of this extract (Figures 3a and 3b and 3c).

Fig. 3. Alterations in peroxide values (PV) (a), anisidine values (AV) (b), Totox value (c), dienes (d) and conjugated trienes (e) of linseed oil samples, with or without additives stored at 60 °C for 16 days.



Preserving the quality of the additivated samples in relation to the control can be attributed to the isolated action of the antioxidant constituents of EEGL and/or synergism among these and the synthetic BHT or TBHQ, suggesting the possibility of partial or even

total replacement of synthetic antioxidants by EEGl depending on the concentration used. Another possible justification for such protection is the increase of more active free forms of phenolic compounds, due to heating, which provides the bond cleavage of esterified and glycosylated phenolic forms (Xu et al., 2007), besides the increase of complex phenolic antioxidants resulting from the Maillard reaction. Kim, Kang & Gweon (2013) reported the increase of TPC and total flavonoids, especially flavanols, flavanones, and flavans and derivatives from hydroxycinnamic acid, in methanol extracts of aged black garlic subjected to various heat treatments, in relation to the fresh garlic extract. Ide et al. (1999), when studying the antioxidant effect of fructosyl arginine (Fru-Arg), a Maillard reaction product (MRP), in aged garlic extract, found that biological systems which had undergone oxidative processes and were incubated with Fru-Arg, showed peroxidation inhibition of Low density lipoprotein (LDL) and suppression of the formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), suggesting a high antioxidant potential for Fru-Arg, which may be used in the prevention of atherosclerosis and diseases associated with oxidative stress.

3.4.2 Conjugated dienes and trienes (CD and CT)

CD and CT (Figures 3d and 3e) were determined to evaluate, together with PV and AV, the degree of primary and secondary oxidation, respectively, from the identification of peroxides and hydroperoxides absorbed in the UV-visible at 232 nm, and of secondary oxidation compounds, at 270 nm.

The presence of natural and/or synthetic additives influence on the detection of primary and secondary oxidation negatively. This was noticeable due to overestimation of CD and CT values on day 0, in relation to LO, for most samples, especially for LOGl /TBHQ (50/50), showing differences in the results of PV and AV. Such interference may be attributed to the presence of other biomolecules that absorb in the same spectral regions mentioned above (Dobarganes & Velasco, 2002). Nevertheless, the steady increase of CD was noted, indicating probable increase of peroxides and hydroperoxides over the period of storage, and also low and constant CT values, indicating not very advanced oxidation processes, due to the likely protection caused by natural or synthetic antioxidants, isolated or in synergism.

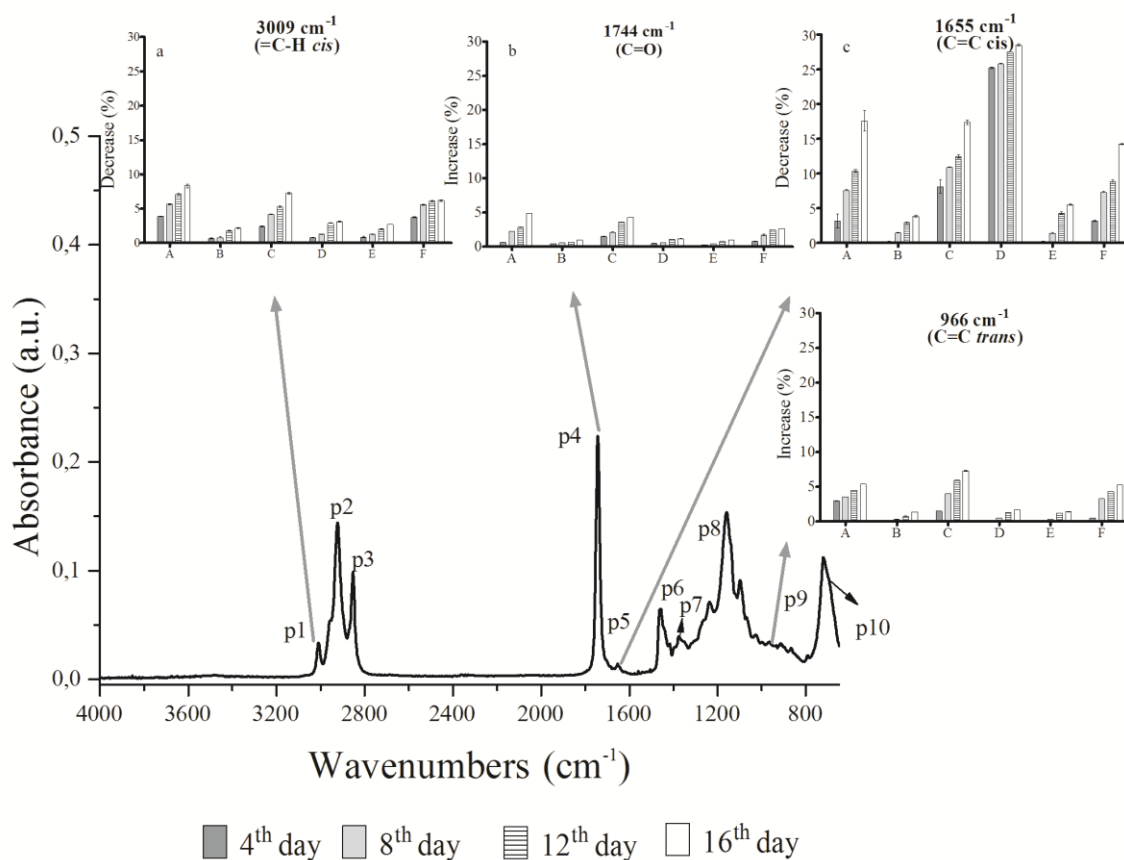
3.4.3 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

The samples of linseed oil with or without additives showed similar vibrational spectrum during the storage period in the laboratory kiln (Figure 4). Spectral bands common to all samples were identified (Epaminondas, Araújo, Nascimento, et al., 2011; Fonseca & Yoshida, 2009). A strong carbonyl stretching band ($C=O$), around 1734 cm^{-1} and vibrations of $C-O$ bonds at around 1164 cm^{-1} , represent the ester bond present in the triacylglycerol. A not very intense band near 3010 cm^{-1} can be assigned to $C-H$ stretching of non-conjugated double bonds in the *cis* position ($=C-H$), being strengthened by $C-H$ deformation bands to the outside of the plane, near 723 cm^{-1} , and stretching of the *cis* structure ($-CH=CH-$), around 1654 cm^{-1} , being these common bands to oils rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA), such as linseed oil. The low intensity band at around 970 cm^{-1} may be attributed to the deformation of double bonds ($C=C$) which are not conjugated in the *trans* position.

The control (LO) showed oxidative changes represented by reduction of the bands 3009 cm^{-1} and 1655 cm^{-1} (*cis* double bonds of PUFA) in 8.3% and 17.5% and by the increase in the bands 1744 cm^{-1} (carbonyl groups) and 966 cm^{-1} (*trans* double bonds) at 4.8% and 5.4%, respectively (Figure 4a-d).

EEGL and TBHQ, added to the linseed oil alone or combined, are effective against these reductions/increases in intensity of bands in relation to LO. TBHQ was the most active against additive reduction of *cis* double bond, a reduction of 2.2% to 3.9% and the bands 3009 cm^{-1} and 1655 cm^{-1} , respectively, in LOTBHQ 100, followed by the combination of EEGL and TBHQ (2.7% and 5.5% reduction) in LOGL/TBHQ (50/50). Despite the 3009 cm^{-1} band having reduced only 3.1% of the sample LOGL 100, the large decrease in 1655 cm^{-1} (28.5%) can not necessarily be attributed to the loss of *cis* double bonds, but to the volatilization and loss of organosulfur compounds that present the stretching vibration of $C=C$ of the allyl group with absorption around 1636 cm^{-1} (Kimbaris et al. 2006). LOTBHQ 100 and LOGL/TBHQ (50/50) showed no significant differences between them in raising the bands 1744 cm^{-1} (0.9%) and 966 cm^{-1} (1.4%), while LOGL 100 showed a small increase (1.2% and 1.7%) for the respective bands, suggesting good protection against formation of carbonyl and *trans* double bonds, characteristics of the oxidative process.

Fig. 4. Alterations in the main spectral bands linseed oil samples with (partially or completely) with or without additives at a temperature of 60 °C during 16 days of storage.



Spectrogram of linseed oil without added antioxidants (LO) on day 0 of storage. Major bands: 3009 cm⁻¹ (*cis* double bond) (p1) / (a); 1744 cm⁻¹ (C=O vibration) (p4) / (b), 1655 cm⁻¹ (not conjugated *cis* double bond) (p5) / (c), 966 cm⁻¹ (*trans* double bond) (p9) / (d). The other bands: p2 - 2924 cm⁻¹ (CH); p3 - 2852 cm⁻¹ (CH); p6 - 1458 cm⁻¹ (CH₂/(CH₂)_n); p7 - 1377 cm⁻¹ (CH₃); p8 - 1159 cm⁻¹ (CO)-O-C; p10 - 718 cm⁻¹ (CH₂/(CH₂)_n). Analyzed samples: A – LO; B – LOTBHQ 100; C – LOBHT 100; D – LOGL 100; E – LOGL/TBHQ (50/50); F – LOGL/BHT (50/50).

BHT, isolated or associated with EEGL, presented less effectiveness in protecting the *cis* double bonds in LOBHT 100 (7.2% and 17.4% reduction for the bands 3009 cm⁻¹ and 1655 cm⁻¹, respectively) and LOGL/BHT (50/50) (6.2% and 14.2% reduction for the same bands) as well as against the formation of carbonyl (increase of 4.3% and 2.6%) and *trans* double bonds (7.3% and 5.3%) to the respective samples, since these showed similar behavior to the oil without additive.

FTIR analysis showed that EEGL with or without the synthetic antioxidants can inhibit the oxidation of linseed oil, reducing the formation of secondary oxidation compounds and preventing the conversion of *cis* to *trans* fatty acids. These results were correlated to those for PV, AV and Totox Value.

4 Conclusion

Linseed oil additivated with ethanol extract of *A. sativum* L., associated or not with TBHQ, showed oxidative stability until the eighth day of storage at 60 °C, according to the recommended Totox Value. EEGL alone or synergistically associated with the BHT or TBHQ, protected linseed oil in a similar way to, or even higher than, isolated synthetic antioxidants during accelerated storage by inhibiting the formation of primary and secondary oxidation compounds detected by PV, AV and FTIR. This suggests the possibility of partial or total substitution of synthetic antioxidants for EEGL by the industry of edible oils. Such protection was due to the higher thermal stability and higher antioxidant activity of EEGL, when compared to MAEGL due to organosulfur and phenolic compounds naturally present in the extract and intensified with the heating, combined with other antioxidant substances formed.

Acknowledgements

The authors acknowledge the Brazilian Agencies National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for the financial support.

References

- Adkins, Y., & Kelley, D. S. (2010). Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21(9), 781–92. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.12.004
- AOCS. (2003). *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society*. Champaign Illinois: AOCS.
- 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), 70–6. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Blois, M. (1958). Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature*, 181(4617), 1199–1200. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Igic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*, 111(4), 925–929. doi:10.1016/j.foodchem.2008.04.071
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5

- Chung, L. (2006). The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. *Journal of Medicinal Food*, 9(2), 205–213. Retrieved from <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jmf.2006.9.205>
- Codex Alimentarius. (2009). Norma del codex para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales. In *Codex Stan 19-1981* (pp. 1–5). Retrieved from <http://www.codexalimentarius.org/normas-oficiales/es/>
- Contreras-Calderón, J., Calderón-Jaimes, L., Guerra-Hernández, E., & García-Villanova, B. (2011). Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, 44(7), 2047–2053. doi:10.1016/j.foodres.2010.11.003
- Dobarganes, M. C., & Velasco, J. (2002). Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(7), 420–428. doi:10.1002/1438-9312(200207)104:7<420::AID-EJLT420>3.0.CO;2-N
- Epaminondas, P. S., Araújo, K. L. G. V., Nascimento, J. A., Silva, M. C. D., Rosenhaim, R., Soledade, L. E. B., ... Souza, A. G. (2011). Influence of toasting and the seed variety on the physico-chemical and thermo-oxidative characteristics of the flaxseed oil. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 106(2), 545–550. doi:10.1007/s10973-011-1731-2
- Epaminondas, P. S., Araújo, K. L. G. V., Souza, A. L., Silva, M. C. D., Queiroz, N., Souza, A. L., ... Souza, A. G. (2011). Influence of toasting on the nutritious and thermal properties of flaxseed. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 106(2), 551–555. doi:10.1007/s10973-011-1638-y
- Fonseca, M. M., & Yoshida, M. I. (2009). Thermal analysis of raw and aged linseed oil. *Vértices*, 11, 61–75.
- Gallardo, G., Guida, L., Martinez, V., López, M. C., Bernhardt, D., Blasco, R., ... Hermida, L. G. (2013). Microencapsulation of linseed oil by spray drying for functional food application. *Food Research International*, 52(2), 473–482. doi:10.1016/j.foodres.2013.01.020
- Ide, N., Lau, B. H., Ryu, K., Matsuura, H., & Itakura, Y. (1999). Antioxidant effects of fructosyl arginine, a Maillard reaction product in aged garlic extract. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 10(6), 372–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15539313>
- Kim, J.-S., Kang, O.-J., & Gweon, O.-C. (2013). Comparison of phenolic acids and flavonoids in black garlic at different thermal processing steps. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 80–86. doi:10.1016/j.jff.2012.08.006
- Kimbaris, A. C., Siatis, N. G., Pappas, C. S., Tarantilis, P. a., Daferera, D. J., & Polissiou, M. G. (2006). Quantitative analysis of garlic (*Allium sativum*) oil unsaturated acyclic components using FT-Raman spectroscopy. *Food Chemistry*, 94(2), 287–295. doi:10.1016/j.foodchem.2005.01.017

- Marco, G. J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 594–598. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02668958>
- Michiels, J. A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, 130(4), 986–993. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.117
- Michotte, D., Rogez, H., Chirinos, R., Mignolet, E., Campos, D., & Larondelle, Y. (2011). Linseed oil stabilisation with pure natural phenolic compounds. *Food Chemistry*, 129(3), 1228–1231. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.108
- Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48, 91.
- Nascimento, J. a., Araújo, K. L. G. V., Epaminondas, P. S., Souza, A. S., Magnani, M., Souza, A. L., ... Souza, A. G. (2013). Ethanolic extracts of *Moringa oleifera* Lam. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. doi:10.1007/s10973-013-3045-z
- Nencini, C., Menchiari, A., Franchi, G. G., & Micheli, L. (2011). In vitro antioxidant activity of aged extracts of some Italian *Allium* species. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)*, 66(1), 11–6. doi:10.1007/s11130-010-0204-2
- Noda, Y., Asada, C., Sasaki, C., Hashimoto, S., & Nakamura, Y. (2013). Extraction method for increasing antioxidant activity of raw garlic using steam explosion. *Biochemical Engineering Journal*, 73, 1–4. doi:10.1016/j.bej.2013.01.013
- Omar, S. H., & Al-Wabel, N. a. (2010). Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(1), 51–58. doi:10.1016/j.jsps.2009.12.007
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–302. doi:10.1021/jf0502698
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396–402. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10956123>
- Queiroz, Y. S., Ishimoto, E. Y., Bastos, D. H. M., Sampaio, G. R., & Torres, E. a. F. S. (2009). Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: In vitro antioxidant activity. *Food Chemistry*, 115(1), 371–374. doi:10.1016/j.foodchem.2008.11.105
- Ramalho, V. C., & Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29(4), 755–760.
- Rodriguez-Leyva, D., Bassett, C. M. C., McCullough, R., & Pierce, G. N. (2010). The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. *Canadian Journal of Cardiology*, 26(9), 489–496. doi:10.1016/S0828-282X(10)70455-4

- Santos, N. A., Cordeiro, A. M. T. M., Damasceno, S. S., Aguiar, R. T., Rosenhaim, R., Carvalho Filho, J. R., ... Souza, A. G. (2012). Commercial antioxidants and thermal stability evaluations. *Fuel*, 1–6. doi:10.1016/j.fuel.2012.01.074
- Silva, A. C., & Jorge, N. (2012). Influence of *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei* extracts on the prevention of oxidation and retention of tocopherols in soybean oil in an accelerated storage test. *Journal of Food Science and Technology*. doi:10.1007/s13197-012-0623-1
- Silva, F. A. M., Borges, M. F. M., & Ferreira, M. A. (1999). Methods for the evaluation of the degree of lipid oxidation and the antioxidant activity. *Química Nova*, 22(1), 94–103.
- Slinkard, K., & Singleton V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55.
- Sun-Waterhouse, D., Thakorlal, J., & Zhou, J. (2011). Effects of added phenolics on the storage stability of avocado and coconut oils. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(8), 1575–1585. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02655.x
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H., & Sokmen, a. (2005). In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five species from Turkey. *Food Chemistry*, 92(1), 89–92. doi:10.1016/j.foodchem.2004.07.016
- Wongsa, P., Chaiwarit, J., & Zamaludien, A. (2012). In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against α -amylase and α -glucosidase of culinary herbs in Thailand. *Food Chemistry*, 131(3), 964–971. doi:10.1016/j.foodchem.2011.09.088
- Xu, G., Ye, X., Chen, J., & Liu, D. (2007). Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(2), 330–5. doi:10.1021/jf062517l
- Zhang, Y., Yang, L., Zu, Y., Chen, X., Wang, F., & Liu, F. (2010). Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage. *Food Chemistry*, 118(3), 656–662. doi:10.1016/j.foodchem.2009.05.038
- Zuta, P. C., Simpson, B. K., Zhao, X., & Leclerc, L. (2007). The effect of α -tocopherol on the oxidation of mackerel oil. *Food Chemistry*, 100(2), 800–807. doi:10.1016/j.foodchem.2005.11.003

Avaliação do efeito antioxidante do extrato etanólico de *Allium sativum* L., isolado e/ ou sinergicamente associado a antioxidantes sintéticos, aplicados ao óleo de linhaça

Poliana S. Epaminondas^{a,b,*}, Kassandra L. G. V. Araújo^a, Jaqueline A. Nascimento^a, Alline L. Souza^{a,d}, Raul Rosenhaim^{c,e}, Antonio G. Souza^c

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CT, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58051-970, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

^b Unidade Acadêmica de Tecnologia de Alimentos e Agroindústria, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFPB), 58800-970, Campus Sousa, Sousa - Paraíba, Brasil.

^c Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM), Departamento de Química, CCEN, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58059-900, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

^d Laboratório de Físico-química, Departamento de Tecnologia de Alimentos, CTDR, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58055-000, Campus V, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

^e Departamento de Engenharia Química, CT, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58051-970, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

* Autor correspondente. Tel/Fax.: + 55 83 3216 7441.

Endereço eletrônico: polis.epaminondas@yahoo.com.br (P. S. Epaminondas).

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o poder antioxidante de extrato etanólico de alho (EEGL), isolado ou associado aos antioxidantes sintéticos terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e butil-hidroxitolueno (BHT), sobre a estabilidade térmica e oxidativa do óleo de linhaça. O teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) de EEGL foi preliminarmente determinado como procedimento prévio para as aditivações do óleo de linhaça. O efeito de EEGL, associado ou não a TBHQ ou BHT, sobre a estabilidade oxidativa de óleo de linhaça, foi avaliado, utilizando-se as técnicas de Termogravimetria (TG), Calorimetria Exploratória Diferencial Pressurizada (P-DSC), PetroOxy e Rancimat. Os resultados mostraram que EEGL, isolado ou associado aos antioxidantes sintéticos, conferiu significativo aumento à estabilidade oxidativa do óleo de linhaça, oferecendo resistência contra a oxidação primária, com destaque para as amostras LOGL 150, LOGL 100, LOGL/TBHQ (50/50). Diante do potencial antioxidante e

do efeito sinérgico do extrato de alho, quando utilizado de modo isolado ou associado ao TBHQ ou BHT, considera-se viável a utilização de EEGL para a substituição parcial ou total de antioxidantes sintéticos, pela indústria de óleos comestíveis.

Keywords: Óleo de linhaça, *Allium sativum* L (alho), antioxidantes, sinergismo, estabilidade térmica e oxidativa, análise térmica.

1. Introdução

O nobre perfil lipídico do óleo de linhaça, constituído de cerca de 60% de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), sendo aproximadamente 43% de ácido alfa-linolênico (ALA, C18:3) e 18% de ácido linoleico (LA, C18:2) [1], torna-o aliado na prevenção de doenças cardiovasculares [2,3], cânceres [4], doenças auto-imunes e articulares [5]. Tais benefícios devem-se principalmente à ação anti-inflamatória de ALA [3], um ácido graxo essencial ômega-3, que se converte em ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6) e ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5), por meio de bioreações metabólicas de alongamento e dessaturação, promovendo a redução de mediadores pró-inflamatórios por competição com o ácido araquidônico (AA, C20:4) em vias enzimáticas [2,6].

Entretanto, a presença de PUFA aumenta a susceptibilidade do óleo de linhaça ao processo oxidativo [7], que se inicia a partir de reações entre oxigênio singlete e moléculas de ácido graxo insaturado, catalisadas por calor, luz, enzimas, pigmentos ou metais, com formação de radicais livres. Reações em cadeia entre radicais livres e oxigênio propagam o processo oxidativo, formando peróxidos e outros diferentes tipos de espécies reativas. A formação de compostos secundários da oxidação (cetonas, aldeídos e ácidos carboxílicos) caracteriza o término das reações oxidativas, sendo estes compostos estáveis responsáveis por alterações sensoriais (sabor e odor de ranço, aumento de viscosidade e alteração da cor) e nutricionais de óleos comestíveis [8,9].

Para deter o processo oxidativo e aumentar a vida de prateleira de óleos comestíveis, a indústria alimentícia tem recorrido ao uso de antioxidantes sintéticos, como TBHQ e BHT. Estes, porém, têm sido restritos em vários países, devido aos efeitos tóxicos à saúde humana [10,11]. No Brasil, TBHQ e BHT podem ser utilizados com limite máximo de 200 mg.kg⁻¹ e 100 mg.kg⁻¹, respectivamente [12]. Por esse motivo, pesquisas de antioxidantes naturais têm sido incentivadas, com a finalidade de obtenção de fontes antioxidantes seguras à saúde

humana e eficazes contra a oxidação, capazes de substituir parcial ou totalmente os antioxidantes artificiais [13].

Alho (*Allium sativum* L.) é uma hortaliça mundialmente difundida devido a seus atributos culinários e medicinais. Na medicina alternativa, o alho é utilizado como estimulante do sistema imunológico e antibiótico natural não agressivo à flora intestinal [14]. Estudos comprovam suas propriedades antifúngica, antibacteriana, antivirótica, imunoestimulante, antiagregatória, hipotensiva e antioxidante [14,15], sendo o alho, assim, recomendado para tratamento de parasitoses, infecções microbianas, doenças cardiovasculares (aterosclerose, hiperlipidemia, trombose, hipertensão e diabetes) e imunodepressoras, além do câncer [16–19]. Tais propriedades medicinais têm sido atribuídas aos compostos organossulfurados presentes no alho [14]. A alicina (dialil tiosulfonato), um dos compostos organossulfurados mais abundante no alho recém-processado, é formado a partir de reações enzimáticas resultantes de danos ao bulbo de alho por corte ou moagem [20]. Entretanto, devido à elevada instabilidade da alicina, as propriedades biológicas do alho são ocasionadas por seus compostos organossulfurados derivados hidro e lipossolúveis [14].

Diante das restrições de uso de antioxidantes sintéticos, devido aos efeitos danosos à saúde, e considerando-se a presença de substâncias potencialmente antioxidantes no alho e em seus subprodutos, o objetivo deste trabalho foi estudar o efeito do extrato etanólico de alho sobre a estabilidade térmica e oxidativa do óleo de linhaça, utilizando-se as técnicas de TG, P-DSC, Rancimat e PetroOxy, visando a substituição total ou parcial dos antioxidantes sintéticos pelo extrato de alho.

2. Materiais e Métodos

O óleo de linhaça dourada prensado a frio, sem adição de antioxidantes (Cisbra Group[®]) e bulbos de alho frescos (*A. sativum* L.) foram adquiridos no comércio local de João Pessoa/PB, Brasil.

Os bulbos de alho foram separados, descascados manualmente e processados em processador doméstico. O extrato etanólico de alho (EEGL) foi obtido a partir de 10 g de alho triturado, misturados a 40 mL de etanol, e homogeneizados em banho termostatzado a 25 °C, sob agitação por 2 horas. Após a centrifugação (5000 rpm/ 20 minutos), filtração do sobrenadante e aferição em balão de 100 mL com etanol, o extrato obtido foi acondicionado em frasco âmbar em atmosfera inerte até a utilização.

Para determinar a quantidade de extrato de alho utilizado nos óleos de linhaça aditivados (LOA), estabeleceu-se o rendimento de EEGL (gravimetria a 105 °C, a partir de 1 mL da solução de EEGL), e o conteúdo de fenólicos totais (TPC) de EEGL, estimado colorimetricamente pelo método Folin-Ciocalteu [21], com leituras de absorbância (765 nm) em espectrofotômetro UV-vis (model UV-2550, Shimadzu) e curva de calibração do padrão ácido gálico de 50-500 mg . L⁻¹. Os resultados de rendimento (% de extrato seco por 100 g de alho fresco) e TPC em equivalente de ácido gálico (mg GAE . g⁻¹ de extrato seco e mg GAE.g⁻¹ alho fresco) são mostrados na Tabela 1.

Para avaliação do comportamento térmico e oxidativo do óleo de linhaça, quantidade suficiente de EEGL desidratado, contendo 50, 100 e 150 mg.kg⁻¹ de TPC, foi adicionada a 20 g de óleo de linhaça dourada, sendo homogeneizada em agitador magnético por 30 minutos, para constituir as amostras LOGL 50, LOGL 100 e LOGL 150, respectivamente. Os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT, adicionados ao óleo de linhaça, na concentração de 100 mg.kg⁻¹, foram utilizados como controles positivos (LOTBHQ 100 e LOBHT 100). O óleo de linhaça sem aditivos (LO) foi utilizado como controle negativo. Para avaliar um possível efeito sinérgico, o extrato de alho (50 mg.kg⁻¹) foi associado aos antioxidantes sintéticos TBHQ ou BHT (50 mg.kg⁻¹), para a mesma massa de óleo de linhaça, constituindo as amostras LOGL/TBHQ (50/50) e LOGL/BHT (50/50).

Curvas termogravimétricas (TG) e Análise Térmica Diferencial (DTA) de EEGL, LOA e LO foram obtidas em Analisador Térmico Simultâneo DTA-TG-DTG, modelo H-60, marca Shimadzu, utilizando-se cerca de 10 mg de cada amostra em cadinho de platina, atmosfera de ar sintético com fluxo de 50 mL.min⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ até 700 °C, a partir de análises não-isotérmicas [1,22]. As temperaturas iniciais (T₀) de primeira e de segunda etapa de perda de massa foram utilizadas como parâmetro para determinação da estabilidade térmica, para as amostras de óleo e para o extrato de alho, respectivamente. As análises isotérmicas de EEGL foram realizadas a 65 °C.

Curvas isotérmicas P-DSC do óleo de linhaça, com e sem aditivos, foram obtidas em *Pressure Differential Scanning Calorimeter*, modelo DSC Q20P, *TA Instruments*, a partir de aproximadamente 10 mg de amostra, em cadinho de alumínio e atmosfera de oxigênio com pressão de 700 kPa, a 110 °C. A estabilidade oxidativa (OS), representada pelo tempo de indução oxidativa a altas pressões (HPOIT), foi determinada a partir do tempo de oxidação *onset* (t_{onset}), obtido a partir da extrapolação da tangente à curva P-DSC.

A estabilidade oxidativa de LO e LOA foi também determinada por PetroOxy, utilizando 5 mL de amostra, sob pressão de oxigênio de 700 kPa, em equipamento Petrotest,

modelo 13-3000, com resultados expressos como período de indução (IP). O método proposto por AOCS CD 12b-92 [23], em equipamento Rancimat (873 Biodiesel, Metrohm) também foi utilizado, a partir de 2 gramas de amostra, temperatura de 110 °C e fluxo de ar constante (10 L.h⁻¹), sendo os resultados expressos como índice de estabilidade oxidativa (OSI). Os percentuais de proteção das amostras aditivadas em relação ao óleo puro foram obtidos a partir da equação:

$$\text{Proteção (\%)} = (\text{OS amostra} - \text{OS controle}) \times 100 / \text{OS controle}$$

em que OS amostra é a estabilidade oxidativa (HPOIT, IP ou OSI) da amostra avaliada e OS controle é a estabilidade oxidativa (HPOIT, IP ou OSI) do óleo de linhaça não aditivado (LO).

Os resultados dos ensaios, realizados em triplicata, foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão, sendo comparados por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey, com auxílio do programa estatístico SigmaStat 3.5, considerando $P < 0,05$. Os gráficos foram elaborados com auxílio dos programas GraphPad Prism 5.0 e OriginPro 8.0.

3. Resultados e discussão

O teor de fenólicos totais, determinado para o extrato etanólico de alho (10.55 mg GAE . g⁻¹ de extrato seco) (Tabela 1), neste trabalho, foi superior ao encontrado por Wongs, Chaiwarit e Zamaludien [24], para extratos aquosos (3.31 $\pm$ 0.09 mg GAE.g⁻¹ de extrato seco) e por Queiroz et al. [25], para extratos metanólicos (6.99 mg GAE.g⁻¹ de extrato seco), obtidos em condições diversas, reforçando a ideia da influência do solvente e das condições de extração no rendimento e na composição de fenólicos de extratos vegetais [26]. As propriedades antioxidantes de extratos de alho estão associadas à presença de compostos fenólicos e organossulfurados. Os compostos fenólicos são estruturalmente caracterizados pela presença de grupos hidroxilo, ligados a anéis aromáticos, capazes de interromper o progresso da auto-oxidação por neutralização de radicais livres a partir da doação de hidrogênio e formação do radical fenoxi, quimicamente estável [27]. Os compostos organossulfurados alil dissulfeto, aliina, alicina, and alil cisteína, dentre outros compostos presentes no alho, são eficientes contra a peroxidação lipídica, apresentando diferentes padrões de eliminação de radicais livres [28].

Tabela 1 Rendimento e TPC do extrato etanólico de alho

Amostras	Rendimento (%) ^A	TPC (mg GAE . g ⁻¹ D.E.) ^A	TPC (mg GAE . g ⁻¹ F.G.) ^A
EEGL	23.42 ± 0.25	10.55 ± 0.76	2.47 ± 0.20

^A Valores correspondentes à média ± desvio padrão (n= 9)

D. E. – extrato seco; F. G. – alho fresco

Curvas TG e DTA de EEGL e de amostras de óleo de linhaça com ou sem aditivação são ilustradas nas respectivas Figuras 1 e 2. Os dados obtidos a partir das referidas curvas encontram-se sumarizados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

A perda de massa inicial de 5.5% (Tabela 2) é atribuída, provavelmente, à perda de água e solvente residual. Este fato é corroborado pela análise isotérmica de EEGL a 65 °C (Figura 1b), que demonstrou perda de cerca de 5.5% de massa após 54 minutos, permanecendo estável, posteriormente, por um tempo superior a 10 horas. Assim, EEGL mostrou-se termicamente estável até 104 °C (Tabela 2, Figura 1a). A segunda etapa de perda de massa, caracterizada pela curva DTA como um evento endotérmico, pode ser atribuída à volatilização de compostos fenólicos e de outros antioxidantes mais estáveis. Os eventos exotérmicos detectados pela curva DTA podem estar relacionados à oxidação de substâncias lipídicas, à decomposição e à combustão da matéria orgânica contida no extrato.

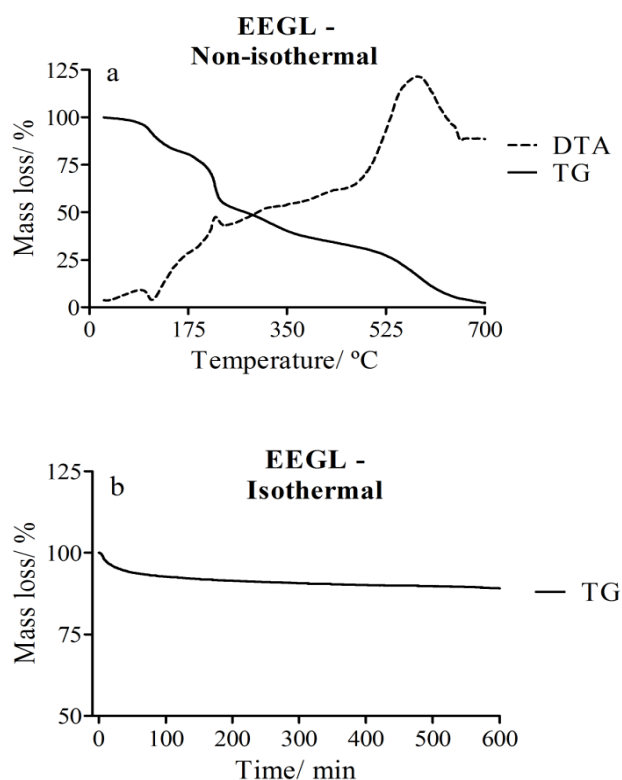
Figura 1 Curvas (a) TG/ DTA e (b) isotérmica a 65 °C do extrato etanólico de alho

Tabela 2 Dados referentes às curvas TG e DTA de EEGL

EEGL	TG - Não-isotérmica				DTA	
	Etapas	T _i ^a – T _f ^b / °C	T _{onset} / °C	Δm ^c / %	Transição	T/ °C
	1 st	45 – 104	90	5.5	Endo	45
	2 nd	104 – 185	141	15.1	Endo	111
	3 rd	185 – 253	220	26.4	Exo	223
	4 th	253 – 470	317	20.6	Exo	314
	5 th	470 – 701	570	29.7	Exo	577
	Residuo	-	-	2.4	-	-

^a Temperatura inicial; ^b Temperatura final; ^c Perda de massa.

Extratos etanólicos de folhas, flores e vagens de *Moringa oleífera* L. apresentaram estabilidade térmica variando de 66 a 83 °C [29], enquanto que o antioxidante natural puro ácido gálico apresentou estabilidade térmica de 68 °C, com perda de 9% de massa após 13 minutos de aquecimento a 110 °C [30].

LO e LOA apresentaram perfis termogravimétricos com variação de três a seis etapas de perda de massa, caracterizadas exclusivamente por eventos exotérmicos, evidenciados pela curva DTA (Figura 2 e Tabela 3). LOBHT 100, LOGL 50 e LOGL 100 apresentaram estabilidade térmica em torno de 180 °C, não demonstrando diferença significativa em relação a LO, enquanto que LOGL 150, LOGL/BHT (50/50), LOGL/TBHQ (50/50) e LOTBHQ 100 apresentaram estabilidade térmica de 203 °C, 209 °C, 212 °C e 218 °C, superiores a LO em 13%, 16%, 17% e 21%, respectivamente. Esses resultados demonstram que o EEGL, isolado ou associado sinergicamente a antioxidantes sintéticos, é capaz de aumentar a resistência térmica do óleo de linhaça. Epaminondas et al. [1] encontraram maior estabilidade térmica (208 °C), para óleo de linhaça dourada recém-prensado e sem antioxidantes, em relação ao óleo de linhaça comercial não aditivado, utilizado neste estudo. Tal superioridade pode ser atribuída, provavelmente, ao baixo teor de ácido alfa-linolênico encontrado por esses autores, em relação à literatura, implicando em processos oxidativos provavelmente iniciados. De modo geral, as etapas de decomposição de óleos vegetais caracterizam-se, inicialmente, pela provável pirólise de triacilgliceróis (mono e diacilgliceróis e ácidos graxos livres), volatilização de ácidos graxos e compostos antioxidantes constituintes, além da oxidação de cadeias lipídicas poli-insaturadas, em torno de 180 a 370 °C, evidenciando a etapa de iniciação do processo oxidativo. A combustão dos componentes remanescentes da primeira etapa, com massa molecular intermediária, caracteriza a perda de massa em torno de 370 a 500 °C. No intervalo médio de 500 e 600 °C, é comum a ocorrência da combustão de polímeros resultantes da oxidação das cadeias de ácidos graxos [31–33].

Figura 2 Curvas TG/ DTA do óleo de linhaça puro (a) e aditivado com antioxidantes sintéticos isolados (b-c), extrato de alho isolado (d-f) ou extrato de alho associado a antioxidantes sintéticos (g-h)

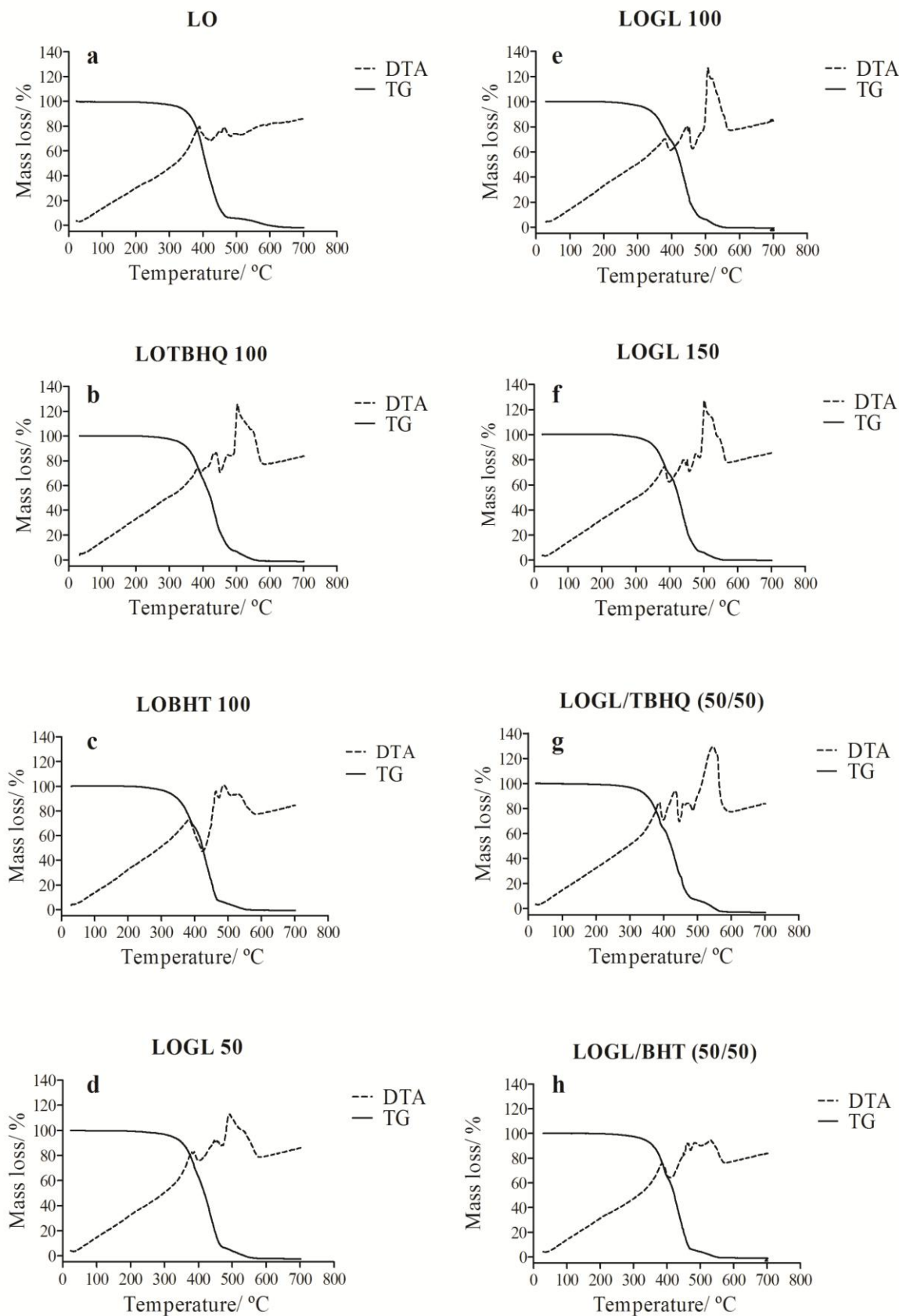


Tabela 3 Dados referentes às curvas TG e DTA do óleo de linhaça puro ou aditivado com extrato etanólico de alho e/ou antioxidantes sintéticos

Amostras		TG – não-isotérmica			DTA	
		Etapas	$T_i^a - T_f^b /$ °C	$\Delta m^c / \%$	Transição	T/ °C
Controle negative	LO	1 st	180 - 421	61.5	Exo	390
		2 nd	421 - 485	31.3	Exo	463
		3 rd	485 - 700	7.2	Exo	580
Controle positive	LOTBHQ 100	1 st	218 - 396	32.5	Exo	386
		2 nd	396 - 414	11.0	Exo	406
		3 rd	414 - 435	17.4	Exo	432
		4 rd	435 - 451	15.5	Exo	438
		5 rd	451 - 493	15.0	Exo	474
		6 rd	493 - 700	8.6	Exo	505
	LOBHT 100	1 st	181 - 395	31.3	Exo	382
		2 nd	395 - 448	44.0	Exo	423
		3 rd	448 - 475	17.4	Exo	464
		4 rd	475 - 700	7.3	Exo/ Exo	486/ 533
Aditivos Naturais	LOGL 50	1 st	180 - 383	24.0	Exo	379
		2 nd	383 - 394	9.0	Exo	390
		3 rd	394 - 449	47.0	Exo	447
		4 th	449 - 469	11.0	Exo	453
		5 th	469 - 700	9.0	Exo	491
	LOGL 100	1 st	181 - 387	23.5	Exo	380
		2 nd	387 - 448	42.5	Exo	444
		3 rd	448 - 456	7.5	Exo	452
		4 th	456 - 498	19.5	Exo	484
		5 th	498 - 700	7.0	Exo	508
	LOGL 150	1 st	203 - 379	20.5	-	-
		2 nd	379 - 390	7.5	Exo	385
		3 rd	390 - 446	43.3	Exo	440
		4 th	446 - 458	10.5	Exo	452
		5 th	458 - 490	11.0	Exo	477
		6 th	490 - 700	7.2	Exo	503
Aditivos Naturais + Sintéticos	LOGL/TBHQ (50/50)	1 st	212 - 397	34.0	Exo	389
		2 nd	397 - 446	36.0	Exo	436
		3 rd	446 - 459	9.0	Exo	457
		4 th	459 - 489	11.0	Exo	477
		5 th	489 - 700	10.0	Exo	546
	LOGL/ BHT (50/50)	1 st	209 - 387	24.5	Exo	385
		2 nd	387 - 400	10.0	Exo	394
		3 rd	400 - 447	42.0	Exo	444
		4 th	447 - 453	5.5	Exo	451
		5 th	453 - 472	11.0	Exo	461
		6 th	472 - 700	7.0	Exo	530

A estabilidade oxidativa de amostras de LO e LOA com EEGL e antioxidantes sintéticos, associada ou isoladamente, encontra-se representada na Tabela 4 e nas Figuras 3 e 4. Os dados obtidos mostram uma baixa estabilidade oxidativa para LO, evidenciada pelos valores de HPOIT (0.98 h), IP (1.14 h) e OSI (2.17 h), detectados pelas técnicas de P-DSC, PetroOxy e Rancimat, respectivamente (Tabela 4). Essa baixa estabilidade é atribuída ao elevado teor de PUFA presente no óleo de linhaça [1], justificando a necessidade do uso de antioxidantes para aumentar a vida de prateleira deste óleo.

Figura 3 Curvas P-DSC do óleo de linhaça puro ou aditivado com extrato etanólico de alho e/ou antioxidantes sintéticos

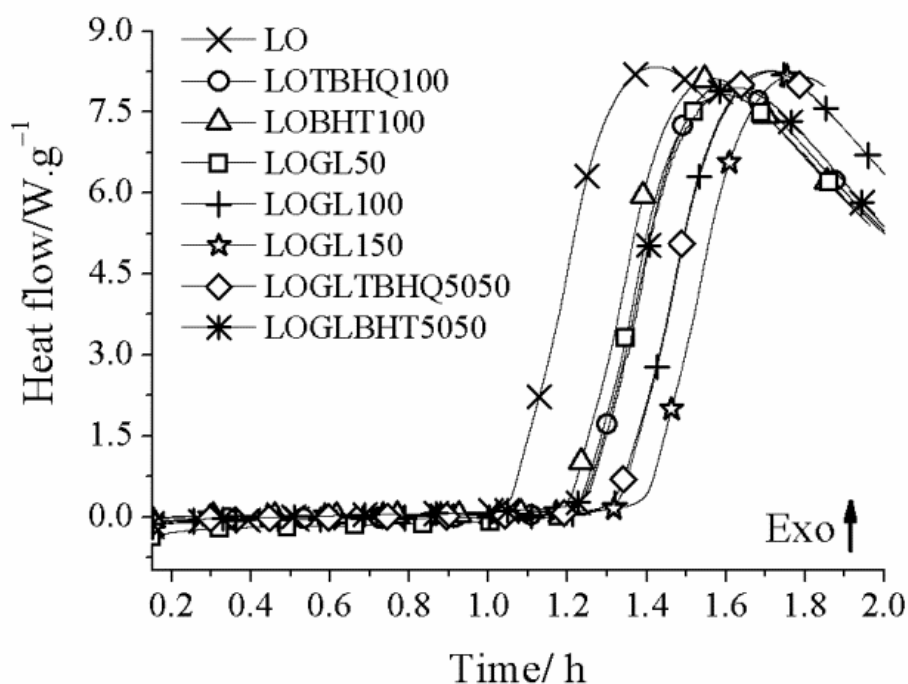
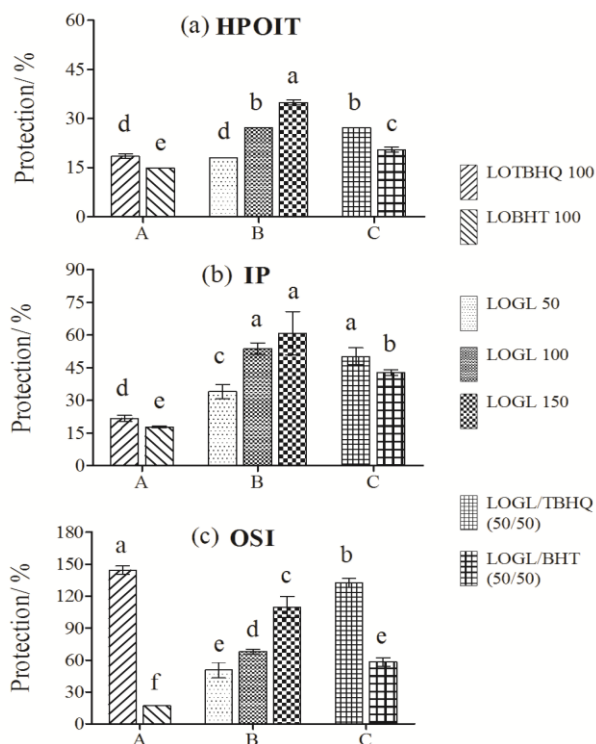


Tabela 4 Dados de HPOIT (h), IP (h) e OSI (h) com os respectivos percentuais de proteção* para o óleo de linhaça puro ou aditivado com extrato etanólico de alho e/ou antioxidantes sintéticos

Amostras	P-DSC		PetroOxy		Rancimat	
	HPOIT/ h	Proteção/ %	IP/ h	Proteção/ %	OSI/ h	Proteção/ %
LO	0.98 ± 0.01 ^d	-	1.14 ± 0.02 ^f	-	2.17 ± 0.31 ^e	-
LOTBHQ 100	1.15 ± 0.01 ^c	18.46 ± 0.73 ^d	1.39 ± 0.02 ^d	21.69 ± 1.45 ^d	5.30 ± 0.08 ^a	144.24 ± 3.91 ^a
LOBHT 100	1.12 ± 0.00 ^c	14.87 ± 0.00 ^e	1.34 ± 0.00 ^e	17.68 ± 0.36 ^e	2.54 ± 0.33 ^e	17.05 ± 0.08 ^f
LOGL 50	1.15 ± 0.00 ^c	17.95 ± 0.00 ^d	1.53 ± 0.04 ^c	33.98 ± 3.26 ^c	3.27 ± 0.42 ^d	50.46 ± 7.38 ^e
LOGL 100	1.24 ± 0.00 ^b	27.18 ± 0.00 ^b	1.75 ± 0.03 ^a	53.70 ± 3.69 ^a	3.65 ± 0.05 ^d	67.97 ± 2.28 ^d
LOGL 150	1.32 ± 0.01 ^a	34.87 ± 0.71 ^a	1.83 ± 0.11 ^a	60.81 ± 9.98 ^a	4.55 ± 0.21 ^c	109.68 ± 9.78 ^c
LOGL/ TBHQ (50/50)	1.24 ± 0.00 ^b	27.18 ± 0.00 ^b	1.71 ± 0.05 ^a	50.21 ± 3.98 ^a	5.05 ± 0.09 ^b	132.49 ± 4.24 ^b
LOGL/ BHT (50/50)	1.18 ± 0.01 ^c	20.51 ± 0.82 ^c	1.63 ± 0.01 ^b	42.80 ± 2.29 ^b	3.43 ± 0.47 ^d	58.06 ± 3.76 ^e

Figura 4 Percentuais de proteção* das amostras de LOA em relação a LO, para HPOIT (a), IP (b) e OSI (c), por ação do extrato etanólico de alho e/ou antioxidantes sintéticos.



* Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa ($p \leq 0.05$), pelo teste de Tukey.

As amostras LOGL 150, LOGL 100 e LOGL/ TBHQ (50/50) demonstraram alta estabilidade oxidativa (1.83 h, 1.75 h e 1.71 h, respectivamente) e elevado percentual de proteção (61%, 54% e 50%, respectivamente), em relação a LO (Figura 4b e Tabela 4), não apresentando diferença significativa quanto aos valores de IP, detectados pelo método PetroOxy. Características semelhantes foram observadas para as mesmas amostras avaliadas por P-DSC (Figura 4a e Tabela 4), quanto ao percentual de proteção (LOGL 150 (35%) > LOGL 100 = LOGL/ TBHQ (50/50) (27%) > LOGL/ BHT (50/50) (21%) > LOGL 50 = LOTBHQ 100 (18%) > LOBHT 100 (15%), confirmando a correlação entre as técnicas e evidenciando uma maior capacidade do extrato de alho, isolado ou associado aos antioxidantes sintéticos, em relação aos sintéticos isolados, em proteger o óleo de linhaça contra a oxidação no início do processo oxidativo. As técnicas P-DSC e PetroOxy caracterizam-se pelo registro do pico exotérmico e da queda de 10 % da pressão de oxigênio, respectivamente, ocasionados pela formação de peróxidos na fase de inicial da oxidação, sendo utilizados para avaliar a resistência da amostra à oxidação [34,35].

O aumento significativo da estabilidade oxidativa do óleo de linhaça por ação de EEGL isolado, em concentrações diversas, ou associado a TBHQ ou BHT, comprova o efetivo potencial antioxidante do extrato de alho, o efeito sinérgico entre EEGL e TBHQ ou BHT e a possibilidade de substituição parcial ou total dos antioxidantes sintéticos por EEGL. Este fato pôde ser corroborado, especialmente, pelos dados de P-DSC e PetroOxy (Figura 3 e 4 a e b, Tabela 4), em que LOGL 100 = LOGL/ TBHQ (50/50) > LOTBHQ 100.

As amostras aditivadas com TBHQ (LOTBHQ 100 e LOGL/ TBHQ (50/50)) apresentaram valores de OSI (5.30 h e 5.05 h, respectivamente) e percentual de proteção contra a oxidação (144% e 132%, respectivamente), mais elevados em relação a LO (2.17 h) e às amostras aditivadas com extrato de alho isolado (Tabela 4 e Figura 4c). Estes dados demonstram que o TBHQ retarda mais efetivamente o aparecimento de compostos secundários da oxidação, em comparação com EEGL e BHT, evitando a evolução do processo oxidativo. A técnica Rancimat caracteriza-se por detectar o aumento da condutividade elétrica, ocasionado pela formação de cetonas, aldeídos, ácidos e outros compostos orgânicos voláteis, resultantes da oxidação secundária da amostra [36]. A proteção superior oferecida pelo TBHQ na etapa final da oxidação deve-se, provavelmente, à elevada resistência térmica de suas moléculas, evidenciada por Santos et al. [30]. Um comportamento similar ao observado pelas amostras aditivadas com extrato de alho, submetidas às técnicas P-DSC e PetroOxy, referente ao aumento da estabilidade oxidativa, foi também verificado pela técnica Rancimat, demonstrando a efetividade de EEGL também no retardo da evolução oxidativa. A

presença de compostos fenólicos e organossulfurados (Aliina, γ -glutamilcisteína e derivados) justificam a ação antioxidante do extrato de alho [37], a qual é intensificada por processos de aquecimento e envelhecimento, devido ao aumento de formas livres de compostos fenólicos e pela formação de compostos organossulfurados derivados, como S-alilcisteína e S-alilmercaptocisteína, além de produtos de reação de Maillard [37–40].

4. Conclusão

O extrato etanólico de alho aumentou significativamente a estabilidade oxidativa do óleo de linhaça, demonstrando efetivo potencial antioxidante e atuando de forma sinérgica com os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT. EEGL protegeu o óleo de linhaça mais efetivamente na fase inicial do processo oxidativo, oferecendo resistência à formação de peróxidos, segundo as técnicas PetroOxy e P-DSC, enquanto que o TBHQ atuou melhor no final da oxidação, retardando o aparecimento de compostos secundários da oxidação, conforme resultados de Rancimat. Estes fatos evidenciam que EEGL pode ser utilizado pela indústria de óleos comestíveis como substituto parcial ou total dos antioxidantes sintéticos.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Referências

1. Epaminondas PS, Araújo KLG V., Nascimento JA, Silva MCD, Rosenhaim R, Soledade LEB, et al. Influence of toasting and the seed variety on the physico-chemical and thermo-oxidative characteristics of the flaxseed oil. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* [Internet]. 2011 Jun 29 [cited 2013 Jun 3];106:545–50. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10973-011-1731-2>
2. Adkins Y, Kelley DS. Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Nutritional Biochemistry* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010 Sep [cited 2013 May 27];21:781–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382009>
3. Rodriguez-Leyva D, Bassett CMC, McCullough R, Pierce GN. The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. *Canadian Journal of Cardiology*

[Internet]. Elsevier; 2010 Nov [cited 2013 Jul 5];26:489–96. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0828282X10704554>

4. Naqshbandi A, Rizwan S, Khan F. Dietary supplementation of flaxseed oil ameliorates the effect of cisplatin on rat kidney. *Journal of Functional Foods* [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 Jul 5];5:316–26. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464612001685>

5. Hsieh C-C, Lin B-F. Dietary factors regulate cytokines in murine models of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011 Nov [cited 2013 Jul 5];11:22–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763466>

6. Balk EM, Lichtenstein AH, Chung M, Kupelnick B, Chew P, Lau J. Effects of omega-3 fatty acids on serum markers of cardiovascular disease risk: a systematic review. *Atherosclerosis* [Internet]. 2006 Nov [cited 2013 Jun 16];189:19–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16530201>

7. Silva AC, Jorge N. Influence of *Lentinus edodes* and *Agaricus blazei* extracts on the prevention of oxidation and retention of tocopherols in soybean oil in an accelerated storage test. *Journal of Food Science and Technology*. 2012 Jan;

8. Barriuso B, Astiasarán I, Ansorena D. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. *European Food Research and Technology* [Internet]. 2012 Nov 7 [cited 2013 Jul 29];236:1–15. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00217-012-1866-9>

9. Ramalho VC, Jorge N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*. 2006;29:755–60.

10. Silva FAM, Borges MFM, Ferreira MA. Methods for the evaluation of the degree of lipid oxidation and the antioxidant activity. *Química Nova*. 1999;22:94–103.

11. Hras AR, Handolin M, Knez Ž, Bauman D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chemistry*. 2000;71:229–33.

12. Brasil. Ministério da Saúde. Comissão nacional de normas e padrões para alimentos. Resolução n. 04/88. In: Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, editor. São Paulo: ABIA; 2001.

13. Brewer MS. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [Internet]. 2011 Jul 14 [cited 2013 Jun 4];10:221–47. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x>

14. Iciek M, Kwiecien I, Wlodek L. Biological properties of garlic and garlic-derived organosulfur compounds. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2009;50:247–65.

15. Corzo-Martínez M, Corzo N, Villamiel M. Biological properties of onions and garlic. Trends in Food Science & Technology [Internet]. 2007 Dec [cited 2013 May 29];18:609–25. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224407002282>
16. Jastrzebski Z, Leontowicz H, Leontowicz M, Namiesnik J, Zachwieja Z, Barton H, et al. The bioactivity of processed garlic (*Allium sativum* L.) as shown in vitro and in vivo studies on rats. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association [Internet]. 2007 Sep [cited 2013 Jun 5];45:1626–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17408832>
17. Lee J, Gupta S, Huang J-S, Jayathilaka LP, Lee B-S. HPLC-MTT assay: anticancer activity of aqueous garlic extract is from allicin. Analytical biochemistry [Internet]. Elsevier Inc.; 2013 May 15 [cited 2013 Jun 2];436:187–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23416182>
18. Cervantes MI, Balderas PM de O, Gutiérrez-Baños J de J, Orozco-Ibarra M, Fernández-Rojas B, Medina-Campos ON, et al. Comparison of antioxidant activity of hydroethanolic fresh and aged garlic extracts and their effects on cerebral ischemia. Food Chemistry [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;140:343–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.02.053>
19. Naznin MT, Maeda T, Morita N. Antioxidant Functions of E - AND Z -Ajoene Derived from Japanese Garlic. International Journal of Food Properties [Internet]. 2010 Jun 30 [cited 2012 Dec 23];13:821–9. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10942910902895218>
20. Silva EYY, Moretti CL, Mattos LM. Compostos funcionais presentes em bulbilhos de alhos armazenados sob refrigeração, provenientes de cultivos no Brasil e na China. Ciência Rural. 2010;40:2580–7.
21. Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. American Journal of Enology and Viticulture. 1977;28:49–55.
22. Epaminondas PS, Araújo KLG V., Souza AL, Silva MCD, Queiroz N, Souza AL, et al. Influence of toasting on the nutritious and thermal properties of flaxseed. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry [Internet]. 2011 May 21 [cited 2013 Jun 3];106:551–5. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10973-011-1638-y>
23. American Oil Chemists Society. Official methods and recommended practices of the AOCS: fats, oils and lipid related analytical methods. 6th ed. Firestone D, editor. AOCS Press; 2009.
24. Wongsap P, Chaiwarit J, Zamaludien A. In vitro screening of phenolic compounds, potential inhibition against α -amylase and α -glucosidase of culinary herbs in Thailand. Food Chemistry [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Apr [cited 2012 Dec 23];131:964–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611013653>
25. Queiroz YS, Ishimoto EY, Bastos DHM, Sampaio GR, Torres E a. FS. Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: In vitro antioxidant activity. Food Chemistry

[Internet]. Elsevier Ltd; 2009 Jul [cited 2012 Dec 23];115:371–4. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814608014374>

26. Michiels JA, Kevers C, Pincemail J, Defraigne JO, Dommes J. Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. Food Chemistry [Internet]. Elsevier Ltd; 2012 Feb [cited 2013 May 23];130:986–93. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611010934>

27. Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos: Uma breve revisão. Revista do Instituto Adolfo Lutz. 2007;66:1–9.

28. Chung LY. The antioxidant properties of garlic compounds: allyl cysteine, alliin, allicin, and allyl disulfide. Journal of Medicinal Food [Internet]. 2006 [cited 2013 Jul 14];9:205–13. Available from: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/jmf.2006.9.205>

29. Nascimento J a., Araújo KLG V., Epaminondas PS, Souza AS, Magnani M, Souza AL, et al. Ethanolic extracts of *Moringa oleifera* Lam.: Evaluation of its potential as an antioxidant additive for fish oil. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry [Internet]. 2013 Mar 13 [cited 2013 Jun 3];112. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10973-013-3045-z>

30. Santos NA, Cordeiro AMTM, Damasceno SS, Aguiar RT, Rosenhaim R, Carvalho Filho JR, et al. Commercial antioxidants and thermal stability evaluations. Fuel. Elsevier Ltd; 2012 Feb;97:638–43.

31. Vecchio S, Campanella L, Nuccilli a., Tomassetti M. Kinetic study of thermal breakdown of triglycerides contained in extra-virgin olive oil. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry [Internet]. 2008 Feb 2;91:51–6. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10973-007-8373-4>

32. Vecchio S, Cerretani L, Bendini A, Chiavaro E. Thermal decomposition study of monovarietal extra virgin olive oil by simultaneous thermogravimetry/differential scanning calorimetry: relation with chemical composition. Journal of agricultural and food chemistry [Internet]. 2009 Jun 10 [cited 2013 Jul 25];57:4793–800. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19489623>

33. Fonseca MM, Yoshida MI. Thermal analysis of raw and aged linseed oil. Vértices. 2009;11:61–75.

34. Araújo KLG V., Epaminondas PS, Silva MCD, Lima a. E a., Rosenhaim R, Maia a. S, et al. Influence of thermal degradation in the physicochemical properties of fish oil. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry [Internet]. 2011 Feb 27 [cited 2013 Jun 3];106:557–61. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10973-011-1409-9>

35. Araújo S V., Luna FMT, Rola Jr. EM, Azevedo DCS, Cavalcante Jr. CL. A rapid method for evaluation of the oxidation stability of castor oil FAME: influence of antioxidant type and concentration. Fuel Processing Technology [Internet]. Elsevier B.V.; 2009 Oct [cited 2013 Aug 19];90:1272–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378382009001799>

36. Ramalho EFSM, Albuquerque AR, Souza AL, Barro AK, Maia AS, Santos IMG, et al. Use of different techniques in the evaluation of the oxidative stability of poultry fat biodiesel. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* [Internet]. 2011 Apr 16 [cited 2013 Aug 19];106:787–91. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10973-011-1545-2>
37. Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Goran A, Igic R. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry* [Internet]. 2008 Dec 15 [cited 2013 May 23];111:925–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881460800530X>
38. Ide N, Lau BH, Ryu K, Matsuura H, Itakura Y. Antioxidant effects of fructosyl arginine, a Maillard reaction product in aged garlic extract. *The Journal of nutritional biochemistry* [Internet]. 1999 Jun;10:372–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15539313>
39. Kim J-S, Kang O-J, Gweon O-C. Comparison of phenolic acids and flavonoids in black garlic at different thermal processing steps. *Journal of Functional Foods* [Internet]. 2013 Jan [cited 2013 May 23];5:80–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464612001181>
40. Xu G, Ye X, Chen J, Liu D. Effect of heat treatment on the phenolic compounds and antioxidant capacity of citrus peel extract. *Journal of agricultural and food chemistry* [Internet]. 2007 Jan 24;55:330–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17227062>

Avaliação da atividade antioxidante de extratos de chá verde e gengibre sobre o óleo de linhaça, durante armazenamento em estufa

Poliana S. Epaminondas^{a,b*}, Kassandra L. G. V. Araújo^a, Jaqueline A. Nascimento^a, Alline L. Souza^{a,d}, Raul Rosenhaim^{c,e}, Antonio G. Souza^c

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CT, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58051-970, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

^b Unidade Acadêmica de Tecnologia de Alimentos e Agroindústria, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFPB), 58800-970, Campus Sousa, Sousa - Paraíba, Brasil.

^c Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM), Departamento de Química, CCEN, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58059-900, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

^d Laboratório de Físico-química, Departamento de Tecnologia de Alimentos, CTDR, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58055-000, Campus V, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

^e Departamento de Engenharia Química, CT, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58051-970, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

* Autor correspondente: Tel/Fax: + 55 83 3216 7441.

Endereço eletrônico: polis.epaminondas@yahoo.com.br (P. S. Epaminondas).

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o poder antioxidante dos extratos de *Camellia sinensis* L. *Zingiber officinale* R. e seu comportamento perante a estabilidade do óleo de linhaça, sob armazenamento acelerado. O teor de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu), a atividade antioxidante (Atividade sequestrante do radical DPPH[•], poder antioxidante de redução do ferro – FRAP e Sistema β -Caroteno/ ácido linoleico) e a estabilidade térmica (Termogravimetria) de extratos etanólicos e metanol/ acetônico de chá verde (EEGT/ MAEGT, respectivamente) e gengibre (EEGG/ MAEGG, respectivamente) foram previamente comparados. O efeito de EEGT e EEGG, associados ou não a Terc-butil-hidroquinona (TBHQ) ou butil-hidroxitolueno (BHT), sobre a estabilidade oxidativa do óleo

de linhaça, foi avaliado, durante estocagem em estufa a 60 °C por 16 dias. A cada quatro dias, os teores de peróxido, anisidina, Totox, dienos e trienos conjugados foram investigados. Os resultados mostraram que EEGT e MAEGT foram superiores a EEGG e MAEGG quanto à estabilidade térmica, ao teor de fenólicos totais e à atividade antioxidante por DPPH e FRAP. Apesar de inibirem a peroxidação lipídica *in vitro*, EEGT e EEGG, adicionados isoladamente ao óleo de linhaça, foram pró-oxidantes, exceto quando associados sinergicamente ao antioxidante sintético TBHQ, apresentando estabilidade oxidativa até o 4º dia de armazenamento, segundo o valor Totox descrito. Diante da efetividade antioxidante dos extratos naturais avaliados e do efeito sinérgico com o TBHQ, sugere-se a viabilidade de utilização de EEGT e EEGG como substitutos parciais alternativos de antioxidantes sintéticos.

Palavras-chave: *Camellia sinensis* L., *Zingiber officinale* R., antioxidantes, sinergismo, estabilidade oxidativa, estocagem em estufa.

1. Introdução

A linhaça (*Linum usitatissimum* L.), fonte de fibras, proteínas, vitaminas e minerais, além de ligninas e outros compostos fenólicos (Epaminondas, Araújo, Souza, et al., 2011), apresenta em sua constituição um óleo rico em ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) (62 %), especialmente o ômega-3 alfa-linolênico (ALA) (43%) (Epaminondas, Araújo, Nascimento, et al., 2011), responsável pelo efeito anti-inflamatório, que reduz o risco de doenças cardiovasculares (Adkins & Kelley, 2010; Rodriguez-Leyva, Bassett, McCullough, & Pierce, 2010), doenças autoimunes (Hsieh & Lin, 2011) e carcinomas (Naqshbandi, Rizwan, & Khan, 2013). Apesar de trazer benefícios à saúde, a presença de PUFA torna o óleo de linhaça susceptível a processos oxidativos durante o processamento e a estocagem (Ramalho & Jorge, 2006), sendo a prevenção ou a atenuação desses processos um dos grandes desafios enfrentados pela indústria de óleos comestíveis (Arain, Sherazi, Bhanger, Talpur, & Mahesar, 2009).

Como consequência, tem surgido uma série de estudos para avaliar o potencial antioxidante de vários compostos (El-Batoty, Abd El-Baky, Farag, & Saleh, 2010; El-Ghorab, Nauman, Anjum, Hussain, & Nadeem, 2010; Maizura, Aminah, & Wan Aida, 2011; Oh, Jo, Cho, Kim, & Han, 2013; Perumalla & Hettiarachchy, 2011) e para se conhecer a concentração adequada, a influência do sistema lipídico (Gramza & Korczak, 2005) e da temperatura,

existindo também forte tendência de substituição ou de redução do uso dos antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais (Cordeiro et al., 2012; Nascimento et al., 2013), visto que pesquisas têm demonstrado a possibilidade de compostos sintéticos apresentarem algum efeito tóxico (Ramalho & Jorge, 2006).

Extratos naturais de matrizes alimentares diversas, constituídos de ácidos fenólicos, flavonoides, ácido ascórbico, carotenoides, tocoferóis, entre outros, são uma alternativa genuinamente capaz de combater radicais livres e impedir a oxidação, sem ocasionar danos à saúde humana (Brewer, 2011; Michotte et al., 2011; Sun-Waterhouse, Thakorlal, & Zhou, 2011).

O chá verde, obtido a partir das folhas frescas de *C. sinensis* não fermentadas, é constituído especialmente de polifenóis do tipo catequinas (Matsubara & Rodriguez-Amaya, 2006), enquanto que os rizomas de gengibre (*Z. officinale* R.) apresentam principalmente polifenóis do tipo gingeróis, zingeronas, shagaóis e diaril-heptanoides (Peng et al., 2012), que garantem a estes alimentos funcionais propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticarcinogênica, imunoestimulatória, hipoglicêmica e hipocolesterolêmica (El-Batoty et al., 2010; Peng et al., 2012; Tao et al., 2008). A atividade antioxidante, entretanto, merece destaque, uma vez que esses polifenóis atuam sequestrando radicais livres ou quelando metais (ferro e cobre), impedindo assim a formação de radicais livres, desencadeantes da maioria das doenças crônico-degenerativas (Senger, Schwanke, & Gottlieb, 2010) e responsáveis pela oxidação lipídica em alimentos. Essas peculiaridades possibilitam a utilização de extratos destes e de outros vegetais como aditivos naturais antioxidantes (Andreo & Jorge, 2007; Perumalla & Hettiarachchy, 2011).

Considerando o chá verde e o gengibre como fontes naturais de compostos antioxidantes, o objetivo deste estudo foi comparar o teor de fenólicos e a atividade antioxidante de extratos etanólicos e metanol/ acetônicos de chá verde e gengibre, por métodos diversos, além de avaliar a viabilidade de utilização dos extratos etanólicos como possíveis substitutos parciais ou totais de antioxidantes sintéticos, mediante a avaliação do comportamento oxidativo do óleo de linhaça aditivado com tais extratos.

2. Materiais e métodos

2.1 Materiais

Óleo de linhaça dourada prensado a frio, sem adição de antioxidantes (Cisbra Group[®]), folhas selecionadas de chá verde (*C. sinensis*) e rizomas de gengibre (*Z. officinale*) foram adquiridos no comércio local de João Pessoa/PB, Brasil. Os reagentes BHT, TBHQ, 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH), tween[®] 40, ácido linoleico, 2,4,6-Tris (2-piridil)-s-triazina (TPTZ), p-anisidina, foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Folin-Ciocalteu, ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico (ácido gálico), β -caroteno, cloreto férrico heptahidratado, sulfato ferroso hepta-hidratado e demais reagentes e solventes foram obtidos na Merck (Dusseldorf, Germany).

2.2 Preparação dos extratos

As folhas de chá verde foram moídas em processador doméstico, peneiradas e reservadas até a elaboração dos extratos. Os rizomas de gengibre foram lavados, descascados manualmente, fatiados e submetidos à secagem a 40 °C por 24 hs em estufa de ar circulante, sendo então triturados, peneirados e reservados até o momento da elaboração dos extratos.

Os extratos etanólicos (EE) de chá verde (EEGT) e de gengibre (EEGG) foram obtidos a partir de 10 g do alimento triturado, misturados a 40 mL de etanol e homogeneizados em banho termostatizado a 25 °C, sob agitação por 2 horas. Para a obtenção dos extratos metanol/acetônicos (MAE), o mesmo procedimento foi realizado, utilizando-se, porém, 40 mL de uma solução de metanol e acetona (1:1) (v/v), constituindo os extratos metanol/acetônicos de chá verde (MAEGT) e de gengibre (MAEGG).

Após a centrifugação (5000 rpm/ 20 minutos), filtração do sobrenadante e aferição em balão de 100 mL com etanol, os extratos obtidos foram acondicionados em frasco âmbar em atmosfera inerte, a -18 °C, até a utilização. Para determinar o rendimento em matéria seca, 1 mL dos extratos, em triplicata, foram acondicionados em béqueres previamente secos e pesados, sendo mantidos em estufa a 105 °C, até peso constante. O resultado do rendimento foi expresso em valor percentual (g de extrato por 100 g da matriz alimentícia).

2.3. Determinação do conteúdo de fenólicos totais

O conteúdo de fenólicos totais (TPC) dos extratos etanólico e metanol/ acetônico de chá verde e gengibre foi estimado colorimetricamente, utilizando-se o método Folin-Ciocalteu (Slinkard & Singleton, 1977). Aliquotas de 4 mL de EEGT, MAEGT, EEGG e MAEGG, diluídas em água, foram adicionadas de 0.25 mL do reagente Folin-Ciocalteu, seguidos, após 8 minutos de intervalo, da adição de 0.75 mL de carbonato de sódio a 20%. Após agitação, o sistema foi mantido em ambiente escuro por duas horas. A leitura da absorbância das amostras foi realizada em espectrofotômetro UV-vis (model UV-2550, Shimadzu), a 765 nm, utilizando-se água, com os mesmos reagentes supracitados, como controle. Uma curva de calibração do padrão ácido gálico (50-500 mg.L⁻¹) foi obtida para expressar os resultados em média $\pm$ desvio padrão de equivalente de ácido gálico (mg GAE.g⁻¹ extrato seco e mg GAE.g⁻¹ do alimento desidratado). TPC foi também estimado para os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT.

2.4. Atividade sequestrante do radical 2,2'-difeníl- β -picrilidrazil (RSA-DPPH)

A capacidade sequestrante de radical (RSA) por parte das amostras EEGT, MAEGT, EEGG, MAEGG, TBHQ e BHT foi avaliada, utilizando-se o método RSA-DPPH (Blois, 1958), com modificações (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995). Aliquotas de 3.0 mL dos extratos e dos antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT, em diferentes diluições e em triplicata, foram adicionados de 0.1 mL de solução etanólica de DPPH, à concentração de 0.1 mol.L⁻¹. Para cada diluição, fez-se um controle, utilizando-se 3.0 mL de amostra adicionados de 0.1 mL de etanol. O controle negativo consistiu em 3.0 mL de etanol com 0.1 mL da solução de DPPH. O decréscimo da absorbância à 515 nm foi mensurado em espectrofotômetro UV-vis (modelo UV-2550, Shimadzu), após 120 min em ambiente escuro. RSA-DPPH foi calculado utilizando-se a equação:

$$\text{RSA-DPPH (\%)} = \left[\left(1 - \frac{A_a - A_b}{A_c} \right) \times 100 \right]$$

em que A_a é a absorbância das amostras, A_b é a absorbância do controle das amostras de cada extrato e A_c é a absorbância do controle negativo.

Os resultados obtidos foram correlacionados com as respectivas diluições de extrato/antioxidante sintético ($\mu\text{g.mL}^{-1}$). O EC_{50} (concentração da amostra capaz de reduzir 50% do $\text{DPPH}^\bullet$ inicial) foi calculado substituindo o valor de y da equação da reta por 50. A eficiência antirradicalar foi determinada pela relação inversa do EC_{50} , em mg.mL^{-1} (EC_{50}^{-1}).

2.5. Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

A atividade antioxidante dos extratos e dos compostos sintéticos TBHQ e BHT, quanto ao poder antioxidante de redução do ferro, foi determinada pelo ensaio FRAP (Benzie & Strain, 1996), com modificações (Pulido, Bravo, & Saura-Calixto, 2000). Alíquotas de 2.7 mL de reagente FRAP, recém-preparado (TPTZ 10 mM, FeCl_3 20 mM e tampão acetato), foram homogeneizadas com 90 μL de cada amostra estudada e 270 μL de água destilada. Após manter as amostras em banho termostatizado a 37 °C por 30 minutos, as absorbâncias a 595 nm foram estimadas, utilizando o reagente FRAP como controle negativo para calibração do espectrofotômetro UV-vis (modelo UV-2550, Shimadzu). Para a determinação da curva padrão, foram utilizadas concentrações de 500-2000 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão de mmol de sulfato ferroso por g de amostra.

2.6. Sistema β -Caroteno/ ácido linoleico

A atividade antioxidante das amostras estudadas foi também avaliada pelo sistema β -caroteno/ ácido linoleico (Marco, 1968), com modificações (Miller, 1971). As soluções foram preparadas misturando-se 5 mL da solução sistema β -caroteno/ ácido linoleico (40 μL de ácido linoleico, 530 μL de Tween 40, 50 μL de solução β -caroteno 20 mg.mL^{-1} , 1mL clorofórmio) e 0.4 mL de cada extrato/ antioxidante sintético ou solução de trolox (0.2 mg.mL^{-1}). O controle negativo consistiu de 5 mL da solução sistema de β -caroteno/ ácido linoleico e 0.4 mL de etanol. A absorbância das amostras a 470 nm (espectrofotômetro UV-vis, modelo UV-2550, Shimadzu) foi lida no tempo inicial e a cada 15 minutos de submissão à temperatura de 40 °C em banho termostatizado, até completar 120 minutos de análise. Os resultados foram expressos como percentagens de inibição da peroxidação (PI %), usando a equação:

$$PI \% = [(1 - \frac{A_i - A_f}{C_i - C_f}) \times 100]$$

em que A_i é a absorvância inicial da amostra, A_f é absorvância final da amostra, C_i é a absorvância inicial do controle e C_f é a absorvância final do controle negativo.

2.7 Avaliação térmica dos extratos

As curvas termogravimétricas (TG) e de Análise Térmica Diferencial (DTA) dos extratos previamente secos (estufa de ar circulante a 40 °C/ 48 h) e do BHT foram obtidas em Analisador Térmico Simultâneo DTA-TG-DTG, modelo H-60, marca Shimadzu. Utilizou-se cerca de 10 mg de cada amostra em cadinho de platina, atmosfera de ar sintético com fluxo de 50 mL.min⁻¹ e aquecimento a 10 °C.min⁻¹ até 700 °C, a partir de análises não-isotérmicas. A temperatura inicial (T_0) da primeira ou da segunda etapa de variação de massa foi utilizada como parâmetro para determinação da estabilidade térmica dos extratos de chá verde e gengibre e do BHT.

2.8 Teste de estocagem acelerada em estufa

Devido ao maior potencial antioxidante em relação aos extratos metanol/ acetônicos, os extratos etanólicos de chá verde e gengibre, além dos antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT, foram utilizados para a aditivação do óleo de linhaça.

EEGT e EEGG (concentração de 100 mg.kg⁻¹, em relação ao seu teor de TPC) foram adicionados separadamente a porções de 20 g de óleo de linhaça dourada, sendo a mistura (óleo + extrato) homogeneizada em agitador magnético por 30 minutos, constituindo as amostras LOGT 100 e LOGG 100. Os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT, adicionados ao óleo de linhaça, na mesma concentração dos extratos, foram utilizados como controles positivos (LOTBHQ 100 e LOBHT 100). O óleo de linhaça sem aditivos (LO) foi considerado o controle negativo. Para avaliar um possível efeito sinérgico, EEGT e EEGG (50 mg.kg⁻¹) foram associados aos antioxidantes sintéticos TBHQ ou BHT (50 mg.kg⁻¹), para a mesma massa de óleo de linhaça, constituindo as amostras LOGT/TBHQ (50/50), LOGG/TBHQ (50/50), LOGT/BHT (50/50) e LOGG/BHT (50/50). As amostras foram estocadas em estufa de circulação de ar à temperatura de 60 ± 2 °C, durante 16 dias. A cada

quatro dias de estocagem, análises de índices de peróxidos e *p*-anisidina, dienos e trienos conjugados foram realizadas.

2.8.1 Índice de peróxido

O índice de peróxido (PV) foi determinado segundo o método Cd 8-53 (AOCS, 2003). Alíquotas de 2 g das amostras de óleo foram dissolvidas em 30 mL de solução de ácido acético/ clorofórmio (3:2 v/v) e adicionadas de 0.5 mL de solução saturada de iodeto de potássio. Após 1 min em repouso, foram adicionados 30 mL de água e 0.5 mL de solução de amido a 1 %. Titulação com solução de tiosulfato de sódio 0,01 N foi realizada, até o desaparecimento da coloração azulada. Uma prova em branco foi conduzida nas mesmas condições, sem a presença da amostra. Os resultados de PV foram obtidos a partir da equação:

$$\text{Índice de peróxido (meq.kg}^{-1}\text{)} = \frac{N \times (V_A - V_B) \times 1000}{P \text{ da amostra (g)}}$$

onde N é a normalidade da solução de Na₂S₂O₃, V_A é o volume da solução de Na₂S₂O₃ consumido pela amostra (mL), V_B é o volume da solução de Na₂S₂O₃ consumido pelo branco (mL) e m é a massa da amostra (g).

2.8.2 Índice de *p*-anisidina

O índice de *p*-anisidina (AV) foi determinado seguindo metodologia Cd 18-90 (AOCS, 2003). Inicialmente, a absorbância de alíquotas de 0.5 g dos óleos, dissolvidas em 25 mL de isooctano, foi medida a 350 nm (espectrofotômetro UV-vis, modelo UV-2550, Shimadzu), utilizando o isooctano como branco. Posteriormente, 5 mL da solução acima descrita foi adicionada de 1 mL de solução de anisidina (*p*-anisidina em ácido acético glacial 0.25 %) e após 10 minutos, procedeu-se nova leitura a 350 nm. AV foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Índice de Anisidina (a. u.)} = \frac{25 (1,2A_s - A_b)}{P}$$

onde A_s é a medida de absorbância da solução gordura-anisidina, A_b é a medida de absorbância da solução de gordura inicial, P é massa da amostra em gramas e a. u. são unidades arbitrárias.

2.8.3 Determinação do Valor Total da Oxidação (Totox)

O valor Totox, que avalia o efetivo estado de conservação do óleo, foi determinado a partir da correlação entre PV e AV, por meio da equação:

$$\text{Valor Totox} = 2(\text{PV}) + (\text{AV})$$

em que PV equivale a índice de peróxido, e AV corresponde ao índice de anisidina.

2.8.4 Determinação do valor de dienos e trienos conjugados

Para a determinação dos valores de dienos conjugados (CD) e de trienos conjugados (CT), utilizou-se o método proposto por Zuta, Simpson, Zhao, & Leclerc (2007), com modificações. Alíquotas de 0.002 g das amostras de óleo com ou sem aditivação foram diluídas para 5 mL com isooctano. A leitura das absorbâncias a 232 nm e a 270 nm, para CD e CT, respectivamente, foi realizada utilizando o isooctano como branco, e os resultados, expressos em percentual de ácido dienoico e trienoico, foram calculados a partir da absorbância e da concentração final da amostra ($\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$), segundo a equação:

$$\text{CD/CT (\%)} = \frac{A_{232/270}}{C \times P}$$

onde A é a absorbância da amostra a 232 ou a 270 nm, para CD ou CT, respectivamente; C é a concentração final da diluição da amostra ($\text{g} \cdot 100 \text{ mL}^{-1}$) e P é o comprimento da célula de medição (cm).

2.9 Análises estatísticas

Os resultados dos ensaios, realizados em triplicata, foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão, sendo comparados por análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, com

auxílio do programa estatístico SigmaStat 3.5, considerando $P < 0.05$. Os gráficos foram elaborados com auxílio dos programas GraphPad Prism 5.0 e OriginPro 8.0.

3. Resultados e discussão

3.1. Conteúdo de fenólicos totais

O rendimento (%) e o TPC em mg GAE.g^{-1} de extrato seco/ antioxidante sintético, e ainda TPC em mg GAE.g^{-1} de chá verde e gengibre desidratados, encontram-se sumarizados, respectivamente, na Tabela 1 e na Figura 1. Extratos e antioxidantes sintéticos avaliados apresentaram a seguinte ordem decrescente de TPC: EEGT $\sim$ MAEGT $>$ TBHQ $>$ BHT $>$ EEGG $>$ MAEGG. Para os extratos de chá verde, não se observou diferença estatística significativa ($p < 0.05$) quanto ao TPC ($483.45 \pm 15.23 \text{ mg GAE.g}^{-1}$ de extrato seco, para EEGT, e $469.28 \pm 17.84 \text{ mg GAE.g}^{-1}$ de extrato seco, para MAEGT), sendo superior, em relação aos antioxidantes sintéticos TBHQ ($373.03 \pm 14.22 \text{ mg GAE.g}^{-1}$) e BHT ($282.08 \pm 0.18 \text{ mg GAE.g}^{-1}$) e aos extratos de gengibre EEGG ($235.49 \pm 1.34 \text{ mg GAE.g}^{-1}$ de extrato seco) e MAEGG ($60.36 \pm 1.90 \text{ mg GAE.g}^{-1}$ de extrato seco) (Tabela 1). O menor rendimento dos extratos metanol/ acetônicos ($3.33 \pm 1.52 \%$, para MAEGT, e $2.33 \pm 0.58 \%$, para MAEGG) quando comparados aos extratos etanólicos ($8.23 \pm 0.40 \%$, para EEGT, e $3.93 \pm 0.15 \%$, para EEGG) mostra, entretanto, uma subestimação do conteúdo de fenólicos nas matrizes alimentícias estudadas, quando o solvente utilizado é a mistura metanol/ acetona ($15.63 \pm 0.59 \text{ mg GAE.g}^{-1}$ de chá verde desidratado, $1.47 \pm 0.12 \text{ mg GAE.g}^{-1}$ de gengibre desidratado), em relação ao etanol ($38.45 \pm 2.48 \text{ mg GAE.g}^{-1}$ de chá verde desidratado, $8.89 \pm 0.64 \text{ mg GAE.g}^{-1}$ de gengibre desidratado) (Figura 1), demonstrando, nesse estudo, a maior eficácia do etanol na extração de compostos fenólicos, em relação à mistura de solventes metanol/ acetona.

Tabela 1 Rendimento, TPC e capacidade antioxidante (RSA-DPPH e FRAP)^{A,B} de extratos de chá verde e gengibre, TBHQ e BHT.

Amostras	Rendimento (%)	TPC (mg GAE . g ⁻¹ D.E.**) ^C	EC ₅₀ (µg.mL ⁻¹)	Eficiência antirradicalar EC ₅₀ ⁻¹ (a. u.)***	FRAP (mmol Fe ²⁺ .g ⁻¹ D.E.**)
EEGT	8.23 ± 0.40 ^a	483.45 ± 15.23 ^a	1.33 ± 0.02 ^e	754.31 ± 8.72 ^b	27.53 ± 1.78 ^b
MAEGT	3.33 ± 1.52 ^b	469.28 ± 17.84 ^a	1.90 ± 0.05 ^d	527.55 ± 12.57 ^c	26.16 ± 1.65 ^b
EEGG	3.93 ± 0.15 ^b	235.49 ± 1.34 ^d	11.47 ± 0.43 ^c	87.30 ± 3.31 ^d	10.97 ± 0.75 ^c
MAEGG	2.33 ± 0.58 ^b	60.36 ± 1.90 ^e	40.50 ± 0.66 ^b	24.70 ± 0.41 ^e	2.45 ± 0.29 ^d
TBHQ	-	373.03 ± 14.22 ^{b*}	1.27 ± 0.01 ^f	784.57 ± 7.76 ^a	30.29 ± 0.10 ^a
BHT	-	282.08 ± 0.18 ^{c*}	67.53 ± 3.20 ^a	14.83 ± 0.70 ^f	0.54 ± 0.05 ^e

^A Valores correspondentes à média ± desvio padrão (n=9).

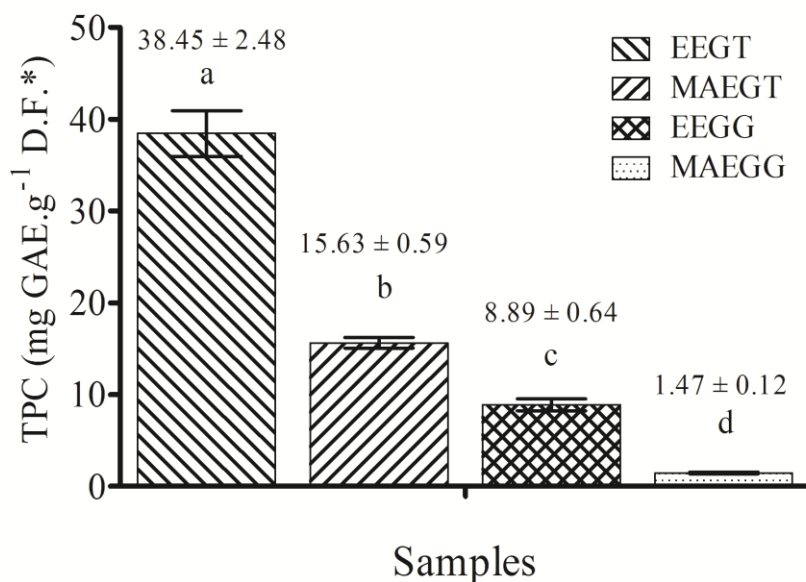
^B Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma coluna diferem significativamente ($p \leq 0.05$), pelo teste de Tukey.

* Teor de fenólicos totais contabilizados como mg de equivalentes de ácido gálico, contidos em 1g de TBHQ/ BHT.

** D. E. – extrato seco.

*** a. u. – unidades arbitrárias.

Figura 1. TPC* em equivalentes de ácido gálico por grama de chá verde e gengibre desidratados.



*Médias seguidas por diferentes letras minúsculas diferem significativamente ($p \leq 0.05$), pelo teste de Tukey.

Chan, Lim e Chew (Chan, Lim, & Chew, 2007), avaliando extratos metanólicos de folhas de *C. sinensis* frescas em diferentes estágios de maturação, pulverizadas com nitrogênio líquido, verificaram que extratos de brotos (76.66 mg GAE.g⁻¹ folhas frescas) e folhas jovens (72.80 mg GAE.g⁻¹ folhas frescas) apresentaram TPC significativamente maiores que folhas maduras (58.36 mg GAE.g⁻¹ folhas frescas), sendo estes resultados superiores aos encontrados neste estudo.

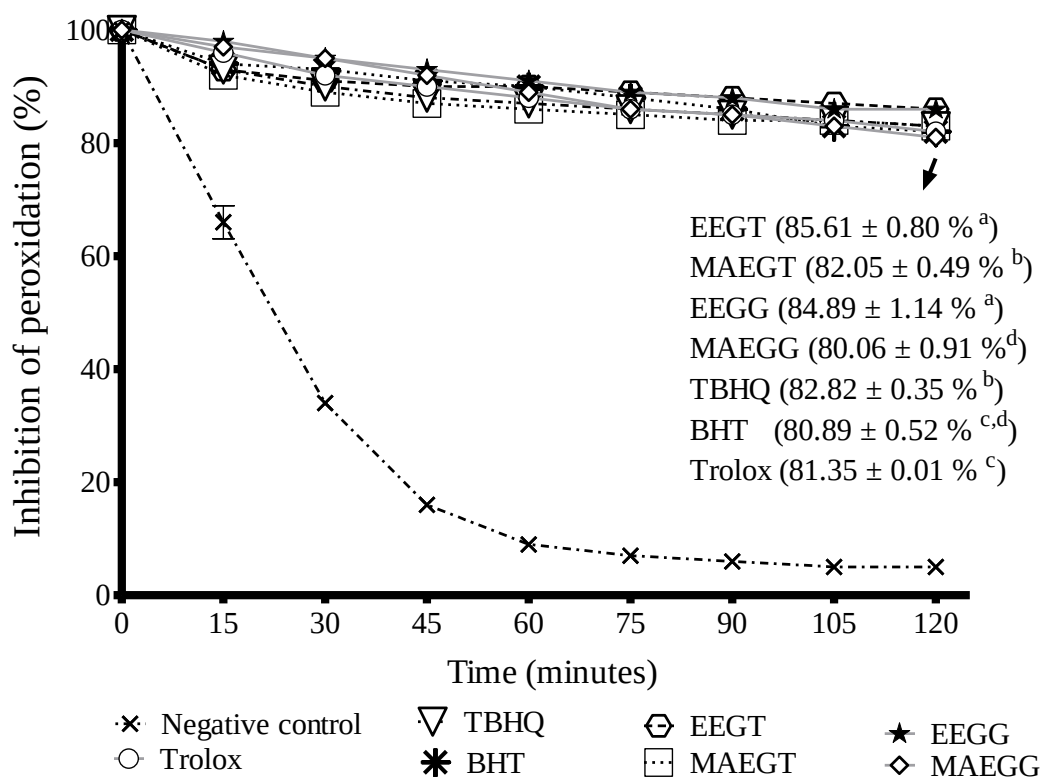
Maizura, Aminah, & Wan Aida (2011) encontraram TPC de 1.02 mg GAE.g⁻¹ de extrato puro de gengibre, obtido a partir de extrator doméstico, sem uso de solventes, sendo esse valor significativamente inferior ao encontrado neste estudo. Ghasemzadeh, Jaafar, & Rahmat (2010), avaliando extratos metanólicos de rizomas de *Z. officinale* das variedades Halia Bentong e Halia Bara, encontraram teores de fenólicos totais de 10.22 mg GAE.g⁻¹ e 13.5 mg GAE.g⁻¹ gengibre seco, respectivamente, superiores aos resultados reportados neste estudo.

Métodos de desidratação e extração, além da composição de solventes, temperatura/ tempo de extração, proporção de solvente para sólido e variedade/ estado de maturação/ parte do vegetal analisada, além do clima, do solo e de métodos de cultivo, podem afetar significativamente o rendimento e o teor de fenólicos de extratos vegetais (Ghasemzadeh et al., 2010; Michiels, Kevers, Pincemail, Defraigne, & Dommès, 2012; Moure et al., 2001).

3.2 Atividade antioxidante

Extratos de chá verde e gengibre, além dos compostos sintéticos de referência TBHQ e BHT, foram avaliados quanto à atividade sequestradora de radicais livres (RSA-DPPH[•]), ao poder de redução do ferro (FRAP) (Tabela 1) e à proteção contra a peroxidação lipídica (sistema β -caroteno/ ácido linoleico) (Figura 2), para analisar o comportamento de compostos antioxidantes perante diferentes métodos de detecção.

Figura 2. Cinética de descoloração do sistema β -caroteno-ácido linoleico: proteção contra peroxidação lipídica por ação dos extratos de chá verde e gengibre*, comparados aos controles positivos (TBHQ, BHT e Trolox) e negativo.



* Extratos com concentração de 0.2 mg.mL^{-1} em relação a TPC.

Os extratos e os compostos sintéticos analisados apresentaram correlação quanto aos resultados de atividade antirradicalar (EC_{50}^{-1} , determinada a partir da técnica RSA-DPPH) e de FRAP, onde $TBHQ > EEGT > MAEGT > EEGG > MAEGG > BHT$, para ambas as técnicas. Extratos etanólicos demonstraram menor EC_{50} ($1.33 \pm 0.02 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, para EEGT, e $11.47 \pm 0.43 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, para EEGG), maior atividade antirradicalar ($754.31 \pm 8.72 \text{ u.a.}$, para EEGT, e $87.30 \pm 3.31 \text{ u.a.}$, para EEGG) e maior FRAP ($27.53 \pm 1.78 \text{ mmol Fe}^{2+}.\text{g}^{-1}$ de EEGT, e $10.97 \pm 0.75 \text{ mmol Fe}^{2+}.\text{g}^{-1}$ de EEGG), em relação aos extratos metanol/ acetônicos MAEGT ($1.90 \pm 0.05 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, $527.55 \pm 12.57 \text{ u.a.}$ e $26.16 \pm 1.65 \text{ mmol Fe}^{2+}.\text{g}^{-1}$, respectivamente) e MAEGG ($40.50 \pm 0.66 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, $24.70 \pm 0.41 \text{ u.a.}$ e $2.45 \pm 0.29 \text{ mmol Fe}^{2+}.\text{g}^{-1}$, respectivamente), com destaque para EEGT, que apresentou resultados próximos ao TBHQ ($1.27 \pm 0.01 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, $784.57 \pm 7.76 \text{ u.a.}$ e $30.29 \pm 0.10 \text{ mmol Fe}^{2+}.\text{g}^{-1}$, respectivamente). Estes resultados estiveram de acordo com o teor de fenólicos apresentado, demonstrando serem estes compostos os principais responsáveis pela atividade antioxidante dos referidos extratos. Os compostos fenólicos presentes no chá verde têm sido considerados eficazes sequestrantes de radicais livres, devido à capacidade de atuação como doadores de

hidrogênio ou doadores de elétrons (Higdon & Frei, 2003), graças à presença de uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel aromático em sua estrutura química (Oh et al., 2013).

A cinética de descoloração do sistema β -caroteno/ ácido linoleico foi utilizada para avaliar a capacidade dos extratos e compostos sintéticos de referência na proteção contra a peroxidação lipídica. Observando-se a curva de descoloração do β -caroteno (Figura 2), é possível constatar que todos os extratos e compostos de referência (TBHQ, BHT e Trolox) avaliados apresentaram boa capacidade antioxidante, mostrando-se eficazes quanto à inibição da peroxidação do ácido linoleico, em comparação com o controle negativo (branco). Apesar de apresentarem um perfil cinético semelhante durante os 120 minutos de análise, as amostras apresentaram pequena diferença estatística (< 0.05), atuando na seguinte ordem de proteção: EEGT $\sim$ EEGG $>$ TBHQ $\sim$ MAEGT $>$ Trolox $>$ BHT $\sim$ MAEGT $\sim$ MAEGG.

Os extratos etanólicos EEGT ($85.61 \pm 0.80\%$) e EEGG ($84.89 \pm 1.14\%$) foram mais eficazes quanto à proteção do ácido linoleico em relação a MAEGT ($82.05 \pm 0.49\%$) e aos compostos de referência TBHQ ($82.82 \pm 0.35\%$) e Trolox ($81.35 \pm 0.01\%$). MAEGG ($80.06 \pm 0.91\%$) apresentou comportamento semelhante ao BHT ($80.89 \pm 0.52\%$), demonstrando menor atividade antioxidante diante da peroxidação do ácido linoleico. A proteção contra a peroxidação lipídica por parte dos extratos deve-se à presença de compostos fenólicos antioxidantes, presentes abundantemente tanto no chá verde quanto no gengibre. A alta capacidade antioxidante do chá verde pode ser atribuída à presença de catequinas, especialmente as do tipo epigallocatequina galato (EGCG), epigallocatequina (EGC), epicatequina galato (ECG), epicatequina (EC) e catequina (C) (Camargo, Daguer, & Barbosa, 2006), que são compostos flavonoides abundantes nos extratos de chá verde, representando 68% de sua atividade antioxidante (Oh et al., 2013). Peng et al. (2012) avaliaram doze compostos fenólicos extraídos do gengibre fresco e verificaram que vários desses compostos isolados, em especial os gingeróis, zingeronas, shagaóis e diaril-heptanoides, apresentaram alto potencial antioxidante e propriedades citotóxicas a baixas concentrações contra células cancerígenas.

Kaur & Kapoor (2002) demonstraram capacidade de inibição da peroxidação lipídica de 71.8% e 65%, para extratos etanólicos e aquosos de gengibre, assim como El-Batoty, Abd El-Baky, Farag, & Saleh (2010) descreveram 65% de atividade inibitória da peroxidação para óleo essencial de gengibre, sendo os valores de ambos os estudos inferiores aos descritos nesta pesquisa. A epigallocatequina galato (EGCG) pura, isolada do chá verde, apresentou capacidade de inibição da peroxidação de 85.4%, semelhante ao percentual de inibição exibido pelo extrato etanólico de chá verde (Unten, Koketsu, & Kim, 1997).

Os compostos antioxidantes podem responder de diferentes formas a fontes variadas de radicais ou agentes oxidantes. Por se tratarem de matrizes de complexa composição, é recomendado que alimentos de origem vegetal sejam avaliados quanto a sua capacidade antioxidante por diversos métodos *in vitro* de detecção, para a obtenção de dados relevantes (Bozin, Mimica-Dukic, Samojlik, Goran, & Igic, 2008; Prior, Wu, & Schaich, 2005).

3.3 Avaliação térmica dos extratos

As curvas TG e DTA do BHT e dos extratos de chá verde e gengibre são apresentadas na Figura 3 e os dados obtidos a partir destas curvas encontram-se sumarizados na Tabela 2.

EEGT, MAEGT, EEGG e MAEGG mostraram-se termicamente estáveis até o início da segunda etapa de perda de massa, apresentando termorresistência de 111 °C, 110 °C, 96 °C e 63 °C, respectivamente (Tabela 2, Figura 3a). A perda de massa inicial de 3.1 %, 2.7 % e 2.6 %, para as três primeiras amostras, respectivamente, caracteriza um evento endotérmico, descrito pela curva DTA (Figura 3b), que pode ser atribuído à perda de umidade e solventes residuais. MAEGG apresentou comportamento diferenciado em relação às demais amostras, demonstrando fragilidade térmica, com intensa perda de 16.3 % de massa inicial. Isto pode estar relacionado à maior volatilização/ decomposição de antioxidantes pouco estáveis na primeira etapa, além da perda de umidade e de solventes residuais. Complexos antioxidantes de baixa estabilidade podem ser facilmente degradados, perdendo o poder antioxidante ou atuando como pró-oxidantes.

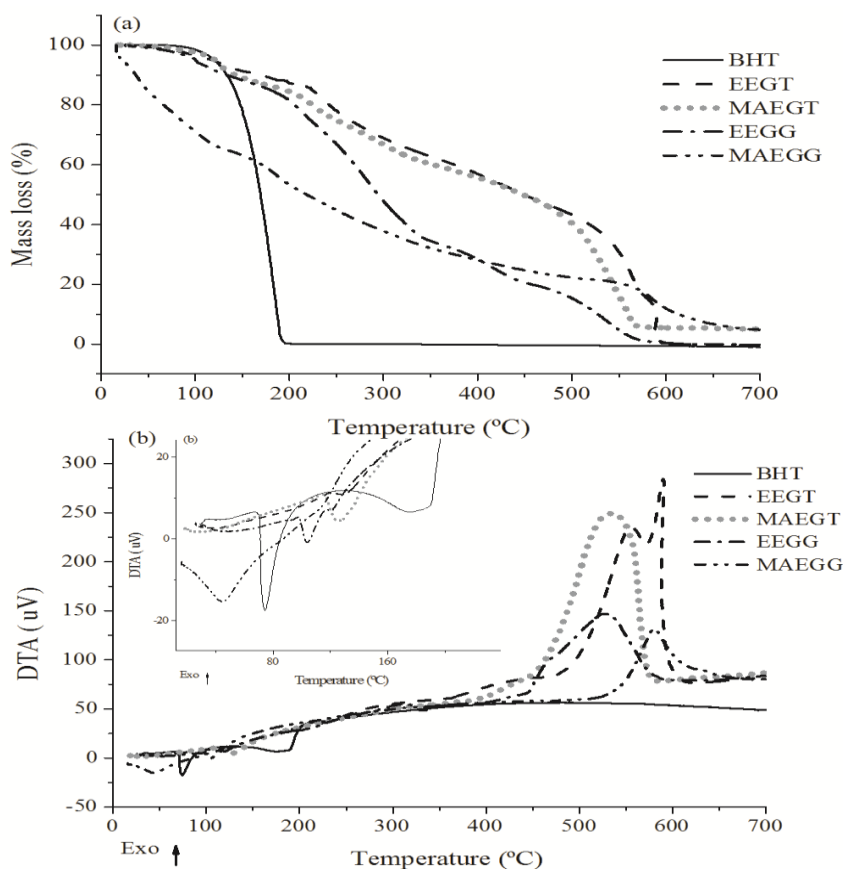
Os demais eventos endotérmicos observados a partir da curva DTA (Figura 3b) dos extratos podem ser atribuídos à volatilização dos compostos bioativos antioxidantes e outros compostos mais estáveis (Cordeiro et al., 2012). Os eventos exotérmicos podem estar relacionados à oxidação de compostos de natureza lipídica, à decomposição e à combustão de da matéria orgânica contida nos extratos. A massa residual (0.5%, 5.0%, 0.2% e 4.9%, respectivamente) corresponde aos materiais inorgânicos remanescentes.

Tabela 2 Dados referentes às curvas TG e DTA dos extratos de alho e BHT.

TG -				DTA	
Não-isotérmicas					
	Etapas	T _i ^a – T _f ^b / °C	Δm ^c / %	Transição	T/ °C
BHT	1 st	71 – 209	99	Endo	75
				Endo	175
	Residuo	-	1.0	-	-
EEGT	1 st	68 -111	3.1	Endo	77
	2 nd	111 – 162	5.2	Endo	131
	3 rd	162 – 223	4.9	Endo	180
	4 th	223 – 387	27.0	Exo	268
	5 th	387 – 510	17.0	Exo	438
	6 th	510 – 570	22.5	Exo	555
	7 th	570 – 623	19.0	Exo	591
	Residuo	-	0.5	-	-
MAEGT	1 st	60 – 110	2.7	Endo	81
	2 nd	110 – 181	10.4	Endo	127
	3 rd	181 – 255	12.2	Exo	220
	4 th	255 – 470	27.2	Exo	310
	5 th	470 – 581	41.2	Exo	535
	Residuo	-	5.0	-	-
EEGG	1 st	64 – 96	2.6	Endo	74
	2 nd	96 – 113	3.1	Endo	105
	3 rd	113 – 172	3.8	Endo	120
	4 th	172 – 230	13.3	Endo	217
	5 th	230 – 314	29.8	Endo	283
	6 th	314 – 351	8.5	Endo	333
	7 th	351 – 448	13.6	Endo	411
	8 th	448 – 592	20.3	Exo	526
	Residuo	-	0.2	-	-
MAEGG	1 st	25- 63	16.3	Endo	42
	2 nd	63 – 133	15.5	Endo	110
	3 rd	133 – 523	43.4	Exo	340
	4 th	523 – 700	16.7	Exo	581
	Residuo	-	4.9	-	-

^a Temperatura inicial; ^b Temperatura final; ^c Perda de massa.

Figura 3. Curvas TG (a) e DTA (b) dos extratos de chá verde e gengibre e do BHT.



BHT apresentou 71 °C de estabilidade térmica, 99% de perda de massa e 1.0% de resíduos, demonstrando uma única etapa de degradação. Duas transições endotérmicas puderam ser observadas por meio da curva DTA (Figura 3b), sendo a primeira relacionada à fusão de antioxidantes, sem variação de massa, e a segunda, à volatilização/ decomposição dos mesmos, estando de acordo com os resultados observados por Santos et al. (2012).

Nascimento et al. (2013) descreveram uma variação de estabilidade térmica de 66 a 83 °C, para extratos etanólicos de folhas, flores e vagens de *Moringa oleífera* L., enquanto que Cordeiro et al. (2012) demonstraram que o extrato etanólico de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) pode ser termoestável até 190 °C.

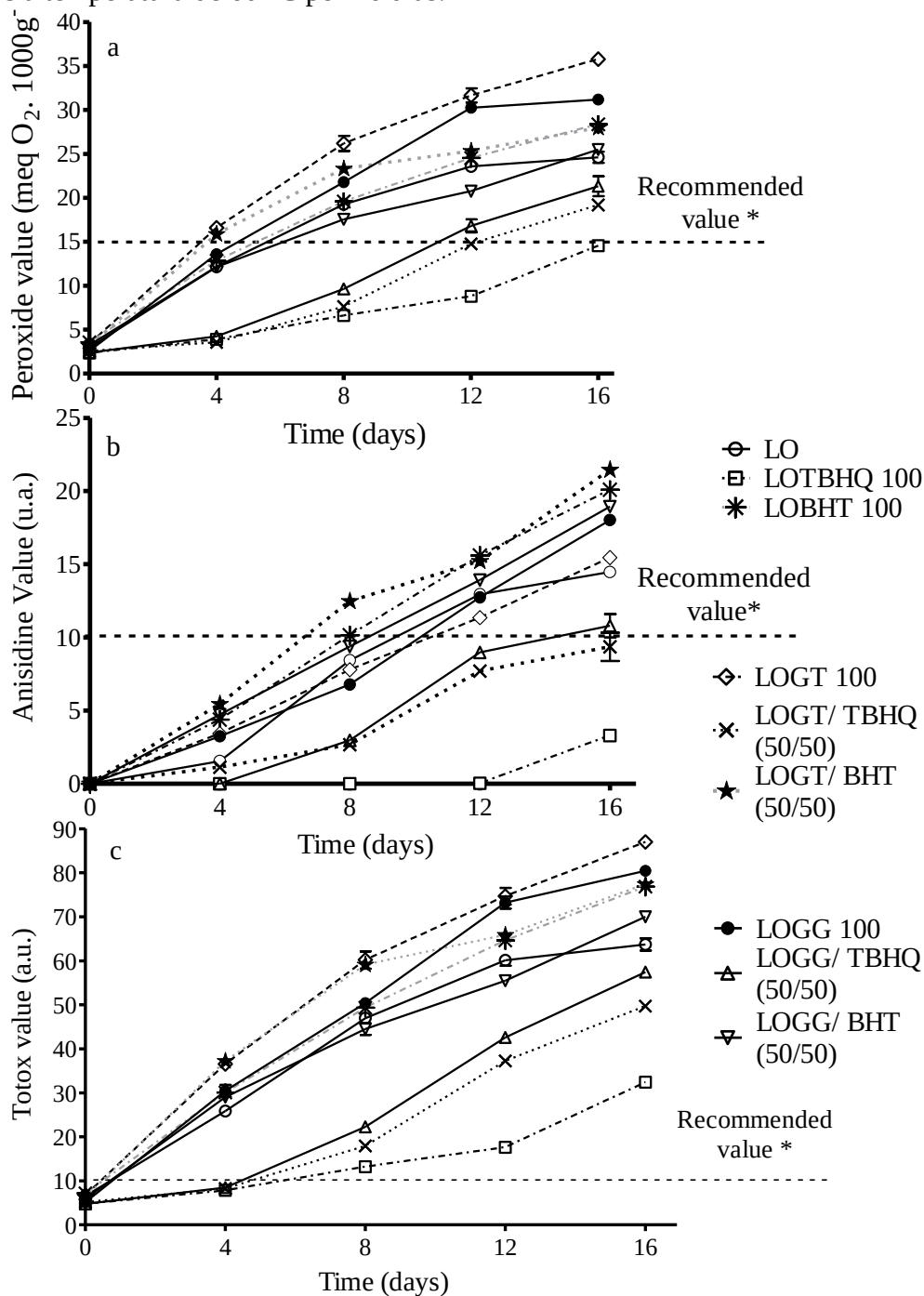
3.4 Teste de estocagem em estufa

3.4.1 PV, AV e Valor Totox

As Figuras 4a e 4b ilustram, respectivamente, o comportamento do óleo de linhaça aditivado com extratos e/ ou antioxidantes sintéticos, diante da progressão da oxidação

primária (peróxidos e hidroperóxidos), representada por PV, e secundária (cetonas, aldeídos), expressa por AV, ao longo de 16 dias de armazenamento em estufa. A correlação entre estes índices é demonstrada na Figura 4c, por meio do Valor Totox, que representa efetivamente o estado de conservação das amostras estudadas.

Figura 4. Alterações do índice de peróxidos (PV) (a), do índice de anisidina (AV) (b) e do valor Totox (c) de amostras de óleo de linhaça com ou sem aditivos naturais e/ ou sintéticos, estocados à temperatura de 60 °C por 16 dias.



As amostras de óleo de linhaça isoladamente aditivadas com BHT (LOBHT 100) e com os extratos etanólicos de chá verde (LOGT 100) e gengibre (LOGG 100) apresentaram PV, AV e valor Totox superiores aos detectados para o controle (LO), durante a maior parte do período de armazenamento, demonstrando um efeito pró-oxidante dos mesmos sobre o óleo de linhaça (Figuras 4a e 4b e 4c), diante da estocagem acelerada em estufa a 60 °C. Apesar da alta estabilidade térmica e do elevado teor de fenólicos totais, demonstrados neste estudo para os extratos avaliados, a presença de clorofilas e derivados, ou ainda de metais pró-oxidantes, como ferro e cobre, podem justificar o efeito negativo destes extratos adicionados isoladamente ao óleo de linhaça.

Antioxidantes naturalmente presentes nos vegetais ou adicionados a alimentos (propil galato, flavonoides, tocoferóis, quercetina, ácido carnósico, carnosol, catequinas, epicatequinas, vitamina C) podem interagir com os nutrientes constituintes da matriz alimentar, ocasionando danos *in vitro* aos componentes lipídicos, proteicos e ao DNA, decorrentes da formação de radicais livres, podendo atuar como pró-oxidantes (Aruoma, 1996). A decomposição das clorofilas em meios de reação contendo ácidos graxos insaturados pode reduzir sua capacidade antioxidante, podendo agir como pró-oxidante, dependendo da dose utilizada. Lanfer-Marquez, Barros, & Sinnecker (2005) demonstraram uma baixa atividade antioxidante para a clorofila, pigmento abundante em vegetais verdes, devido a sua elevada instabilidade química.

LOGT/TBHQ (50/50) e LOGG/TBHQ (50/50), porém, apresentaram comportamento diferenciado quanto à oxidação primária (Figura 4a), permanecendo dentro dos padrões para PV, de até 15 mEq O₂.1000 g⁻¹, para óleos prensados a frio (Codex Alimentarius, 2009), até o 12º dia de estocagem acelerada. Quanto à oxidação secundária (Figura 4b), as mesmas amostras mantiveram AV inferior a 10 a. u. (Silva et al., 1999) durante os 16 dias do armazenamento. O TBHQ adicionado isoladamente ao óleo de linhaça (LOTBHQ 100) apresentou-se dentro dos padrões para PV e AV durante todo o tempo de estocagem avaliada. Observando, entretanto, a qualidade geral destas amostras, nota-se que o óleo de linhaça apresentou-se estável, com bom estado de conservação (valor Totox inferior a 10 a. u.) (Silva, Borges, & Ferreira, 1999) (Figura 4c), até o quarto dia de estocagem.

Esses resultados demonstram o efeito cooperativo/ sinérgico entre as substâncias bioativas dos extratos vegetais avaliados e o TBHQ, produzindo uma atividade antioxidante melhorada com menores concentrações, em relação às atividades de cada um isoladamente (Wanasundara & Shahidi, 2005). Tal efeito sinérgico sugere a possibilidade de substituição

parcial dos antioxidantes sintéticos por extratos etanólicos de chá verde ou gengibre, podendo tal efeito ser potencializado com o aumento da concentração dos extratos na mistura.

Cordeiro et al. (2012) verificaram que amostras de óleo de milho aditivadas com extrato etanólico do alecrim (2000 mg.Kg⁻¹) permaneceram dentro dos padrões para PV durante os 28 dias de estocagem acelerada a 60 °C, sendo tal extrato uma fonte promissora de antioxidantes para óleos comestíveis.

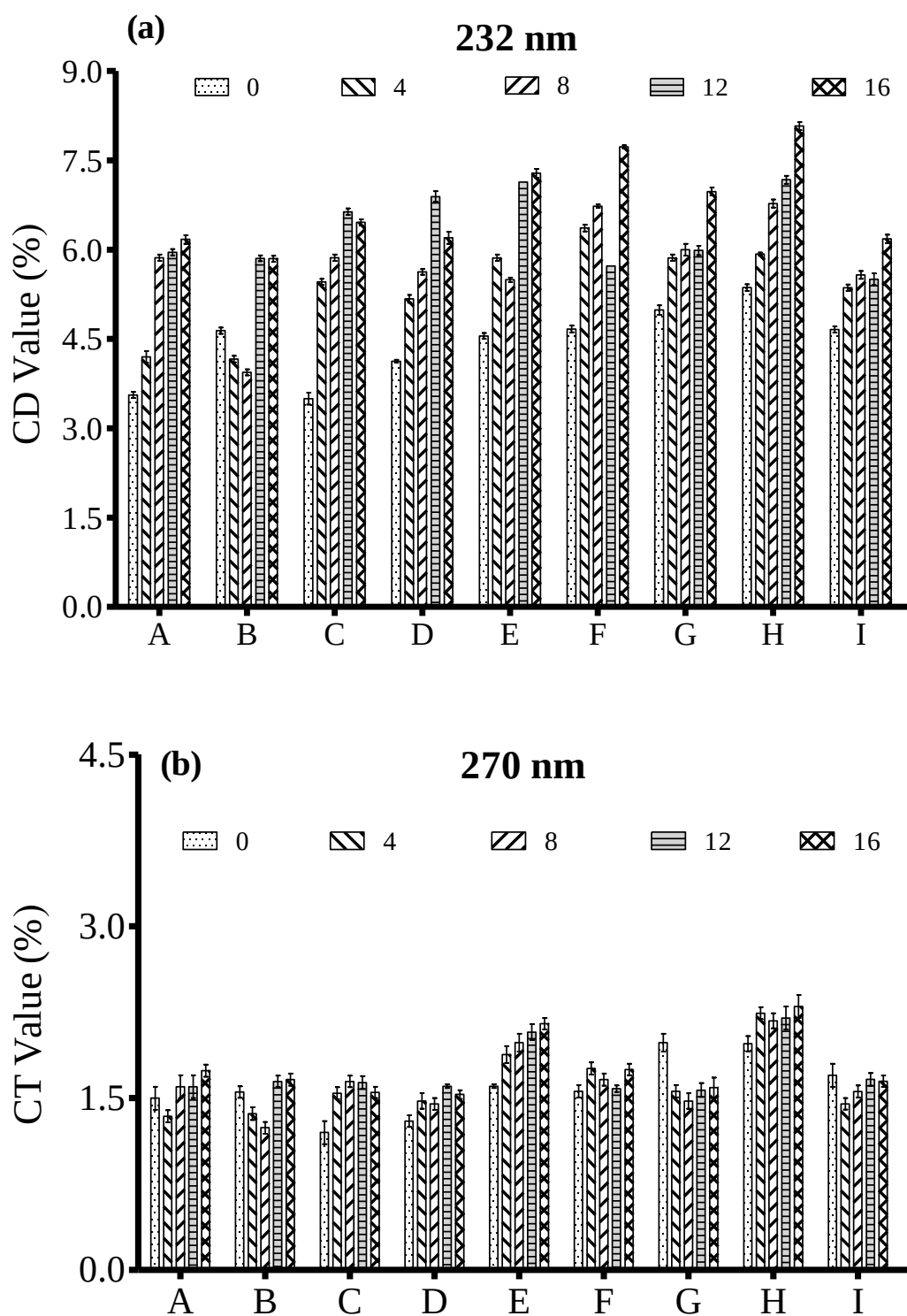
3.4.2 Dienos e trienos conjugados

A formação de hidroperóxidos decorrentes da peroxidação lipídica coincide com a conjugação das duplas ligações dos ácidos graxos poli-insaturados, formando os dienos conjugados (CD). Estes, ao sofrerem desidratação em decorrência do avanço do processo oxidativo, dão origem aos trienos conjugados (CT). Ambos os parâmetros são importantes para a avaliação do estado oxidativo de óleos e também da eficiência de antioxidantes (Iqbal & Bhanger, 2007).

CD e CT (Figuras 5a e 5b) foram determinados para avaliar, juntamente com PV e AV, o grau de oxidação primária e secundária, respectivamente, a partir da identificação de peróxidos e hidroperóxidos, absorvidos no UV-visível a 232 nm, e de compostos secundários de oxidação, como aldeídos, a 270 nm.

A superestimação dos valores CD e CT no dia 0, em relação a LO, para a maioria das amostras, especialmente, para LOGT/TBHQ (50/50) e LOGG/TBHQ (50/50), demonstraram divergências quanto aos resultados de PV e AV (Figuras 4a e 4b), mostrando que a presença dos aditivos naturais e/ ou sintéticos interferiu negativamente na detecção das oxidações primária e secundária. Essas interferências podem ser atribuídas à presença de outras biomoléculas, como os pigmentos vegetais, que absorvem nas mesmas regiões espectrais supracitadas (Dobarganes & Velasco, 2002).

Figura 5. Alterações do índice de dienos (a) e trienos conjugados (b) de amostras de óleo de linhaça com ou sem aditivos naturais e/ ou sintéticos, estocados à temperatura de 60 °C por 16 dias.



A – LO; B – LOTBHQ 100; C – LOBHT 100; D – LOGT 100; E – LOGT/TBHQ (50/50); F – LOGT/BHT (50/50); G – LOGG 100; H – LOGG/TBHQ (50/50); I – LOGG/BHT (50/50).

Mesmo diante desta interferência, o aumento gradativo de CD, observado, de modo geral, para todas as amostras, indica o provável aumento de peróxidos e hidroperóxidos, ao longo do período de estocagem. Os baixos e constantes valores CT indicam processos oxidativos pouco avançados, apontando uma provável proteção por ação dos antioxidantes naturais ou sintéticos, isolados ou em sinergismo.

4. Conclusão

Os extratos etanólico e metanol/ acetônico de chá verde apresentaram maior teor de fenólicos totais, pelo método Folin-Ciocalteu, maior atividade antioxidante, por RSA-DPPH e FRAP, e maior estabilidade térmica, por termogravimetria, em comparação com os extratos de gengibre. Apesar de terem demonstrado alta proteção contra a peroxidação lipídica, pelo sistema β -caroteno/ ácido linoleico, os extratos etanólicos de chá verde e gengibre agiram como pró-oxidantes, quando adicionados isoladamente ao óleo de linhaça, diante do armazenamento acelerado em estufa a 60 °C. Entretanto, os referidos extratos atuaram sinergicamente quando associados ao TBHQ, propondo-se a possibilidade de substituição parcial de antioxidantes sintéticos pelos extratos naturais estudados.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Referências

- Adkins, Y., & Kelley, D. S. (2010). Mechanisms underlying the cardioprotective effects of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 21, 781–792. doi:10.1016/j.jnutbio.2009.12.004
- Andreo, D., & Jorge, N. (2007). Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de gengibre (*Gengiber officinale*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 66(2), 152–157.
- AOCS. (2003). *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society*. Champaign Illinois: AOCS.

- Araín, S., Sherazi, S. T. H., Bhanger, M. I., Talpur, F. N., & Mahesar, S. a. (2009). Oxidative stability assessment of Bauhinia purpurea seed oil in comparison to two conventional vegetable oils by Differential Scanning Calorimetry and Rancimat methods. *Thermochimica Acta*, 484, 1–3. doi:10.1016/j.tca.2008.11.004
- Aruoma, O. I. (1996). Assessment of potential prooxidant and antioxidant actions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(12), 1617–1625. doi:10.1007/BF02517962
- 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. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Blois, M. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617), 1199–1200. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Goran, A., & Igic, R. (2008). Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry*, 111(4), 925–929. doi:10.1016/j.foodchem.2008.04.071
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Brewer, M. S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 221–247. doi:10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x
- Camargo, A. E. I., Daguer, D. A. E., & Barbosa, D. S. (2006). Green tea exerts antioxidant action in vitro and its consumption increases total serum antioxidant potential in normal and dyslipidemic subjects. *Nutrition Research*, 26(12), 626–631. doi:10.1016/j.nutres.2006.09.005
- Chan, E. W. C., Lim, Y. Y., & Chew, Y. L. (2007). Antioxidant activity of *Camellia sinensis* leaves and tea from a lowland plantation in Malaysia. *Food Chemistry*, 102(4), 1214–1222. doi:10.1016/j.foodchem.2006.07.009
- Codex Alimentarius. (2009). Norma del codex para grasas y aceites comestibles no regulados por normas individuales. In *Codex Stan 19-1981* (pp. 1–5). Retrieved from <http://www.codexalimentarius.org/normas-oficiales/es/>
- Cordeiro, A. M. T. M., Medeiros, M. L., Santos, N. A., Soledade, L. E. B., Pontes, L. F. B. L., Souza, A. L., ... Souza, A. G. (2012). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract: thermal study and evaluation of the effect on vegetable oils. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 113, 889–895. doi:10.1007/s10973-012-2778-4
- Dobarganes, M. C., & Velasco, J. (2002). Analysis of lipid hydroperoxides. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(7), 420–428. doi:10.1002/1438-9312(200207)104:7<420::AID-EJLT420>3.0.CO;2-N

- El-Batoty, G. S., Abd El-Baky, H. H., Farag, R. S., & Saleh, M. A. (2010). Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils. *African Journal of Biochemistry Research*, 4(6), 167–174.
- El-Ghorab, H., Nauman, M., Anjum, F. M., Hussain, S., & Nadeem, M. (2010). Comparative study on chemical composition and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) and cumin (*Cuminum cyminum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(14), 8231–8237.
- Epaminondas, P. S., Araújo, K. L. G. V., Nascimento, J. A., Silva, M. C. D., Rosenhaim, R., Soledade, L. E. B., ... Souza, A. G. (2011). Influence of toasting and the seed variety on the physico-chemical and thermo-oxidative characteristics of the flaxseed oil. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 106(2), 545–550. doi:10.1007/s10973-011-1731-2
- Epaminondas, P. S., Araújo, K. L. G. V., Souza, A. L., Silva, M. C. D., Queiroz, N., Souza, A. L., ... Souza, A. G. (2011). Influence of toasting on the nutritious and thermal properties of flaxseed. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 106(2), 551–555. doi:10.1007/s10973-011-1638-y
- Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E., & Rahmat, A. (2010). Antioxidant activities, total phenolics and flavonoids content in two varieties of Malaysia young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Molecules*, 15(6), 4324–4333. doi:10.3390/molecules15064324
- Gramza, A., & Korczak, J. (2005). Tea constituents (*Camellia sinensis* L.) as antioxidants in lipid systems. *Trends in Food Science & Technology*, 16(8), 351–358. doi:10.1016/j.tifs.2005.02.004
- Higdon, J. V., & Frei, B. (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43, 89–143.
- Hsieh, C.-C., & Lin, B.-F. (2011). Dietary factors regulate cytokines in murine models of systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity Reviews*, 11(1), 22–27. doi:10.1016/j.autrev.2011.06.009
- Iqbal, S., & Bhanger, M. I. (2007). Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*, 100(1), 246–254. doi:10.1016/j.foodchem.2005.09.049
- Kaur, C., & Kapoor, H. C. (2002). Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal of Food Science and Technology*, 37(2), 153–161. doi:10.1046/j.1365-2621.2002.00552.x
- Lanfer-Marquez, U. M., Barros, R. M. C., & Sinnecker, P. (2005). Antioxidant activity of chlorophylls and their derivatives. *Food Research International*, 38, 885–891. doi:10.1016/j.foodres.2005.02.012
- Maizura, M., Aminah, A., & Wan Aida, W. A. (2011). Total phenolic content and antioxidant activity of kesum (*Polygonum minus*), ginger (*Zingiber officinale*) and turmeric (*Curcuma longa*) extract. *International Food Research Journal*, 18, 529–534.

- Marco, G. J. (1968). A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 45, 594–598. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.1007/BF02668958>
- Matsubara, S., & Rodriguez-Amaya. (2006). Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26(2), 380–385.
- Michiels, J. A., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J. O., & Dommes, J. (2012). Extraction conditions can greatly influence antioxidant capacity assays in plant food matrices. *Food Chemistry*, 130, 986–993. doi:10.1016/j.foodchem.2011.07.117
- Michotte, D., Rogez, H., Chirinos, R., Mignolet, E., Campos, D., & Larondelle, Y. (2011). Linseed oil stabilisation with pure natural phenolic compounds. *Food Chemistry*, 129(3), 1228–1231. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.108
- Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 48, 91.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., ... Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72, 145–171.
- Naqshbandi, A., Rizwan, S., & Khan, F. (2013). Dietary supplementation of flaxseed oil ameliorates the effect of cisplatin on rat kidney. *Journal of Functional Foods*, 5, 316–326. doi:10.1016/j.jff.2012.11.002
- Nascimento, J. A., Araújo, K. L. G. V., Epaminondas, P. S., Souza, A. S., Magnani, M., Souza, A. L., ... Souza, A. G. (2013). Ethanolic extracts of *Moringa oleifera* Lam.: Evaluation of its potential as an antioxidant additive for fish oil. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 112. doi:10.1007/s10973-013-3045-z
- Oh, J., Jo, H., Cho, A. R., Kim, S.-J., & Han, J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*, 31(2), 403–409. doi:10.1016/j.foodcont.2012.10.021
- Peng, F., Tao, Q., Wu, X., Dou, H., Spencer, S., Mang, C., ... Hao, X. (2012). Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant effects of isolated phenolic compounds from fresh ginger. *Fitoterapia*, 83(3), 568–585. doi:10.1016/j.fitote.2011.12.028
- Perumalla, A. V. S., & Hettiarachchy, N. S. (2011). Green tea and grape seed extracts: potential applications in food safety and quality. *Food Research International*, 44(4), 827–839. doi:10.1016/j.foodres.2011.01.022
- Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290–4302. doi:10.1021/jf0502698
- Pulido, R., Bravo, L., & Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3396–3402. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10956123>

- Ramalho, V. C., & Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29(4), 755–760.
- Rodriguez-Leyva, D., Bassett, C. M. C., McCullough, R., & Pierce, G. N. (2010). The cardiovascular effects of flaxseed and its omega-3 fatty acid, alpha-linolenic acid. *Canadian Journal of Cardiology*, 26(9), 489–496. doi:10.1016/S0828-282X(10)70455-4
- Santos, N. A., Cordeiro, A. M. T. M., Damasceno, S. S., Aguiar, R. T., Rosenhaim, R., Carvalho Filho, J. R., ... Souza, A. G. (2012). Commercial antioxidants and thermal stability evaluations. *Fuel*, 97, 638–643. doi:10.1016/j.fuel.2012.01.074
- Senger, A. E. V., Schwanke, C. H. A., & Gottlieb, M. G. V. (2010). Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. *Scientia Medica*, 20(4), 292–300.
- Silva, F. A. M., Borges, M. F. M., & Ferreira, M. A. (1999). Methods for the evaluation of the degree of lipid oxidation and the antioxidant activity. *Química Nova*, 22(1), 94–103.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49–55.
- Sun-Waterhouse, D., Thakorlal, J., & Zhou, J. (2011). Effects of added phenolics on the storage stability of avocado and coconut oils. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(8), 1575–1585. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02655.x
- Tao, Q. F., Xu, Y., Lam, R. Y. Y., Schneider, B., Dou, H., Leung, P. S., ... Zhao, Y. (2008). Diarylheptanoids and a monoterpene from the rhizomes of *Zingiber officinale*: antioxidant and cytoprotective properties. *Journal of Natural Products*, 71(1), 12–7. doi:10.1021/np070114p
- Unten, L., Koketsu, M., & Kim, M. (1997). Antidiscoloring activity of green tea polyphenols on B-carotene. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(6), 2009–2012.
- Wanasundara, P. K. J. P. D., & Shahidi, F. (2005). Antioxidants: Science, Technology, and Applications. In F. Shahidi (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (6th ed., pp. 431–489). New Jersey: John Wiley.
- Zuta, P. C., Simpson, B. K., Zhao, X., & Leclerc, L. (2007). The effect of α -tocopherol on the oxidation of mackerel oil. *Food Chemistry*, 100(2), 800–807. doi:10.1016/j.foodchem.2005.11.003

Avaliação do comportamento de extratos etanólicos de *Camellia sinensis* L. e *Zingiber officinale* R. sobre a estabilidade oxidativa de óleo de linhaça, por P-DSC, PetroOxy e Rancimat

Poliana S. Epaminondas^{a,b,*}, Kassandra L. G. V. Araújo^a, Jaqueline A. Nascimento^a, Alline L. Souza^{a,d}, Raul Rosenhaim^{c,e}, Antonio G. Souza^c

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, CT, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58051-970, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

^b Unidade Acadêmica de Tecnologia de Alimentos e Agroindústria, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia (IFPB), 58800-970, Campus Sousa, Sousa - Paraíba, Brasil.

^c Laboratório de Combustíveis e Materiais (LACOM), Departamento de Química, CCEN, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58059-900, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

^d Laboratório de Físico-química, Departamento de Tecnologia de Alimentos, CTDR, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58055-000, Campus V, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

^e Departamento de Engenharia Química, CT, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), 58051-970, Campus I, João Pessoa - Paraíba, Brasil.

* Autor correspondente. Tel/Fax.: + 55 83 3216 7441.

Endereço eletrônico: polis.epaminondas@yahoo.com.br (P. S. Epaminondas).

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar o poder antioxidante de extratos etanólicos de chá verde (EEGT) e gengibre (EEGG), isolados ou associados aos antioxidantes sintéticos terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e butil-hidroxitolueno (BHT), sobre a estabilidade térmica, por Termogravimetria, e sobre a estabilidade oxidativa do óleo de linhaça, por Calorimetria Exploratória Diferencial Pressurizada (P-DSC), PetroOxy e Rancimat. Os resultados mostraram que o aumento progressivo das concentrações de EEGT e EEGG favoreceu o aumento da estabilidade oxidativa, quando adicionados isoladamente ao óleo de linhaça, mas desencadeou a redução da estabilidade térmica do óleo, devido ao comportamento instável da clorofila diante de condições analíticas diferenciadas. Neste estudo, tais extratos atuaram melhor, evitando a degradação térmica e oxidativa do óleo de linhaça, quando associados,

especialmente, ao TBHQ, sugerindo-se a utilização de EEGT e EEGG como substitutos parciais dos antioxidantes sintéticos.

Palavras-chave: Óleo de linhaça, chá verde, gengibre, antioxidantes, sinergismo, estabilidade térmica e oxidativa.

1 Introdução

A necessidade da descoberta de fontes antioxidantes naturais, capazes de substituir total ou parcialmente os antioxidantes sintéticos, aplicados a óleos vegetais, tem impulsionado a indústria alimentícia a investir em pesquisas quanto à obtenção e à investigação da eficácia antioxidante de extratos vegetais, de modo que possam garantir, ao mesmo tempo, eficiência na proteção dos alimentos contra processos oxidativos e inocuidade à saúde humana [1].

O uso de aditivos antioxidantes é bastante comum na indústria alimentícia, por ser um dos métodos mais eficazes para a detenção do processo oxidativo e para o aumento da vida de prateleira de óleos comestíveis, baseados em mecanismos de ação diversos [2].

Os antioxidantes primários, devido à natureza polifenólica de suas moléculas, com uma ou mais hidroxilas (OH) associadas ao anel aromático, costumam atuar como aceptores ou captadores de radicais livres, atrasando ou inibindo a etapa de iniciação, ou ainda interrompendo a etapa de propagação de auto-oxidação. Destacam-se, entre eles, os antioxidantes sintéticos butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG), e os naturais ácidos fenólicos, flavonoides, carotenoides e tocoferóis. Já os antioxidantes secundários, quando adicionados aos alimentos, retardam reações de oxidação por remoção de oxigênio do meio (ácido ascórbico), por quelação de metais pró-oxidantes (ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ácido cítrico), ou de forma mista, como quelantes/ sequestradores (ácidos cafeico, ferúlico e gálico) [3–5].

A preocupação com os possíveis efeitos carcinogênicos e hiperplásicos relacionados ao consumo de alimentos contendo antioxidantes sintéticos e o crescente cuidado com a saúde e com a alimentação saudável tem contribuído para o desenvolvimento de pesquisas voltadas para a descoberta do potencial antioxidante de produtos naturais, com o intuito de substituir os antioxidantes sintéticos ou reduzir seu uso em alimentos. Extratos naturais de matrizes alimentares diversas são uma alternativa efetivamente capaz de combater radicais livres e impedir a oxidação, sem ocasionar danos à saúde humana [6,7].

A presença de polifenóis do tipo catequinas [8] no chá verde, obtido a partir das folhas frescas da *C. sinensis* não fermentadas, e de polifenóis do tipo gingeróis, zingeronas, shagaóis e diaril-heptanoides [9], nos rizomas de gengibre (*Z. officinale* R.), garantem a estes alimentos funcionais propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana, anticarcinogênica, imunoestimulatória, hipoglicêmica e hipocolesterolêmica [9–11], além da atividade antioxidante, por sequestro de radicais livres ou quelação de metais (ferro e cobre), para o retardo da oxidação lipídica em alimentos. Essas peculiaridades possibilitam a utilização de extratos destes e de outros vegetais como aditivos naturais antioxidantes [12,13].

Diante das restrições de uso de antioxidantes sintéticos, devido a seus efeitos danosos à saúde, e tendo-se o chá verde e do gengibre como fontes naturais de compostos antioxidante, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito dos extratos etanólicos de chá verde e gengibre sobre a estabilidade térmica e oxidativa do óleo de linhaça, utilizando-se as técnicas de TG, P-DSC, Rancimat e PetroOxy, visando a substituição total ou parcial dos antioxidantes sintéticos pelos referidos extratos.

2 Experimental

2.1 Materiais

Óleo de linhaça dourada prensado a frio, sem adição de antioxidantes (Cisbra Group[®]), folhas selecionadas de chá verde (*C. sinensis* L.) e rizomas de gengibre (*Z. officinale* R.) foram adquiridos no comércio local de João Pessoa/PB, Brasil.

Os reagentes BHT e TBHQ foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Os demais reagentes e solventes foram obtidos na Merck (Dusseldorf, Germany).

2.2 Elaboração dos extratos

Os rizomas de gengibre foram lavados, descascados manualmente, fatiados e submetidos à secagem a 40 °C por 24 hs em estufa de ar circulante. Gengibre seco e folhas de chá verde foram separadamente triturados em processador doméstico, peneirados e reservados sob temperatura de -18 °C até a elaboração dos extratos.

Os extratos etanólicos de chá verde (EEGT) e gengibre (EEGG) foram obtidos a partir de 10 g dos alimentos triturados, misturados a 40 mL de etanol, e homogeneizados em banho termostático a 25 °C, sob agitação por 2 horas. Após a centrifugação (5000 rpm/ 20

minutos), filtração do sobrenadante e aferição em balão de 100 mL com etanol, os extratos obtidos foram acondicionados em frasco âmbar até a utilização.

2.3 Aditivação do óleo de linhaça

Para avaliar o comportamento térmico e oxidativo do óleo de linhaça, EEGT e EEGG secos foram isoladamente adicionadas a alíquotas de 20 g de óleo de linhaça dourada, nas concentrações de 50, 100 e 150 mg.kg^{-1} , em relação ao teor de compostos fenólicos [14], sendo a mistura homogeneizada em agitador magnético por 30 minutos, para constituir as amostras LOGT 50, LOGT 100, LOGT 150, LOGG 50, LOGG 100 e LOGG 150. Os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHT, adicionados ao óleo de linhaça, na concentração de 100 mg.kg^{-1} , foram utilizados como controles positivos (LOTBHQ 100 e LOBHT 100). O óleo de linhaça sem aditivos (LO) foi utilizado como controle negativo. Para avaliar um possível efeito sinérgico, EEGT ou EEGG (50 mg.kg^{-1}) foram associados aos antioxidantes sintéticos TBHQ ou BHT (50 mg.kg^{-1}), para a mesma massa de óleo de linhaça, constituindo as amostras LOGT/TBHQ (50/50), LOGT/BHT (50/50), LOGG/TBHQ (50/50) e LOGG/BHT (50/50).

Curvas termogravimétricas (TG) e de Análise Térmica Diferencial (DTA) de amostras de óleo de linhaça aditivado (LOA) e não aditivado (LO) foram obtidas em Analisador Térmico Simultâneo DTA-TG-DTG, modelo H-60, marca Shimadzu, utilizando-se cerca de 10 mg de cada amostra em cadinho de platina, atmosfera de ar sintético com fluxo de 50 mL.min^{-1} e razão de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ até 700 $^{\circ}\text{C}$, a partir de análises não-isotérmicas [15,16]. A temperatura inicial (T_0) de primeira etapa de perda de massa foi utilizada como parâmetro para determinação da estabilidade térmica das amostras de óleo de linhaça.

Curvas isotérmicas P-DSC do óleo de linhaça, com e sem aditivos, foram obtidas em *Pressure Differential Scanning Calorimeter*, modelo DSC Q20P, *TA Instruments*, a partir de aproximadamente 10 mg de amostra, em cadinho de alumínio e atmosfera de oxigênio com pressão de 700 kPa, a 110 $^{\circ}\text{C}$. A estabilidade oxidativa (OS) pela técnica P-DSC foi determinada a partir da extrapolação da tangente à curva P-DSC, sendo expressa como tempo de indução oxidativa a altas pressões (HPOIT).

A estabilidade oxidativa de LO e LOA foi também determinada por PetroOxy, utilizando 5 mL de amostra, sob pressão de oxigênio de 700 kPa, em equipamento Petrotest, modelo 13-3000, com resultados expressos como período de indução (IP). O método proposto

por AOCS CD 12b-92 [17], em equipamento Rancimat (873 Biodiesel, Metrohm) também foi utilizado, a partir de 2 gramas de amostra, temperatura de 110 °C e fluxo de ar constante (10 L.h⁻¹), sendo os resultados expressos como índice de estabilidade oxidativa (OSI). Os percentuais de proteção das amostras aditivadas em relação ao óleo puro foram obtidos a partir da equação:

$$\text{Proteção (\%)} = (\text{OS amostra} - \text{OS controle}) \times 100 / \text{OS controle}$$

em que OS amostra é a estabilidade oxidativa (HPOIT, IP ou OSI) da amostra avaliada e OS controle é a estabilidade oxidativa (HPOIT, IP ou OSI) do óleo de linhaça não aditivado (LO).

Os resultados dos ensaios, realizados em triplicata, foram expressos como média $\pm$ desvio-padrão, sendo comparados por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey, com auxílio do programa estatístico SigmaStat 3.5, considerando $P < 0,05$. Os gráficos foram elaborados com auxílio dos programas GraphPad Prism 5.0 e OriginPro 8.0.

3 Resultados e discussão

3.1 Avaliação térmica dos óleos

Curvas TG e DTA de amostras de óleo de linhaça com ou sem aditivação são ilustradas nas Figuras 1 e 2. Os dados de estabilidade térmica das amostras e os percentuais de proteção térmica em relação ao óleo de linhaça não aditivado encontram-se descritos na Tabela 1 e na Figura 3, respectivamente.

As amostras de óleo de linhaça com ou sem aditivação apresentaram semelhantes perfis termogravimétricos, com variação de três a seis etapas de perda de massa (Figura 1a, Figura 2 a e c). Todas as amostras aditivadas com extratos de chá verde ou gengibre e/ou com antioxidantes sintéticos, com exceção da amostra LOBHT 100, protegeram o óleo de linhaça contra a degradação, demonstrando a seguinte ordem de estabilidade térmica: LOGT 50 ~ LOGG 50 ~ LOTBHQ 100 > LOGT/ TBHQ (50/50) ~ LOGG/ TBHQ (50/50) > LOGT 100 ~ LOGT 150 ~ LOGT/ BHT (50/50) > LOGG 100 > LOGG 150 > LOGG/ BHT (50/50) > LOBHT 100 ~ LO, com proteção percentual variando de 6 a 22 %, em relação ao óleo não aditivado (Tabela 1 e Figura 3).

Esses resultados demonstram que o EEGT e EEGG, isolados ou associados sinergicamente a antioxidantes sintéticos, especialmente ao TBHQ, foram capazes de aumentar a resistência térmica do óleo de linhaça, retardando a degradação decorrente da atuação de altas temperaturas.

Figura 1. Curvas TG (a) e DTA (b) dos controles negativo (LO) e positivo (LOTBHQ 100 e LOBHT 100).

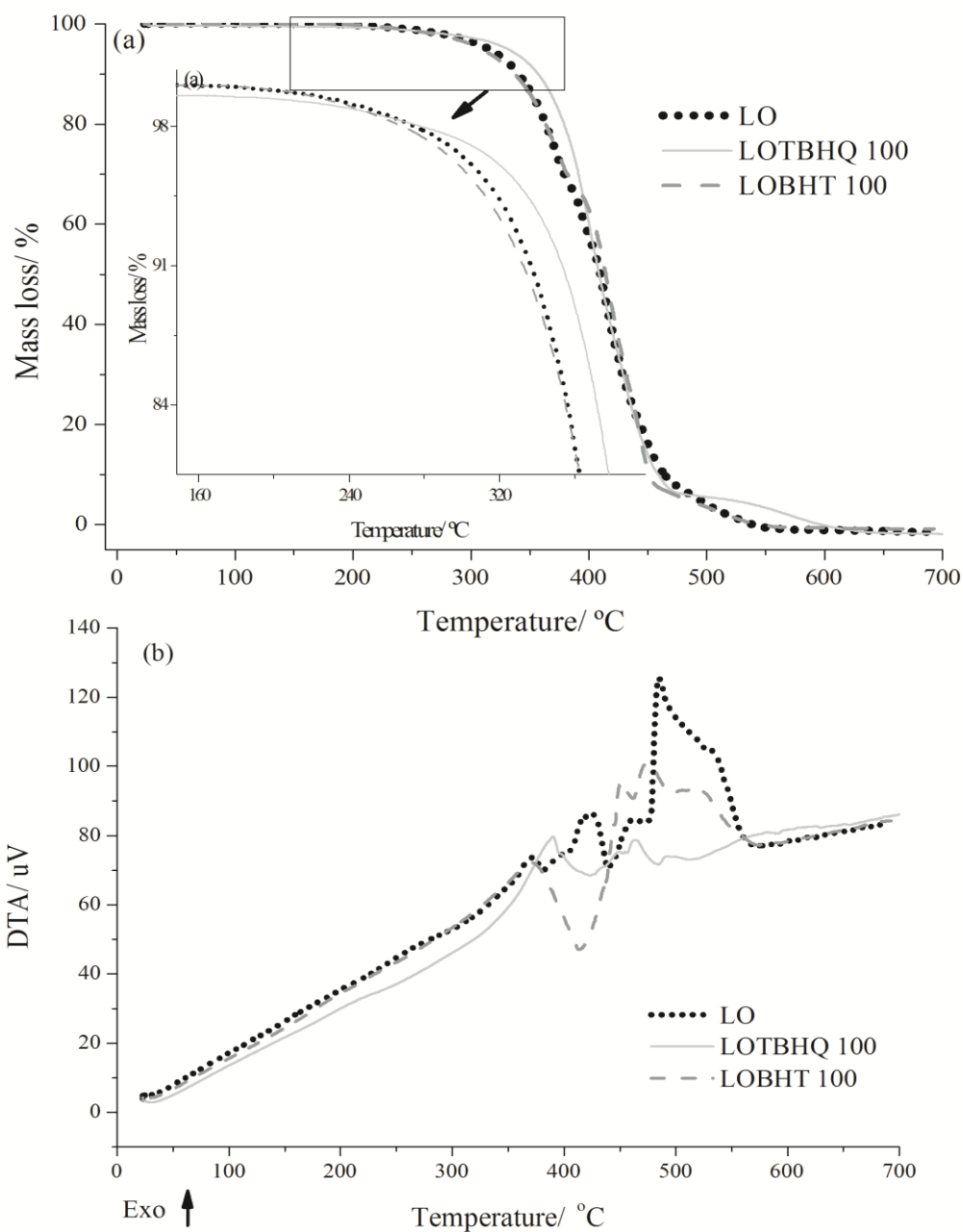


Figura 2. Curvas TG (a-c) e DTA (b-d) das amostras de óleo de linhaça aditivadas com extrato de chá verde (a-b) e gengibre (c-d).

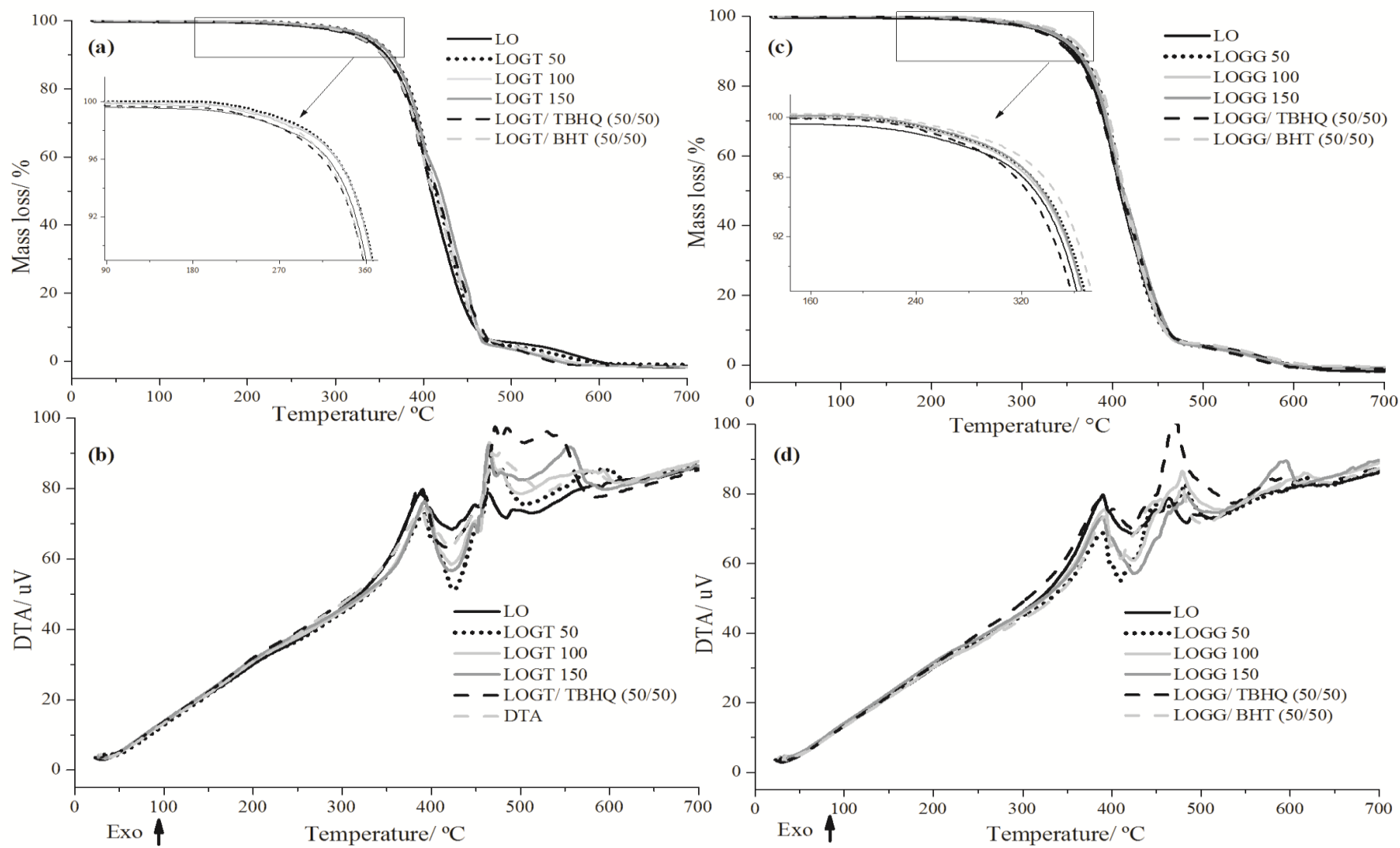
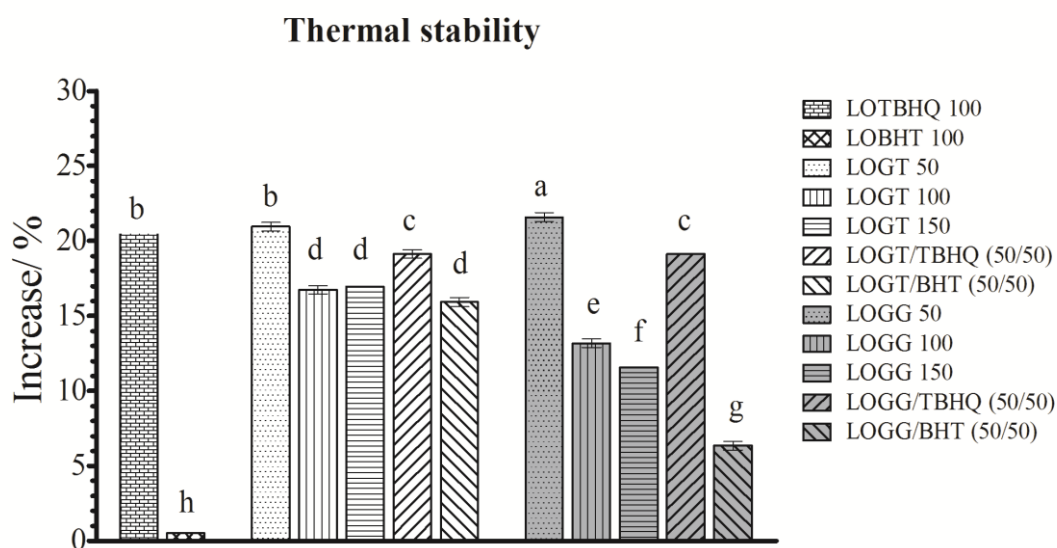


Tabela 1 Estabilidade térmica do óleo de linhaça puro ou aditivado com extratos vegetais e/ou antioxidantes sintéticos.

Amostras	Estabilidade térmica/ °C
LO	180.39 ± 0.34 ^h
LOTBHQ 100	217.58 ± 0.00 ^{a,b}
LOBHT 100	180.94 ± 0.42 ^h
LOGT 50	218.18 ± 0.52 ^a
LOGT 100	210.59 ± 0.53 ^d
LOGT 150	210.96 ± 0.00 ^d
LOGT/ TBHQ (50/50)	214.90 ± 0.50 ^c
LOGT/ BHT (50/50)	209.12 ± 0.49 ^d
LOGG 50	219.33 ± 0.38 ^a
LOGG 100	204.19 ± 0.52 ^e
LOGG 150	201.30 ± 0.00 ^f
LOGG/ TBHQ (50/50)	214.90 ± 0.00 ^c
LOGG/ BHT (50/50)	191.85 ± 0.50 ^g

Figura 3. Percentuais de proteção do óleo de linhaça aditivado com extratos vegetais e/ou antioxidantes sintéticos em relação ao óleo não aditivado, quanto à estabilidade térmica.



As amostras de óleo de linhaça aditivadas, isoladamente, com extratos de chá verde e gengibre a 50 mg.Kg⁻¹ (218.18 ± 0.52 °C, para LOGT 50, e 219.33 ± 0.38 , para LOGG 50) não apresentaram diferença estatística significativa, quanto à estabilidade térmica, em relação a LOTBHQ 100 (217.58 ± 0.00 °C), demonstrando cerca de 22 % de proteção contra degradação térmica, em relação ao óleo não aditivado (Tabela 1, Figuras 1, 2 e 3). Porém, observou-se que o aumento progressivo da concentração dos extratos isolados reduziu a estabilidade térmica e, conseqüentemente, o percentual de proteção das amostras de óleo, sendo tal estabilidade, portanto, inversamente proporcional à concentração dos extratos aplicados (218.18 ± 0.52 °C e 22 %, para LOGT 50; 210.59 ± 0.53 °C e 17 %, para LOGT 100; 210.96 ± 0.00 °C e 17 %, para LOGT 150; 219.33 ± 0.38 °C e 22%, para LOGG 50; 204.19 ± 0.52 °C e 14%, LOGG 100; 201.30 ± 0.00 °C e 11 %, para LOGG 150).

LOBHT 100 (180.94 ± 0.42 °C) não apresentou diferença significativa em relação a LO (180.39 ± 0.34 °C), quanto à estabilidade térmica, não oferecendo proteção contra a degradação.

As transições exotérmicas, observadas a partir das curvas DTA (Figura 1b e Figura 2 b e d), podem ser atribuídas à pirólise de triacilgliceróis, à volatilização de ácidos graxos e compostos antioxidantes constituintes, além da oxidação de cadeias lipídicas poli-insaturadas, em torno de 180 a 370 °C; à combustão dos componentes remanescentes, com massa molecular intermediária, em torno de 370 a 500 °C, e à combustão de polímeros resultantes da oxidação das cadeias de ácidos graxos, em torno de 500 e 600 °C [18–20].

3.2 Estabilidade oxidativa do óleo de linhaça

A estabilidade oxidativa de amostras de óleo de linhaça aditivadas com EEGT ou EEGG e/ ou antioxidantes sintéticos, além dos percentuais de aumento em relação ao óleo não aditivado (LO), encontram-se representados na Tabela 2 e na Figura 4, respectivamente.

A baixa estabilidade oxidativa evidenciada para LO, detectada pelas técnicas de P-DSC (HPOIT = 0.98 h), PetroOxy (IP = 1.14 h) e Rancimat, (OSI = 2.17 h) (Tabela 2), pode ser atribuída ao elevado teor de PUFA presente no óleo de linhaça [16], ratificando a importância da aditivação deste óleo para retardar o processo oxidativo do mesmo.

Ao contrário dos resultados encontrados para estabilidade térmica (Tabela1, Figura 3), observou-se um aumento progressivo da estabilidade oxidativa e do percentual de proteção das amostras de óleo de linhaça, diante do aumento da concentração de EEGT e EEGG

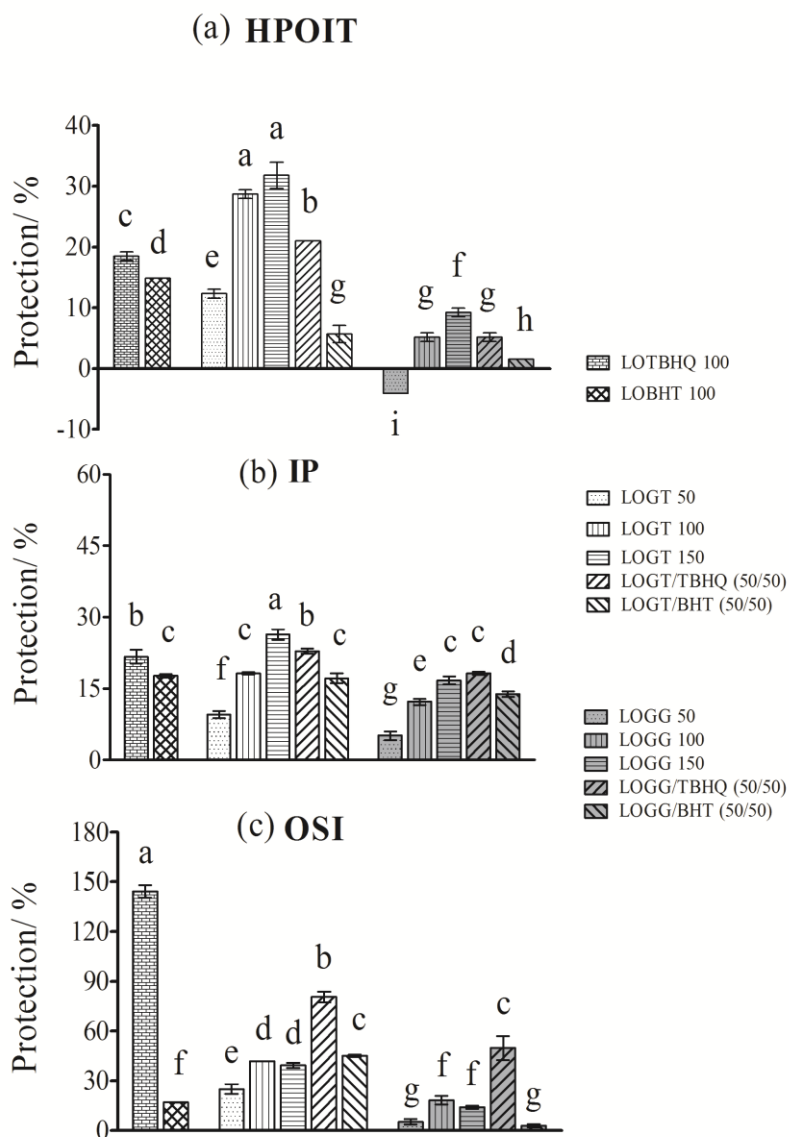
isoladamente adicionados ao óleo, detectados pelas técnicas de P-DSC, PetroOxy e Rancimat. Wanasundara e Shahidi [21] verificaram que extratos de chá verde com e sem clorofila, adicionados a amostras de óleos de peixes marinhos, apresentaram comportamento pró e antioxidante, respectivamente, diante do armazenamento acelerado em estufa a 65 °C. He e Shahidi [22], entretanto, verificaram que o extrato de chá verde, apesar da presença de clorofila, apresentou um efeito antioxidante, quando aplicado aos músculos brancos de cavala, evidenciando que a atividade pró ou antioxidante de extratos contendo clorofila é dependente do sistema.

Tabela 2 Dados de HPOIT (h), IP (h) e OSI (h) para o óleo de linhaça puro ou aditivado com extratos vegetais e/ou antioxidantes sintéticos.

Amostras	P-DSC	PetroOxy	Rancimat
	HPOIT/ h	IP/ h	OSI/ h
LO	0.98 ± 0.01 ^h	1.14 ± 0.02 ^g	2.17 ± 0.31 ^{fg}
LOTBHQ 100	1.15 ± 0.01 ^c	1.39 ± 0.02 ^b	5.30 ± 0.08 ^a
LOBHT 100	1.12 ± 0.00 ^d	1.34 ± 0.00 ^c	2.54 ± 0.33 ^f
LOGT 50	1.10 ± 0.01 ^e	1.25 ± 0.01 ^e	2.72 ± 0.06 ^f
LOGT 100	1.26 ± 0.01 ^a	1.35 ± 0.00 ^c	3.08 ± 0.00 ^e
LOGT 150	1.29 ± 0.02 ^a	1.44 ± 0.01 ^a	3.03 ± 0.05 ^e
LOGT/ TBHQ (50/50)	1.18 ± 0.00 ^b	1.40 ± 0.01 ^b	3.92 ± 0.07 ^b
LOGT/ BHT (50/50)	1.03 ± 0.01 ^g	1.35 ± 0.04 ^{b,c}	3.15 ± 0.01 ^d
LOGG 50	0.94 ± 0.00 ⁱ	1.20 ± 0.01 ^f	2.29 ± 0.04 ^g
LOGG 100	1.03 ± 0.01 ^g	1.28 ± 0.01 ^d	2.57 ± 0.06 ^f
LOGG 150	1.07 ± 0.01 ^f	1.33 ± 0.01 ^c	2.50 ± 0.13 ^f
LOGG/ TBHQ (50/50)	1.03 ± 0.01 ^g	1.35 ± 0.00 ^c	3.25 ± 0.16 ^c
LOGG/ BHT (50/50)	0.99 ± 0.00 ^h	1.30 ± 0.01 ^c	2.24 ± 0.02 ^g

Valores correspondentes à média ± desvio padrão (n=3). Médias seguidas por diferentes letras minúsculas na mesma coluna diferem significativamente ($p \leq 0.05$), pelo teste de Tukey.

Figura 4. Percentuais de proteção do óleo de linhaça aditivado com extratos vegetais e/ou antioxidantes sintéticos em relação ao óleo não aditivado, para HPOIT (a), IP (b) e OSI (c).



* Letras minúsculas distintas indicam diferença significativa (≤ 0.05), pelo teste de Tukey.

As amostras LOGT 150 e LOGT 100 não apresentaram diferença significativa quanto aos valores de HPOIT, detectados pela técnica P-DSC, demonstrando estabilidade oxidativa (1.29 ± 0.02 h e 1.26 ± 0.01 h, respectivamente) e percentual de proteção (32% e 29%, respectivamente) superiores aos observados para LOGT/ TBHQ (50/50) (1.18 ± 0.00 h e 21%) e LOTBHQ 100 (1.15 ± 0.01 e 18%) (Tabela 2 e Figura 4a). Características semelhantes foram observadas para as amostras LOGT 150 (1.44 ± 0.01 h e 26%, respectivamente) > LOGT/ TBHQ (50/ 50) (1.40 ± 0.01 h e 23 %, respectivamente) ~ LOTBHQ 100 (1.39 ± 0.02 h e 22%, respectivamente), em relação a IP e percentual de

proteção, detectados pela técnica PetroOxy (Tabela 2 e Figura 4b). Tal semelhança confirma a correlação entre as duas técnicas estudadas, demonstrando que extrato de chá verde, isolado e em concentrações maiores, ou sinergicamente associado ao TBHQ, protege melhor o óleo de linhaça, retardando o início do processo oxidativo, quando comparado aos compostos sintéticos isolados e ao extrato de gengibre, uma vez que P-DSC e PetroOxy caracterizam-se por registrar a formação de peróxidos na fase de inicial da oxidação [23,24].

O extrato de gengibre demonstrou efeito antioxidante mais expressivo quando adicionado isoladamente a LO em alta concentração, representado por LOGG 150 (1.33 ± 0.01 h e 17 % de proteção) ou quando sinergicamente associado ao TBHQ, representado por LOGG/ TBHQ (50/50) (1.35 ± 0.00 h e 18% de proteção), detectados pela técnica PetroOxy, sendo esses valores inferiores aos observados para LOTBHQ 100.

As amostras de óleo de linhaça com TBHQ na formulação (LOTBHQ 100, LOGT/ TBHQ (50/50) e LOGG/ TBHQ (50/50)) apresentaram maiores valores de OSI (5.30 ± 0.08 h, 3.92 ± 0.07 e 3.25 ± 0.16 h, respectivamente) e de percentual de proteção contra a oxidação (144%, 81% e 49%, respectivamente), em relação a LO (2.17 ± 0.31 h), sendo estes valores superiores aos detectados para as demais amostras, pela técnica de Rancimat (Tabela 2 e Figura 4c). Estes dados demonstram que o TBHQ, isolado ou associado aos extratos, retarda mais efetivamente o aparecimento de compostos voláteis secundários à oxidação (cetonas, aldeídos, ácidos), em comparação com EEGT e EEGG aplicados isoladamente, evitando a evolução do processo oxidativo. A alta proteção oferecida pelo TBHQ na fase final da oxidação pode ser atribuída a sua alta resistência térmica, evidenciada por Santos et al. [4] por Termogravimetria.

4. Conclusão

O aumento progressivo da concentração dos extratos de chá verde e gengibre isoladamente associados ao óleo de linhaça aumentou sua estabilidade oxidativa, pelas técnicas P-DSC, PetroOxy e Rancimat, e reduziu a estabilidade térmica das mesmas, por Termogravimetria. Dessa forma, acredita-se que os extratos de chá verde e gengibre possam ser mais efetivos quando associados sinergicamente aos antioxidantes sintéticos, podendo atuar como substitutos parciais do TBHQ, especialmente, evitando a degradação térmica e oxidativa do óleo de linhaça e, possivelmente, de outros óleos comestíveis.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

Referências

- [1] M.S. Brewer, Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 10 (2011) 221–247.
- [2] L.R.B. Mariutti, N. Bragagnolo, Review: Natural Antioxidants from the Lamiaceae Family - Application in Food Products, *Brazilian Journal of Food Technology*. 10 (2007) 96–103.
- [3] V.C. Ramalho, N. Jorge, Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos., *Química Nova*. 29 (2006) 755–760.
- [4] N.A. Santos, A.M.T.M. Cordeiro, S.S. Damasceno, R.T. Aguiar, R. Rosenhaim, J.R. Carvalho Filho, et al., Commercial antioxidants and thermal stability evaluations, *Fuel*. 97 (2012) 638–643.
- [5] P.K.J.P.D. Wanasundara, F. Shahidi, Antioxidants: Science, Technology, and Applications, in: F. Shahidi (Ed.), *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, 6th ed., John Wiley, New Jersey, 2005: pp. 431–489.
- [6] D. Michotte, H. Rogez, R. Chirinos, E. Mignolet, D. Campos, Y. Larondelle, Linseed oil stabilisation with pure natural phenolic compounds, *Food Chemistry*. 129 (2011) 1228–1231.
- [7] D. Sun-Waterhouse, J. Thakorlal, J. Zhou, Effects of added phenolics on the storage stability of avocado and coconut oils, *International Journal of Food Science & Technology*. 46 (2011) 1575–1585.
- [8] S. Matsubara, Rodriguez-Amaya, Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. 26 (2006) 380–385.
- [9] F. Peng, Q. Tao, X. Wu, H. Dou, S. Spencer, C. Mang, et al., Cytotoxic, cytoprotective and antioxidant effects of isolated phenolic compounds from fresh ginger., *Fitoterapia*. 83 (2012) 568–585.
- [10] G.S. El-Batoty, H.H. Abd El-Baky, R.S. Farag, M.A. Saleh, Characterization of antioxidant and antimicrobial compounds of cinnamon and ginger essential oils, *African Journal of Biochemistry Research*. 4 (2010) 167–174.

- [11] Q.F. Tao, Y. Xu, R.Y.Y. Lam, B. Schneider, H. Dou, P.S. Leung, et al., Diarylheptanoids and a monoterpenoid from the rhizomes of *Zingiber officinale*: antioxidant and cytoprotective properties., *Journal of Natural Products*. 71 (2008) 12–7.
- [12] D. Andreo, N. Jorge, Avaliação da capacidade antioxidante do extrato de gengibre (*Gengiber officinale*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada, *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*. 66 (2007) 152–157.
- [13] A.V.S. Perumalla, N.S. Hettiarachchy, Green tea and grape seed extracts: potential applications in food safety and quality, *Food Research International*. 44 (2011) 827–839.
- [14] K. Slinkard, V.L. Singleton, Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods, *American Journal of Enology and Viticulture*. 28 (1977) 49–55.
- [15] P.S. Epaminondas, K.L.G. V. Araújo, A.L. Souza, M.C.D. Silva, N. Queiroz, A.L. Souza, et al., Influence of toasting on the nutritious and thermal properties of flaxseed, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 106 (2011) 551–555.
- [16] P.S. Epaminondas, K.L.G. V. Araújo, J.A. Nascimento, M.C.D. Silva, R. Rosenhaim, L.E.B. Soledade, et al., Influence of toasting and the seed variety on the physico-chemical and thermo-oxidative characteristics of the flaxseed oil, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 106 (2011) 545–550.
- [17] American Oil Chemists Society, Official methods and recommended practices of the AOCS: fats, oils and lipid related analytical methods, 6th ed., AOCS Press, 2009.
- [18] S. Vecchio, L. Campanella, A. Nuccilli, M. Tomassetti, Kinetic study of thermal breakdown of triglycerides contained in extra-virgin olive oil, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 91 (2008) 51–56.
- [19] S. Vecchio, L. Cerretani, A. Bendini, E. Chiavaro, Thermal decomposition study of monovarietal extra virgin olive oil by simultaneous thermogravimetry/differential scanning calorimetry: relation with chemical composition., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57 (2009) 4793–800.
- [20] M.M. Fonseca, M.I. Yoshida, Thermal analysis of raw and aged linseed oil, *Vértices*. 11 (2009) 61–75.
- [21] U.N. Wanasundara, F. Shahidi, Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils, *Food Chemistry*. (1998) 335–342.
- [22] Y. He, F. Shahidi, Antioxidant activity of green tea and its catechins in a fish meat model system, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45 (1997) 4262–4266.
- [23] K.L.G. V. Araújo, P.S. Epaminondas, M.C.D. Silva, a. E. a. Lima, R. Rosenhaim, A. S. Maia, et al., Influence of thermal degradation in the physicochemical properties of fish oil, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 106 (2011) 557–561.

- [24] S. V. Araújo, F.M.T. Luna, E.M. Rola Jr., D.C.S. Azevedo, C.L. Cavalcante Jr., A rapid method for evaluation of the oxidation stability of castor oil FAME: influence of antioxidant type and concentration, *Fuel Processing Technology*. 90 (2009) 1272–1277.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os extratos de chá verde e gengibre apresentaram-se como fontes em potencial de compostos fenólicos, demonstrando resultados significativos quanto ao sequestro de radicais livres, pelo método RSA-DPPH, e quanto à redução do ferro, pelo método FRAP.
- Embora tenham demonstrado alta proteção contra a peroxidação lipídica, pelo sistema β -caroteno/ ácido linoleico e pelas técnicas P-DSC, PetroOxy e Rancimat, os extratos etanólicos de chá verde e gengibre, quando adicionados isoladamente ao óleo de linhaça, reduziram progressivamente sua estabilidade térmica, com o aumento da concentração dos extratos, e atuaram como pró-oxidantes, mediante o teste de oxidação acelerada em estufa, oferecendo considerável proteção, porém, quando associados sinergicamente ao TBHQ.
- Apesar dos resultados pouco expressivos quanto ao teor de fenólicos totais e à atividade antioxidante, por RSA-DPPH e FRAP, o extrato etanólico de alho demonstrou considerável capacidade de inibição à peroxidação lipídica, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, e alta estabilidade térmica, atribuídas aos compostos organossulfurados.
- O extrato etanólico de alho, isolado ou sinergicamente associado ao TBHQ ou ao BHT, protegeu o óleo de linhaça de forma similar ou até superior aos antioxidantes sintéticos isolados, evidenciando a inibição da formação de compostos de oxidação primária e secundária, a partir dos métodos P-DSC, PetroOxy, Rancimat e físico-químicos pós armazenamento acelerado.
- Diante destes resultados, propõe-se a utilização dos extratos de chá verde, gengibre e alho como fontes alternativas potenciais de antioxidantes, para a aplicação na indústria de óleos comestíveis, como substitutos parciais ou totais de antioxidantes sintéticos.
- Sugere-se, assim, a utilização dos extratos de chá verde e gengibre como substitutos parciais do TBHQ, com destaque para as formulações LOGT/ TBHQ (50/50) e LOGG/ TBHQ (50/50), respectivamente, e o uso do extrato de alho como substituto total de TBHQ ou BHT, sendo a formulação LOGL 100 a de melhor viabilidade antioxidante.