



***Avaliação da estabilidade físico-química de óleo alimentar suplementado com extrato de carqueja***

Andreia Raquel Feliciano Miranda

2015



***Avaliação da estabilidade físico-química de óleo alimentar suplementado com extrato de carqueja***

Andreia Raquel Feliciano Miranda

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Gestão da Qualidade e Segurança Alimentar

Dissertação de Mestrado realizada sob a orientação da Doutora Carla Sofia Ramos Tecelão e coorientação da Doutora Susana Filipa Jesus Silva.



Título: Avaliação da estabilidade físico-química de óleo alimentar suplementado com extrato de carqueja

Copyright © Andreia Raquel Feliciano Miranda  
Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar – Peniche  
Instituto Politécnico de Leiria  
2015

A Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação/trabalho de projeto/relatório de estágio através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



## **AGRADECIMENTOS**

A conclusão da dissertação de mestrado, não seria possível sem o auxílio e apoio de algumas pessoas que me acompanharam e permitiram que conseguisse ultrapassar todos os obstáculos impostos à realização deste trabalho. Desta forma quero agradecer e salientar o meu reconhecimento.

À minha orientadora, Doutora Carla Tecelão pela oportunidade de integrar este projeto, pela bibliografia disponibilizada, assim como pelo seu apoio, disponibilidade e entusiasmo constante ao longo de todo o trabalho.

À Doutora Susana Silva, pela coorientação deste trabalho, pela ajuda, disponibilidade e por me ter dado algumas diretrizes e orientações.

À Professora Ana Cristina Correia pela disponibilidade de ceder o reagente necessário para a realização da análise ao índice de *p*-anisidina.

À Rita Sousa pela disponibilidade, pela ajuda e sobretudo pelos ensinamentos das técnicas experimentais.

Aos técnicos de laboratório que me apoiaram no que necessitei ao longo da realização da parte experimental do trabalho.

E por último, à minha família e amigos que me acompanharam e incentivaram.



## **RESUMO**

---

A prevenção da oxidação lipídica, uma das principais causas de degradação de óleos alimentares, pode ser efetuada pela adição de antioxidantes. A preocupação pelo consumo de alimentos mais saudáveis e isentos de aditivos sintéticos tem contribuído para a crescente procura de antioxidantes naturais provenientes de plantas, que possam substituir os antioxidantes sintéticos em óleos e gorduras alimentares.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da adição de extrato de carqueja (*Pterospartum tridentatum*), em concentrações diferentes (500 mg/kg e 1000 mg/kg), na estabilidade físico-química de óleo alimentar submetido a três ciclos de aquecimento (9 horas cada) a 180°C e de óleo armazenado à temperatura ambiente durante 30 dias. O extrato de carqueja foi obtido por extração em etanol, tendo-se alcançado um rendimento de 60,2%±0,225. Determinou-se a capacidade antioxidante do extrato de carqueja por avaliação da capacidade de redução do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e pelo método de Folin-Ciocalteu. Os resultados demonstraram que o extrato tem uma atividade antioxidante de 61,7%±0,38 e um teor de compostos fenólicos de 22,4 mg de equivalentes de ácido gálico /g de extrato.

A estabilidade físico-química do óleo alimentar foi estudada através da análise de diversos parâmetros, nomeadamente acidez, índice de peróxidos, índice de *p*-anisidina, absorvância no UV, índice de refração, cor e densidade. Os resultados evidenciaram um aumento de todos os parâmetros, com exceção da cor, ao longo do aquecimento do óleo bem como no seu armazenamento à temperatura ambiente. Este aumento foi mais relevante no óleo em processo de aquecimento uma vez que a 180°C as reações de oxidação ocorrem mais rapidamente do que à temperatura ambiente. Observaram-se alterações mais acentuadas dos parâmetros físico-químicos no óleo sem extrato de carqueja comparativamente ao óleo suplementado com 500mg/kg e 1000mg/kg de extrato, comprovando-se o efeito do extrato de carqueja na redução da oxidação e, conseqüentemente, no aumento da estabilidade físico-química do óleo alimentar. O óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato de carqueja revelou-se o mais estável à oxidação.

**Palavras-chave:** antioxidante, aquecimento, estabilidade físico-química, extrato de carqueja, óleo alimentar, oxidação.

## **ABSTRACT**

---

The prevention of lipid oxidation, a major cause of degradation in edible oils, can be achieved by adding antioxidants. Concerns for the consumption of healthier foods that are free of synthetic additives have contributed to the growing demand for natural antioxidants from plants that can replace synthetic antioxidants in edible oils and fats.

This study aimed to evaluate the effect of adding extract of prickled broom (*Pterospartum tridentatum*) in different concentrations (500mg/kg and 1000mg/kg) in the physicochemical stability of edible oil subjected to three heating cycles (9 hours each) at 180°C and to storage at room temperature for 30 days. The extract of prickled broom was obtained by extraction in ethanol and a yield of 60.2% ± 0.225 was attained. The antioxidant capacity of the prickled broom extract was determined by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and by the Folin-Ciocalteu method. The results showed that the extract has an antioxidant activity of 61.7 ± 0.38% and a phenolic content of 22.4 mg gallic acid equivalents /g extract.

The physicochemical stability of the edible oil was studied through the analysis of various parameters, namely acidity, peroxide value, *p*-anisidine value, UV absorbance, refractive value, color and density. The results showed an increase of all parameters, except for the color, over heating at 180 °C and during the storage at room temperature. This increase was higher for the oil subjected to heating since the oxidation reactions occur faster at 180 °C than at room temperature. The changes of physicochemical parameters were more pronounced for the oil without the prickled broom extract compared to the oil supplemented with 500mg/kg and 1000mg/kg of extract, confirming the effect of the prickled broom extract in reducing oxidation, and therefore, in increasing physicochemical stability of the edible oil. The oil supplemented with 1000mg/kg of prickled broom extract proved to be the most stable to oxidation.

**Keywords:** antioxidant, heating, physicochemical stability, prickled broom extract, edible oil, oxidation.

## ÍNDICE

---

## ÍNDICE GERAL

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	v
<b>RESUMO</b> .....	vii
<b>ABSTRACT</b> .....	ix
<b>ÍNDICE</b> .....	xi
<b>ÍNDICE GERAL</b> .....	xii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	xv
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	xvii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Enquadramento.....	2
1.2. Objetivos.....	2
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1. Óleo vegetal.....	4
2.2. Óleo alimentar.....	5
2.3. Reações de degradação de óleos em processos de aquecimento.....	8
2.3.1. Hidrólise.....	8
2.3.2. Autoxidação.....	9
2.3.3. Fotoxidação.....	11
2.3.4. Polimerização.....	12
2.4. Principais fatores que influenciam a degradação de óleos durante o aquecimento.....	14
2.4.1. Tipo de óleo.....	14
2.4.2. Pró-oxidantes.....	14
2.4.3. Processo de aquecimento.....	15
2.5. Antioxidantes – definição e classificação.....	16
2.5.1. Antioxidantes sintéticos.....	17
2.5.2. Antioxidantes naturais.....	18
2.6. Aplicação de extratos de plantas como antioxidantes em óleos.....	18
2.6.1. A carqueja como antioxidante.....	21
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
3.1. Materiais.....	24
3.2. Métodos.....	24
3.2.1. Preparação do extrato de carqueja.....	24
3.2.2. Caracterização do extrato.....	25

3.2.2.1. Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH.....	25
3.2.2.2. Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	25
3.2.3. Suplementação do óleo alimentar com extrato de carqueja.....	26
3.2.4. Ensaios de aquecimento do óleo alimentar.....	26
3.2.5. Ensaios de armazenamento do óleo alimentar à temperatura ambiente.....	26
3.2.6. Avaliação das características físico-químicas do óleo alimentar.....	27
3.2.6.1. Acidez.....	27
3.2.6.2. Índice de peróxidos.....	27
3.2.6.3. Índice de <i>p</i> -anisidina.....	28
3.2.6.4. Análise espectrofotométrica no UV.....	29
3.2.6.5. Índice de refração.....	29
3.2.6.6. Cor.....	30
3.2.6.7. Densidade.....	30
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
4.1. Avaliação do rendimento de extrato de carqueja.....	32
4.2. Caracterização da capacidade antioxidante do extrato de carqueja.....	34
4.3. Avaliação da estabilidade físico-química de óleo alimentar com e sem adição de extrato de carqueja.....	35
4.3.1. Acidez.....	35
4.3.1. Índice de peróxidos.....	38
4.3.2. Índice de <i>p</i> -anisidina.....	41
4.3.4. Análise espectrofotométrica no UV.....	43
4.3.5. Índice de refração.....	48
4.3.6. Cor.....	50
4.3.7. Densidade.....	55
<b>5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS.....</b>	<b>57</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>59</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1.</b> Hidrólise completa de um triacilglicerol.....	9
<b>Figura 2.2.</b> Esquema geral do mecanismo de autoxidação lipídica.....	10
<b>Figura 2.3.</b> Representação do mecanismo de fotoxidação.....	11
<b>Figura 2.4.</b> Processo de polimerização e formação de compostos cíclicos.....	12
<b>Figura 2.5.</b> Carqueja no seu habitat natural.....	22
<b>Figura 2.6.</b> Carqueja na fase de floração.....	22
<b>Figura 4.3.1.</b> Evolução da acidez, ao longo do tempo de aquecimento (T=180°C), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	35
<b>Figura 4.3.2.</b> Evolução da acidez, ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	37
<b>Figura 4.3.3.</b> Evolução do índice de peróxidos, ao longo do tempo de aquecimento (T=180°C), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	39
<b>Figura 4.3.4.</b> Evolução do índice de peróxidos, ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	40
<b>Figura 4.3.5.</b> Evolução do índice de <i>p</i> -anisidina ao longo do tempo de aquecimento (T=180°C), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	41
<b>Figura 4.3.6.</b> Evolução do índice de <i>p</i> -anisidina, ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	42
<b>Figura 4.3.7.</b> Evolução dos valores de $K_{232nm}$ ao longo do tempo de aquecimento (T=180°C), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	44
<b>Figura 4.3.8.</b> Evolução dos valores de $K_{270nm}$ ao longo do tempo de aquecimento (T=180°C), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	45
<b>Figura 4.3.9.</b> Evolução dos valores de $K_{232nm}$ , ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	46
<b>Figura 4.3.10.</b> Evolução dos valores de $K_{270nm}$ , ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	47
<b>Figura 4.3.11.</b> Evolução do índice de refração ao longo do tempo de aquecimento	

(T=180°C), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	48
<b>Figura 4.3.12.</b> Evolução do índice de refração, ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	49
<b>Figura 4.3.13.</b> Evolução do parâmetro L*, a* e b* ao longo do tempo de aquecimento (T=180°C), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	51
<b>Figura 4.3.14.</b> Evolução dos parâmetros L*, a* e b*, ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	53
<b>Figura 4.3.15.</b> Evolução da densidade ao longo do tempo de aquecimento (T=180°C), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	55
<b>Figura 4.3.16.</b> Evolução da densidade, ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja.....	56

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Características organoléticas de um óleo.....	6
<b>Tabela 2.2.</b> Características físico-químicas de um óleo alimentar.....	6
<b>Tabela 2.3.</b> Limites (mínimo e máximo) da composição em ácidos gordos de um óleo alimentar.....	7
<b>Tabela 2.4.</b> Principais compostos formados durante o processo de aquecimento de óleos e as alterações ocorridas.....	13



## **1. INTRODUÇÃO**

---

## 1.1. Enquadramento

Um óleo quando exposto a elevadas temperaturas, por longos períodos de tempo, sofre uma série de reações que conduzem à formação de compostos de degradação responsáveis por alterações físico-químicas irreversíveis e pela diminuição da sua qualidade. Estes compostos alteram também as características nutricionais, principalmente devido à formação de radicais livres e de diversas substâncias nocivas à saúde. No entanto, o tipo de óleo utilizado influencia diretamente estas alterações (O'Brien, 2009).

A prevenção da oxidação lipídica, uma das principais causas de degradação no processo de aquecimento de óleos, pode ser efetuada pela adição de antioxidantes que mantêm a qualidade do óleo e prolongam o seu tempo de vida útil. Contudo, a utilização de antioxidantes sintéticos na indústria alimentar tem levantado algumas questões quanto à sua inocuidade. Assim, a procura de antioxidantes naturais que apresentem esta propriedade funcional, que sejam capazes de retardar a oxidação dos alimentos e de substituir aditivos alimentares sintéticos tem despertado o interesse de vários investigadores (Ramalho e Jorge, 2006; Shan *et al.*, 2005; Kochhar, 2000).

As plantas têm na sua constituição compostos bioativos, nomeadamente compostos fenólicos e flavonóides, que tendem a eliminar radicais livres e por essa razão são consideradas uma fonte importante de antioxidantes naturais. Nas últimas décadas o uso de plantas como antioxidantes naturais, em substituição dos antioxidantes sintéticos, tem vindo a aumentar (Bandoniene, *et al.*, 2002).

## 1.1. Objetivo

O objetivo do presente trabalho centra-se na avaliação do efeito da adição de extrato de carqueja (*Pterospartum tridentatum*) em concentrações diferentes (500 mg/kg e 1000 mg/kg), na estabilidade físico-química de óleo alimentar submetido a aquecimento a 180°C e de óleo armazenado à temperatura ambiente. Para tal analisaram-se diversos parâmetros físico-químicos: acidez, índice de peróxidos, índice de *p*-anisidina, absorvâncias no UV, índice de refração, cor e densidade.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

---

## 2.1. Óleo vegetal

Um óleo é definido como uma gordura líquida à temperatura de 20°C e à pressão atmosférica. Os óleos provenientes de frutos ou sementes oleaginosas adotam a designação de óleos vegetais (Decreto-Lei nº106/2005).

Um óleo vegetal compreende duas frações: a fração saponificável e a fração insaponificável que representam, respetivamente, cerca de 99% e entre 0,5 e 1,5% da sua composição química. A fração saponificável é insolúvel em água e constituída essencialmente por triacilgliceróis, mas também por mono e diacilgliceróis (resultantes da hidrólise dos primeiros), ácidos gordos livres, fosfatídeos, glucósidos e pigmentos verdes que contém clorofila e produtos resultantes da sua decomposição. Muitas das características físicas, químicas e metabólicas de um óleo vegetal dependem da composição desta fração. A fração insaponificável é solúvel em água e constituída por componentes menores tais como hidrocarbonetos, esteróis, ceras, álcoois, substâncias corantes e aromáticas, vitaminas, tocoferóis e polifenóis. Esta é a fração responsável pelo valor biológico, nutricional e pela resistência à oxidação de um óleo vegetal. A sua concentração depende do tipo de óleo vegetal e diminui com o processamento (Lopes, 2000; Silva, 2001).

De acordo com o Decreto-Lei nº106/2005, para obter e tratar óleos vegetais a partir de frutos e oleaginosas são admitidas as seguintes operações:

- Extração por processos físicos através de ação mecânica ou dissolução com solventes;
- Depuração mediante operações de decantação, filtração, centrifugação e desmucilaginação;
- Fracionamento por operações de arrefecimento ou aquecimento a determinadas temperaturas e/ou por cristalização fracionada em dissolvente apropriado;
- Refinação recorrendo a operações de neutralização dos ácidos gordos livres com soluções alcalinas ou de separação desses ácidos por destilação em ambiente rarefeito, bem como de descoloração com adsorventes inócuos ou membranas e de desodorização pela passagem do vapor de água ou azoto em ambiente rarefeito;
- Modificação molecular e de estrutura glicerídica, com subsequente eliminação do catalisador utilizado, mediante hidrogenação, interesterificação ou transesterificação, sendo proibida a esterificação em que haja adição de glicerol ou de outros álcoois.

Quanto ao modo de obtenção, os óleos vegetais classificam-se em (i) óleo bruto: produto obtido por extração mecânica ou por dissolução com solvente, (ii) óleo virgem:

produto obtido por extração mecânica, prensagem a frio ou por outras operações físicas, excluída a dissolução com solvente, em condições térmicas que não impliquem alterações do óleo e que não tenham sofrido outro tratamento para além da lavagem, depuração por decantação, filtração e centrifugação, (iii) óleo refinado: produto obtido pela refinação do óleo bruto ou virgem e (iv) óleo parcialmente refinado: produto obtido pela neutralização e branqueamento do óleo bruto (Decreto-Lei nº106/2005).

## **2.2. Óleo Alimentar**

Os óleos alimentares resultam da mistura de dois ou mais óleos, refinados isoladamente ou em conjunto, à exceção do azeite (Decreto-Lei nº 106/2005). A mistura de diferentes tipos de óleos permite obter um produto final com características particulares, resultante da combinação das características específicas de cada um dos óleos incorporados na mistura. Este fator determina a gama alargada de óleos disponibilizados no mercado, proporcionando ao consumidor a possibilidade de optar pelo óleo que melhor se adequa às suas necessidades e preferências (Lopes, 2000).

Um óleo alimentar deve obedecer a determinados requisitos por forma a constituir um produto bromatologicamente aceitável, tais como: conveniente estado de conservação, isenção de substâncias ou matérias estranhas à sua normal composição, de microrganismos patogénicos ou de substâncias destes derivados em níveis suscetíveis de prejudicar a saúde do consumidor (Decreto-Lei nº106/2005).

Ao longo do tempo as especificações para óleos alimentares sofreram alterações, principalmente devido ao desenvolvimento de técnicas analíticas que permitem obter conhecimentos mais detalhados sobre a sua qualidade nutricional e funcional. Atualmente, verifica-se que os fatores de maior relevância nas características de um óleo alimentar são o facto de ser totalmente de origem vegetal, rico em ácidos gordos polinsaturados e pobre em ácidos gordos saturados, virtualmente livre de ácidos gordos *trans*, sem adição de óleos hidrogenados e de corantes (Gertz, 2000).

As principais características organoléticas de um óleo alimentar são apresentadas na tabela 2.1 (NP 2037:2004).

**Tabela 2.1.** Características organoléticas de um óleo alimentar (adaptado do Decreto-Lei nº106/2005 e da NP 2037:2004).

<b>Aspetto</b>	Líquido límpido e sem depósito à temperatura de 20°C.
<b>Cor</b>	Característico do produto – amarela a acastanhado ou por vezes esverdeado.
<b>Aroma e sabor</b>	Característico do produto – praticamente inodoro/insípido, isento de aromas e sabores estranhos e de ranço, à temperatura de 20°C e isento de cheiros anormais quando aquecido a 180°C.

Para além, das características organoléticas existem igualmente as características físicas e químicas descritas na tabela 2.2 que definem um óleo alimentar (Decreto-Lei nº106/2005; NP 2037:2004).

**Tabela 2.2.** Características físico-químicas de um óleo alimentar (adaptado do Decreto-Lei nº106/2005 e da NP 2037:2004).

<b>Características</b>	<b>Limites</b>
Índice de acidez (expresso em mg de KOH/g):	
▪ Gorduras e óleos virgens	Máx. 4
▪ Gorduras e óleos refinados	Máx. 0.6
Índice de peróxidos (expresso em miliequivalente de oxigénio ativo/kg):	
▪ Gorduras e óleos virgens	Máx. 15
▪ Gorduras e óleos refinados, sem antioxidantes	Máx. 10
Massa volúmica (g/mL)	0,910 a 0,927
Índice de refração a 20°C	1,465 a 1,478
Índice de iodo (WIJS)	75 a 150
Insaponificável (g/kg)	Máx. 30

No entanto, a principal característica química que identifica um óleo alimentar é a sua composição em ácidos gordos totais que obedece a limites específicos, tal como descrito na tabela 2.3 (NP 2037/2004).

**Tabela 2.3.** Limites (mínimo e máximo) da composição em ácidos gordos de um óleo alimentar (adaptado da Norma Portuguesa NP 2037:2004).

<b>Ácidos gordos</b>	<b>Limites</b>
n-Tetradecanóico (mirístico) C 14:0	Máx. 2,0%
n-Hexadecanóico (palmítico) C 16:0	Min. 3,5% Máx. 36,0%
9-Hexadecenóico (palmitoleico) C 16:1	Máx. 3,5%
9-Heptadecanóico C 17:0	Máx. 0,5%
9-Heptadecenóico C 17:1	Máx. 0,1%
n-Octadecanóico (esteárico) C 18:0	Min. 0,5% Máx. 7,4%
n-Octadecenóico (oleico) C 18:1	Min. 9,0% Máx. 84,0%
9, 12-Octadecadienóico (linoleico) C 18:2	Min. 2,0% Máx. 82,0%
9, 12, 15-Octadecatrienóico (linolénico) C 18:3	Máx. 2,0%
n-Eicosanóico (araquidónico) C 20:0	Máx. 1,7%
9-Eicosanóico (gadoleico) C 20:1	Máx. 4,0%
n-Docasenóico (beénico) C 22:0	Máx. 4,0%
13-Docasenóico (erúcico) C22:1	Máx. 1,7%
n-Tetracosanóico (lignocérico) C 24:0	Máx. 2,2%

É de salientar que quando o teor de ácido linolénico é superior a 2% é obrigatório figurar na rotulagem a menção - Teor de ácido linolénico superior a 2% (NP 2073/2004).

Os critérios de seleção de um óleo alimentar estão intimamente relacionados com a sua aplicação, por exemplo, aroma e textura do produto onde o óleo selecionado vai ser utilizado, gosto residual que deixa após a sua ingestão, estabilidade aromática, disponibilidade no mercado, custo, necessidades nutricionais específicas e ainda requisitos do consumidor alvo. De entre os fatores mencionados, tem-se verificado uma preocupação crescente com as características nutricionais do óleo, optando-se sempre que possível por óleos com baixo teor em gordura saturada e ainda em termos de custos e disponibilidade no mercado (Lopes, 2000).

Um óleo alimentar apresenta diversas aplicações culinárias a nível alimentar das quais é possível destacar o uso para fins culinários - panificação, produção de margarinas, processos de fritura de alimentos, entre outros (Lopes, 2000).

### **2.3. Reações de degradação de óleos em processos de aquecimento**

Durante o aquecimento os óleos são continuamente expostos a uma série de reações químicas e térmicas extremamente complexas que envolvem os ácidos gordos insaturados presentes na sua composição. Estas reações contribuem para a diminuição da qualidade e modificação da estrutura físico-química dos óleos, reduzindo o seu tempo de vida útil (Araújo, 2004).

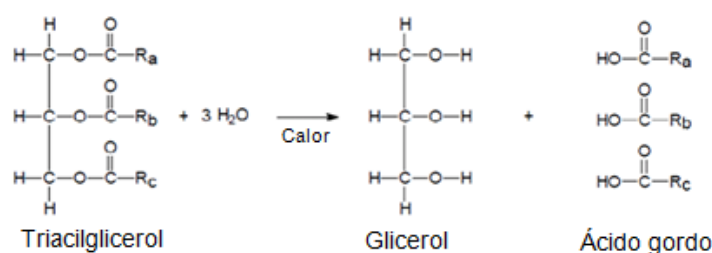
A degradação de óleos alimentares pode ocorrer mediante: hidrólise, oxidação (autooxidação e fotooxidação) e polimerização dependendo do meio e dos agentes catalisadores (Ramalho e Jorge, 2006).

#### **2.3.1. Hidrólise**

A hidrólise pode ocorrer a partir de um processo bioquímico ou químico – hidrólise enzimática e hidrólise não enzimática, respetivamente. A hidrólise enzimática de óleos envolve reações catalisadas por lipases que atuam sobre os triacilgliceróis, enquanto que a hidrólise não enzimática é uma reação catalisada pela ação do calor e na presença de água. Ocorre lentamente à temperatura ambiente, mas é acelerada a altas temperaturas, sob pressão ou durante o aquecimento prolongado dos óleos (Moretto e Fett, 1998).

As reações hidrolíticas envolvem a quebra das ligações éster das moléculas de triacilglicerol e resultam na formação de monoacilgliceróis, diacilgliceróis e glicerol, libertando ácidos gordos livre e, em menor quantidade, metilcetonas e lactonas, que podem produzir aromas desagradáveis (Moretto e Fett, 1998).

A figura 2.1 representa a hidrólise total de um triacilglicerol catalisada pelo calor e com a formação de ácidos gordos livres.



**Figura 2.1.** Hidrólise completa de um triacilglicerol (fonte: Moretto e Fett, 1998).

Segundo Lawson (1995), a extensão da hidrólise ou a quantidade de ácidos gordos livres formados depende dos seguintes fatores: (i) quantidade de água no meio de aquecimento; (ii) temperatura do óleo, visto que o aumento da temperatura acelera a taxa de produção de ácidos gordos livres; (iii) taxa de renovação do óleo, isto é, quanto mais rápida a renovação do óleo mais lenta é a formação de ácidos gordos livres; (iv) número de aquecimentos sucessivos, pois quanto mais ciclos de aquecimento maior será a produção de surfactantes (por exemplo sabões, fosfolípidos, sais inorgânicos, mono e diacilgliceróis e polímeros) e (v) acumulação de partículas que aumentam a taxa de formação de ácidos gordos livres.

Como consequência da hidrólise observa-se a diminuição do ponto de fumo dos óleos; o aumento da acidez devido ao aumento de ácidos gordos livres; a diminuição de ácidos gordos essenciais, tais como o ácido linoleico e linolénico traduzindo-se em perdas nutricionais e o aparecimento de aromas e sabores indesejáveis, em especial pela degradação do ácido láurico que deixa um sabor a sabão (Jorge, 2004).

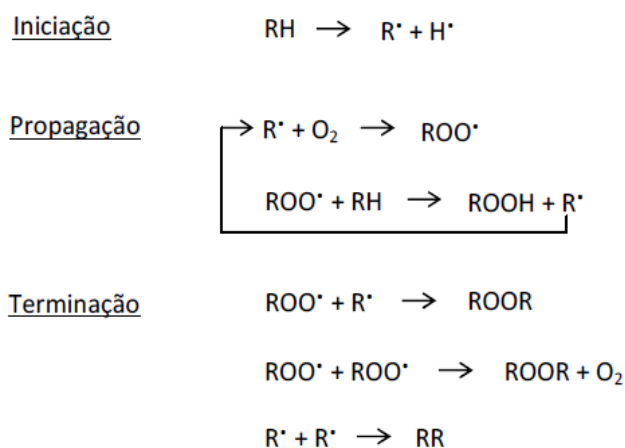
### 2.3.2. Autoxidação

De acordo com Shahidi e Wanasundara (1998), a autoxidação é o principal mecanismo de oxidação de óleos submetidos a aquecimento, constituindo a degradação oxidativa dos ácidos gordos através de um processo autocatalítico mediado por radicais livres. Ocorre quando as duplas ligações dos ácidos gordos insaturados reagem com o oxigénio atmosférico. É uma reação espontânea favorecida pelas altas temperaturas, incidência de luz, presença de metais e pró-oxidantes e grande concentração de ligações duplas (Ramalho e Jorge, 2006).

A autoxidação compreende três etapas – iniciação, propagação e terminação. Na primeira etapa ocorre a formação do radical alquilo (R<sup>•</sup>) devido à saída de um átomo de hidrogénio do carbono alílico da molécula do ácido gordo. Estas reações apresentam

elevada energia de ativação e não se desencadeiam espontaneamente, sendo potenciadas pela luz, pelo calor, pela presença de metais ou metaloproteínas (com grupo heme). Neste período, não ocorrem alterações organoléticas no óleo. Na segunda etapa os radicais alquilo ( $R^\bullet$ ) formados irão reagir com o oxigénio, ocorrendo a formação de radicais peróxido ( $ROO^\bullet$ ). Por sua vez, estes radicais reagem com outras moléculas de ácidos gordos surgindo os compostos primários da oxidação (peróxidos e hidroperóxidos), cuja estrutura depende da natureza dos ácidos gordos presentes ( $ROOH$ ). Os radicais livres formados nesta fase atuam como propagadores da reação. Na terceira etapa os radicais livres formados associam-se formando compostos estáveis de baixa massa molar como aldeídos, álcoois, cetonas, furanonas, lactonas, ésteres, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, entre outros compostos secundários da oxidação ( $ROOR$ ,  $ROOR + O_2$ ,  $RR$ ) responsáveis pelo odor a ranço (Ramalho e Jorge, 2006).

Na figura 2.2 está representado o mecanismo proposto para a autoxidação com as reações de iniciação, propagação e terminação.



Onde:  $R^\bullet$  - radical alquilo  
 $ROO^\bullet$  - radical peróxido  
 $ROOH$  - ácidos gordos  
 $ROOR$ ,  $ROOR + O_2$ ,  $RR$  - compostos secundários da oxidação

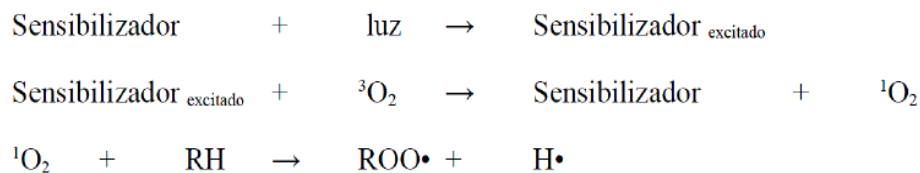
**Figura 2.2.** Esquema geral do mecanismo de autoxidação lipídica (fonte: Ramalho e Jorge, 2006).

Araújo (2004) e Aylón (2003) ressaltam que os estágios de progressiva degradação oxidativa dos óleos são favorecidos pelo efeito das altas temperaturas, produzindo mudanças físicas como o escurecimento, aumento da viscosidade, formação de espuma e aparecimento de sabores e odores indesejáveis.

### 2.3.3. Fotoxidação

É a reação direta da luz ativada e do oxigénio singleto com ácidos gordos insaturados formando hidroperóxidos. Ocorre devido à presença de moléculas fotossensíveis (como por exemplo clorofila, mioglobina e riboflavina) que podem absorver energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e na região da radiação ultravioleta, tornando-se eletronicamente excitadas e capazes de sensibilizar fotoquimicamente radicais livres e transferir essa energia para o tripleto de oxigénio ( $^3\text{O}_2$ ) que por inversão do *spin* de um elétron origina o singleto de oxigénio ( $^1\text{O}_2$ ). Desta forma, estabelece-se a fase inicial da fotoxidação. Numa segunda fase, o singleto de oxigénio, mais reativo e instável que o oxigénio no estado fundamental, reage diretamente com os elétrons das duplas ligações dos ácidos gordos insaturados para formar hidroperóxidos (compostos primários da oxidação) diferentes dos que são observados na ausência de luz e sensibilizadores, e que por degradação originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (compostos secundários da oxidação) que são substâncias potencialmente tóxicas e comprometem a segurança alimentar dos óleos (Shahidi e Wanasundara, 1998).

A figura 2.3 demonstra a formação de hidroperóxidos por fotoxidação de um lípido com a ação de uma molécula fotossensibilizadora.



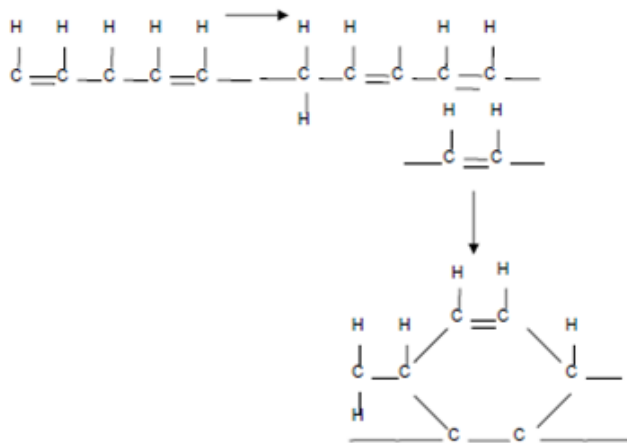
Onde:  $^3\text{O}_2$  – tripleto de oxigénio  
 $^1\text{O}_2$  – singleto de oxigénio  
RH – ácido gordo livre  
ROO $\cdot$  – peróxido  
H $\cdot$  – hidrogénio

**Figura 2.3.** Representação do mecanismo de fotoxidação (fonte: Shahidi e Wanasundara, 1998).

### 2.3.4. Polimerização

A última etapa da reação de oxidação de óleos e gorduras leva à polimerização. Os polímeros são todos os compostos resultantes da degradação do óleo que apresentam um peso molecular maior que os triacilgliceróis. Podem ser lineares, mais ou menos longos, ramificados ou compostos cíclicos (Figura 2.4). Correspondem aos compostos não voláteis que são formados através da combinação de radicais livres presentes no meio de aquecimento ou aos ácidos gordos formados mediante ligações carbono-carbono e/ou carbono-oxigênio-carbono (Aylón, 2003). Por serem de maior peso molecular tendem a aumentar a densidade e viscosidade do óleo, favorecendo a formação de espumas. Para além disso, aumentam o índice de refração dos óleos e formam um filme de consistência plástica muito aderente e de difícil eliminação na superfície destes e nos equipamentos de aquecimento. A taxa de polimerização aumenta com o número de insaturações do óleo (Monferrer e Villalta, 1993).

A oxidação excessiva é muitas vezes acompanhada pela polimerização dos produtos de decomposição formados durante a degradação dos óleos. Os compostos voláteis (peróxidos, mono e diacilgliceróis, aldeídos e cetonas) têm pouca influência na polimerização, ao contrário os compostos não voláteis (compostos polares, dímeros, trímeros e outros componentes de elevado peso molecular) revelam-se importantes na formação de triacilgliceróis polimerizados. Esta reação é acelerada durante o processo de aquecimento devido às más práticas, nomeadamente uso de temperaturas elevadas, uso de óleo de qualidade diminuída e aquecimento por longos períodos de tempo (Lawson, 1995).



**Figura 2.4.** Processo de polimerização e formação de compostos cíclicos (fonte: Monferrer e Villalta, 1993).

Em suma, os óleos alimentares quando expostos ao oxigénio atmosférico, humidade e a elevadas temperaturas, por longos períodos de tempo, sofrem inúmeras reações químicas que alteram drasticamente a sua qualidade funcional, sensorial e nutricional, com produção de vários compostos prejudiciais à saúde (Paul e Mittal, 1996). A tabela 2.4 representa, de forma esquemática, os principais grupos de compostos que podem ser formados durante as reações de hidrólise, oxidação e polimerização e as alterações físicas, químicas e nutricionais que estes compostos provocam em óleos sujeitos a aquecimento.

**Tabela 2.4.** Principais compostos formados durante o processo de aquecimento de óleos e as alterações ocorridas (adaptado Paul e Mittal, 1996).

<b>Tipo de reação</b>	<b>Agente causador</b>	<b>Compostos resultantes</b>	<b>Alterações</b>
Hidrólise	Água	Ácidos gordos livres, mono e diacilgliceróis e glicerol	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Escurecimento</li> <li>▪ Aumento da densidade e viscosidade</li> </ul>
Oxidação	Oxigénio	Monómeros oxidados, dímeros e polímeros oxidados, compostos voláteis (aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos)	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Diminuição do ponto de fumo</li> <li>▪ Formação de espuma</li> <li>▪ Odor a ranço</li> <li>▪ Degradação de ácidos gordos essenciais (linoleico e linolénico)</li> </ul>
Polimerização	Temperatura	Dímeros e polímeros não polares, monómeros cíclicos e isómeros <i>trans</i> e de posição	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Degradação de vitaminas lipossolúveis</li> <li>▪ Aumento da acidez</li> </ul>

## **2.4. Principais fatores que influenciam a degradação de óleos durante o aquecimento**

### **2.4.1. Tipo de óleo**

O óleo é um dos componentes críticos de um sistema de aquecimento, pois a sua degradação depende da maior ou menor presença de ácidos gordos insaturados na sua composição (Jorge *et al.*, 2005). De acordo com Ângelo (1996), óleos que possuem uma grande quantidade de ácidos gordos polinsaturados estão mais sujeitos à oxidação do que óleos que apresentam maior quantidade de ácidos gordos saturados. Além da insaturação, o tipo de ligações entre ácidos gordos tem um papel fundamental na estabilidade oxidativa, visto que as ligações com configuração *cis* são mais facilmente oxidáveis do que as ligações com configuração *trans* (Jorge *et al.* 2005). As condições a que o óleo é submetido durante o processamento e armazenamento também interferem ativamente na sua deterioração (Jorge *et al.* 2005).

### **2.4.2. Pró-oxidantes**

Pró-oxidantes são um conjunto de compostos ou fatores que causam ou aceleram o processo de oxidação nos óleos através da interação direta com os ácidos gordos insaturados para formar hidroperóxidos ou radicais livres. Existem ainda pró-oxidantes que favorecem a decomposição dos hidroperóxidos. Dentre os vários pró-oxidantes com capacidade de influenciar os processos degradativos de óleos sujeitos a aquecimento destacam-se: a temperatura, o oxigénio, a luz e os metais de transição (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

As temperaturas elevadas conduzem a um aumento da taxa de oxidação lipídica e, conseqüentemente, à degradação dos óleos devido à formação de subprodutos lipídicos, assim como de monómeros cíclicos de ácidos gordos e ácidos isoméricos que são produtos nutricionalmente indesejáveis. Por outro lado, as baixas temperaturas favorecem a estabilidade oxidativa dos óleos. A temperatura tem influência na pressão parcial do oxigénio, pois a temperaturas elevadas a solubilidade do oxigénio no óleo diminuiu e em alguns casos reduz a velocidade das reações oxidativas (Yanishlieva-Maslarova, 2001). A influência da temperatura na oxidação de óleos foi demonstrada por Jorge *et al.* (2005) que constatou que a partir de aproximadamente 200°C ocorre um aumento acentuado do número de compostos de deterioração.

A luz é outro dos fatores determinantes na estabilidade oxidativa dos óleos. Sabe-se que compostos minoritários, como a clorofila nos óleos, podem ser excitados eletronicamente devido à absorção de luz. Consequentemente, a molécula excitada é capaz de transferir o seu excesso de energia a uma molécula de oxigénio no seu estado fundamental ( $^3O_2$ ), originando o oxigénio singleto ( $^1O_2$ ) que reage com os eletrões das ligações duplas dos ácidos gordos insaturados formando hidroperóxidos que naturalmente contribuem para a degradação do óleo (Shahidi e Wanasundara 1998; Yanishlieva-Maslarova, 2001).

O oxigénio também tem uma implicação direta na degradação oxidativa dos óleos, ou seja, quanto maior a concentração de oxigénio presente no meio de aquecimento maior é a velocidade das reações oxidativas (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

Os metais de transição, particularmente aqueles que possuem dois ou mais estados de valência (por exemplo, o ferro e o cobre), são um dos pró-oxidantes mais relevantes. Estes diminuem a estabilidade oxidativa dos óleos devido à sua aptidão para decompor hidroperóxidos em radicais livres (Yanishlieva-Maslarova, 2001).

#### **2.4.3. Processo de aquecimento**

Segundo Keijbets *et al.* (1986), períodos de aquecimento curtos, como é o caso do sistema descontínuo, são mais destrutivos para os óleos do que os períodos longos que caracteriza o sistema de aquecimento contínuo. Este facto deve-se à formação de peróxidos e à sua decomposição durante os ciclos de aquecimento e arrefecimento, respetivamente, em consequência da maior absorção de oxigénio durante o arrefecimento do óleo, favorecendo as reações oxidativas.

Metha e Swinburn (2001) demonstraram que óleos aquecidos continuamente apresentaram melhor qualidade final do que aqueles que foram aquecidos em processo descontínuo independente da temperatura. Atribui-se este efeito porque nos aquecimentos contínuos o vapor libertado cobre a superfície do óleo, formando uma barreira isolante entre o óleo da superfície e o oxigénio atmosférico.

O tempo de aquecimento é também de extrema relevância, uma vez que determina o período em que o óleo estará em contato com os agentes degradativos. Quanto mais tempo o óleo está sob aquecimento maior é a composição em compostos oxidativos e, consequentemente, mais significativa é a alteração na sua estabilidade (Jorge *et al.*, 2005). De acordo com Jorge e Lopes (2005) os óleos não devem exceder as 12,5 horas de aquecimento, pois acima desse período observa-se a alteração de alguns compostos, nomeadamente compostos polares.

A frequente reposição de óleo novo no meio de aquecimento contribui para a melhoria da qualidade do óleo pré-existente devido à diluição dos compostos de oxidação existentes no meio e à adição de antioxidantes, inerentes ao próprio óleo que é adicionado. Estes antioxidantes ajudam a manter as características físico-químicas do óleo. Quanto mais rápida for a taxa de reposição com óleo fresco, menor será a formação de ácidos gordos livres e, conseqüentemente, menor serão as alterações oxidativas do óleo em processo de aquecimento (Monferrer e Villalta, 1993).

Segundo Jorge e Soares (2004), a relação existente entre o volume e a área de contato do óleo com a atmosfera (superfície), geralmente estabelecida pelo recipiente de aquecimento, permite a observação de diferentes níveis de oxidação. Volumes pequenos de óleo e grande área superficial proporcionam maiores alterações de degradação devido à maior velocidade das reações e do intenso contato do óleo com o oxigênio. Assim, a fim de minimizar o processo de oxidação, é recomendável que a superfície óleo/oxigênio seja a menor possível e que seja evitado o contato com a luz (Monferrer e Villalta, 1993).

Para minimizar a ocorrência de processos degradativos nos óleos há necessidade de diminuir a incidência de todos os fatores que a favorecem, controlando os níveis de energia (temperatura e luz) que são responsáveis pelo desencadeamento do processo de formação de radicais livres, evitando a presença de metais no óleo e impedindo o contato com o oxigênio. Além disto, é fundamental efetuar a reposição regular de óleo e o uso de antioxidantes, mesmo que em pequenas quantidades, que diminuem a taxa de oxidação impedindo a formação de radicais livres (Ramalho e Jorge, 2006).

## 2.5. Antioxidantes – definição e classificação

De acordo com o Regulamento (UE) nº1333/2008, relativo aos aditivos alimentares, os antioxidantes são definidos como substâncias que prolongam o prazo de conservação dos géneros alimentícios, protegendo-os contra a deterioração causada pela oxidação, tal como a rancificação das gorduras e as alterações de cor. São compostos formados por vitaminas, minerais, pigmentos naturais, compostos fenólicos e enzimas que retardam e/ou impedem as reações de oxidação através do bloqueio dos radicais livres pela doação de elétrons de hidrogênio. Os antioxidantes podem ser classificados em (Ramalho e Jorge, 2006):

- **Primários:** são compostos fenólicos que auxiliam na remoção ou inativação dos radicais livres, provenientes das fases de iniciação e propagação do processo de oxidação, através da cedência de átomos de hidrogênio, interrompendo o processo de oxidação e formando radicais inertes. Os átomos de hidrogênio provenientes do

antioxidante são sequestrados mais facilmente por radicais livres do que os átomos de hidrogénio provenientes de lípidos insaturados. Os antioxidantes primários mais comuns são os sintéticos e os naturais;

- **Sinergistas:** são compostos usados para aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando combinados adequadamente;
- **Supressores de oxigénio:** são compostos que sequestram o oxigénio presente no meio, tornando estes indisponíveis para o processo de autoxidação;
- **Biológicos:** são enzimas como a glutathione peróxidase e catalases, que neste caso específico conseguem remover peróxido de hidrogénio;
- **Agentes quelantes:** complexam iões metálicos, como cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica (exemplo, ácido etileno diamino tetra acético (EDTA));
- **Antioxidantes mistos:** incluem compostos derivados de plantas e animais, como ácido cafeico e flavonoides.

Os antioxidantes retardam o processo oxidativo mas não o impedem totalmente. Após algum tempo a ação dos antioxidantes pode ficar saturada, como tal, a utilização de vários antioxidantes em simultâneo pode ser muito importante, de forma a exercerem uma ação sinérgica na sua função (Ramalho e Jorge, 2006).

### 2.5.1. Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos são muito utilizados como aditivos alimentares, como é o caso do butil-hidroxianisolo (BHA) e do butil-hidroxitolueno (BHT). Estes podem ser adicionados isoladamente ou misturados com galatos. A sua estrutura fenólica permite a doação de um protão a um radical livre, regenerando assim a molécula de acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres. Por sua vez, os derivados fenólicos transformam-se em radicais livres que estabilizam sem promover ou propagar reações de oxidação e atuam na prevenção da oxidação de gorduras e de óleos. Contudo, o uso destes antioxidantes tem sido muito criticado visto que há estudos indicando que o BHA e o BHT têm propriedades cancerígenas, aumentam o risco de alergias, aumentam os níveis de colesterol e lípidos no sangue. Nesse sentido, diversos estudos têm vindo a ser desenvolvidos com o intuito de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante e que reúnam as condições necessárias para substituir ou serem usados em conjunto com antioxidantes sintéticos (Ramalho e Jorge, 2006).

### 2.5.2. Antioxidantes naturais

Os antioxidantes naturais são moléculas que podem ser isoladas a partir de frutos, plantas aromáticas, chá e sementes e em pequenas quantidades possuem a capacidade de interromper a formação de radicais livres. Assim, têm a capacidade de reduzir a velocidade das reações de oxidação dos compostos lipídicos ou impedir reações de escurecimento. São facilmente aceitos pelos consumidores porque são considerados seguros, mas como qualquer outro produto apresentam algumas desvantagens, tais como: elevado preço relativamente aos sintéticos; precisam de ser purificados, porque caso contrário não são muito eficientes; podem ter propriedades diferentes se a sua preparação variar e podem conferir aroma, sabor ou cor desfavorável ao produto. O antioxidante natural mais usado é o tocoferol (vitamina E). Este é utilizado na prevenção do processo oxidativo em alimentos com elevado conteúdo lipídico, como é o caso dos óleos vegetais, prevenindo a oxidação dos ácidos gordos insaturados. No entanto, outros podem ser utilizados como por exemplo os compostos fenólicos e os carotenóides. Atualmente, os extratos de plantas aromáticas e chás estão entre as principais fontes de antioxidantes naturais estudadas tendo-se verificado uma atividade antioxidante relevante (Ramalho e Jorge, 2006).

### 2.6. Aplicação de extratos de plantas como antioxidantes em óleos

As propriedades antioxidantes de extratos de plantas são indicadas como eficazes para retardar o processo de oxidação lipídica em óleos vegetais, o que tem despertado o interesse de muitos investigadores (Shan *et al.*, 2005; Kochhar, 2000; Al-Jaber *et al.*, 2011).

Ângelo e Jorge (2008) analisaram os efeitos, isolado e sinérgico, de extrato de coentro (*Coriandrum sativum*) e de ascorbil palmitato em óleo de girassol refinado. Os resultados demonstraram que estes antioxidantes apresentaram capacidade de retardar a oxidação lipídica quando adicionados, isoladamente, ao óleo de girassol armazenado durante 10 dias a 60°C. A combinação de extrato de coentro e de ascorbil palmitato revelou um poder antioxidante superior, comprovando o efeito sinérgico destes antioxidantes.

Zhang *et al.* (2009) compararam a estabilidade oxidativa do óleo de girassol suplementado com extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e do óleo de girassol suplementado com antioxidantes sintéticos, nomeadamente, o BHT, BHA e o terc-butil hidroquinona (TBHQ) durante 21 dias de armazenamento a 60°C. Os resultados

demonstraram que o extrato de alecrim tem um efeito protetor na oxidação lipídica do óleo de girassol superior ao verificado com o BHT e o BHA, mas inferior ao observado com o TBHQ.

Aladedunye e Matthäus (2014) pesquisaram a capacidade antioxidante de extratos de bagas de tramazeira (*Sorbus aucuparia*) e de maçã da Sibéria (*Malus baccata*) adicionados ao óleo de colza durante 2 dias de aquecimento a 180°C, sendo que em cada dia era efetuado um ciclo de fritura de 8 horas. Paralelamente, estudaram o efeito do armazenamento do óleo a 65°C durante 7 dias. Os resultados mostraram que a adição de ambos os extratos diminuiu a degradação oxidativa, sendo mais eficaz quando adicionado o extrato da espécie *Sorbus*.

Zia-ur-Rehman *et al.* (2003) efetuaram um estudo comparativo entre a atividade antioxidante de extrato de gengibre (*Zingiber officinale*) em diferentes concentrações (800ppm, 1600ppm e 2400ppm) e de BHT e BHA a 200ppm (limite legal) em óleo de girassol armazenado a 25°C e 45°C durante 6 meses. Foram avaliados os seguintes parâmetros: teor de ácidos gordos livres, índice de peróxidos e índice de iodo. Os resultados demonstraram que o óleo de girassol suplementado com 1600ppm e 2400ppm de extrato de gengibre apresentou os menores valores de teor de ácidos gordos livres, índice de peróxidos e índice de iodo a 45°C após 6 meses de armazenamento comparativamente ao controlo (sem extrato de gengibre). No entanto, os antioxidantes sintéticos (BHT e BHA) apresentaram atividade antioxidante ligeiramente superior. Ainda neste estudo foi avaliada a estabilidade térmica do extrato de gengibre durante o aquecimento do óleo de girassol suplementado com 2400ppm de extrato a 185°C durante 50h. Os resultados demonstraram que o extrato de gengibre apresenta estabilidade oxidativa.

Iqbal e Bhanger (2005) estudaram o efeito da adição de extrato de alho (*Allium sativum*) na estabilidade de óleo de girassol armazenado a 65°C durante 24 dias. Foram avaliados os seguintes parâmetros: teor de ácidos gordos livres, índice de peróxidos, dienos conjugados e índice de ácido tiobarbitúrico. O óleo de girassol foi suplementado com 250ppm, 500ppm e 1000ppm de extrato de alho e ainda com 200ppm de BHT e BHA. Os resultados demonstraram que o óleo de girassol suplementado com 1000ppm de extrato de alho foi o que apresentou maior estabilidade oxidativa, seguindo-se o óleo suplementado com BHT, BHA, 500ppm e 250ppm de extrato de alho, comparativamente ao controlo.

Buta *et al.* (2013) avaliaram a capacidade antioxidante do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris*) em óleo de girassol, comparando com o BHT. O óleo de girassol foi suplementado com 200ppm, 600ppm e 1000ppm de extrato de tomilho e 200ppm de BHT

e submetido ao processo de aquecimento a 180°C durante 16 horas. Os resultados mostraram que os extratos de tomilho nas concentrações de 200ppm e 600ppm têm capacidade antioxidante semelhante ao BHT. A concentração de 1000ppm apresentou a maior atividade antioxidante, revelando-se importante para a estabilidade oxidativa do óleo de girassol.

Ramadan e Wahdan (2012) testaram o efeito dos extratos de cominhos (*Cuminum cyminum*) e coentros (*Coriandrum sativum*) na estabilidade de óleo de milho armazenado a 60°C durante 15 dias. Os resultados para o índice de peróxidos, dienos e trienos conjugados indicaram que o óleo suplementado com ambos os extratos tem maior estabilidade oxidativa do que o controle (óleo sem extratos e submetido às mesmas condições de armazenamento).

Raza *et al.* (2009) compararam a atividade antioxidante do óleo essencial de centela (*Centella asiatica*) e de BHA em óleo de girassol armazenado à temperatura ambiente (20°C) durante 7 semanas. Foi analisado o índice de peróxidos, a quantidade de ácidos gordos livres, o índice de iodo e o teor de dienos e trienos conjugados. Os resultados revelaram que o óleo essencial de *Centelha asiatica* tem uma atividade antioxidante inferior ao BHA, no entanto muito semelhante. Em trabalhos posteriores, Raza *et al.* (2014) investigaram a estabilidade oxidativa de óleo de girassol, em aquecimento a 180°C durante 60 minutos, na presença de BHT e de extratos de plantas medicinais importantes do Paquistão (*Althea rosea*, *Chenopodium album*, *Cichorium intybus* e *Fumaria indica*). Os resultados do índice de peróxidos, índice de iodo, dienos e trienos conjugados e índice de *p*-anisidina revelaram que o extrato *Fumaria indica*, entre os vários extratos analisados, é o que tem maior potencial antioxidante.

Bensmira *et al.* (2007) investigaram a capacidade antioxidante do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris*) e de lavanda (*Lavandula officinalis*) em óleo de girassol submetido ao processo de aquecimento a três temperaturas diferentes (150, 180 e 200°C) durante 30 minutos. Foram avaliados parâmetros tais como: teor de ácidos gordos livres, índice de peróxidos e viscosidade. A análise dos resultados comprovou a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre as amostras de óleo que foram suplementadas com os extratos e as que não foram. Por outro lado, sempre que foram aplicadas as mesmas temperaturas durante o aquecimento do óleo não houve diferenças significativas entre as amostras suplementadas com tomilho e as amostras suplementadas com lavanda. Os extratos de tomilho e lavanda apresentaram elevada capacidade antioxidante, melhorando a estabilidade oxidativa do óleo de girassol e, conseqüentemente, prolongando o seu tempo de vida útil.

### 2.6.1. A carqueja como antioxidante

*Pterospartum tridentatum* (Figuras 2.5 e 2.6) é uma leguminosa de nome comum carqueja que pertence à Divisão *Spermatophyta*, Subdivisão *Magnoliophytina* (*Angiospermae*), classe *Magnoliopsida*, Subclasse *Rosidae* e Ordem *Fabales*. Pertence à família *Leguminosae*, Subfamília *Papilionoideae* e Género *Pterospartum* (Grosso *et al.*, 2006).

A carqueja caracteriza-se como um arbusto perene, lenhoso e rígido, que pode atingir até 1 m de altura (Ribeiro *et al.*, 2000).

A fase de floração situa-se entre o mês de Abril, em zonas de baixa altitude, e de Maio a Julho, nas terras com altitude mais elevada (Ribeiro *et al.*, 2000).

Este arbusto encontra-se a norte e centro da Península Ibérica, incluindo todo o território de Portugal continental, sendo também frequente no Norte de África. O habitat para o crescimento desta espécie é a zona de matos, bosques, terrenos incultos e alguns de cultivo. Apesar de encontrar-se a baixas altitudes, a sua preferência recai sobre as zonas mais elevadas (Ribeiro *et al.*, 2000). Até 2004 *Pterospartum tridentatum* e *Chamaespartium tridentatum* eram tidas como a mesma planta tal o grau de semelhança morfológica existente entre as duas que não permitia a distinção entre elas. Apenas em 2004 Teixeira e Pereira, ao analisarem, nos ápices aldos, o crescimento secundário e, nos elementos mecânicos, a cutícula grossa bifacial e estômas, verificaram que estas plantas eram diferentes e deveriam, por isso, ser agrupadas de forma diferente, nomeadamente ao nível do género.

A análise fitoquímica de extratos de *P. tridentatum* revela a presença de compostos fenólicos, óleos essenciais e alcalóides. Os compostos fenólicos são o grupo de compostos químicos dominante (Grosso *et al.*, 2006; Vítor *et al.*, 2004).

O estudo da atividade biológica da carqueja tem sido desenvolvido sob a forma de extratos aquosos e alcoólicos que apresentam atividade antioxidante. Um estudo realizado por Vítor *et al.* (2004) revela atividade antioxidante no extrato proveniente das flores e folhas de *Pterospartum tridentatum*. Luis *et al.* (2009) comprovaram a presença de compostos fenólicos em *Pterospartum tridentatum* e verificaram a existência de atividade antioxidante e capacidade sequestradora de radicais livres. Este trabalho revela ainda a existência de uma correlação linear positiva entre a quantidade de compostos fenólicos e o índice de atividade antioxidante, sendo mais notório no extrato etanólico. Este resultado é posteriormente confirmado por Gil *et al.* (2011) ao demonstrar o poder antioxidante associado à abundância de compostos fenólicos.



**Figura 2.5.** Carqueja no seu habitat natural (fonte: Grosso *et al.* 2006).



**Figura 2.6.** Carqueja na fase de floração (fonte: Grosso *et al.* 2006).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3.1. Materiais

Carqueja - Foi adquirida numa loja de produtos naturais, encontrando-se acondicionada em sacos de 50g. A carqueja foi lavada com água destilada, para remover eventuais impurezas, e seca em estufa a 45°C durante 24h. Posteriormente, foi triturada num triturador doméstico e acondicionada em sacos de plástico vedados e devidamente rotulados. Estes foram armazenados em local seco e fresco e ao abrigo da luz para posteriores análises.

Óleo alimentar - Apresentava-se acondicionado em garrafas de plástico de 1L e a sua rotulagem indicava tratar-se de um óleo refinado com um teor de ácido linoleico superior a 2%.

Todos os reagentes usados eram de grau *p.a.* e provenientes de diversos fornecedores.

### 3.2. Métodos

#### 3.2.1. Preparação do extrato de carqueja

O extrato de carqueja foi preparado segundo o método descrito por Mensor *et al.* (2001) com modificações.

A carqueja (10g), previamente seca e triturada, foi mantida sob agitação em etanol (100mL) à temperatura ambiente durante 12h. Em seguida, a solução foi filtrada sob vácuo e o etanol foi removido a 40°C num evaporador rotativo (Laborota 4000 – Efficient, Heidolph).

Posteriormente, o resíduo seco foi ressuspenso em etanol na proporção 1:10, obtendo-se o extrato a aplicar no óleo alimentar. O extrato foi acondicionado em frasco de vidro de cor escura, devidamente fechado e armazenado no congelador a -18°C.

O rendimento de extração foi calculado com base na equação 1:

$$\text{Rendimento de extração (\%)} = \frac{\text{massa de extrato (g)}}{\text{massa inicial (g)}} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

### 3.2.2. Caracterização do extrato

#### 3.2.2.1. Determinação da atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH

A determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH baseou-se na metodologia descrita por Mensor *et al.* (2001). Este método consiste na captura do radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorvância a 517nm. Neste procedimento, preparou-se uma solução 0,1 mM de DPPH em metanol e transferiram-se 990µL para um eppendorf juntamente com 10µL de amostra. De seguida, colocou-se a solução no escuro e à temperatura ambiente durante 30 minutos. Paralelamente, preparou-se o controlo negativo com 990µL de solução DPPH e 10µL de metanol e o branco com 990µL de metanol e 10µL de amostra. A absorvância foi lida no espectrofotómetro (Helios α, Thermo Electron Corporation) a 517nm e convertida em percentagem de atividade antioxidante através da equação 2:

$$\% AA = 100 - \left\{ \frac{(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})}{\text{Abs}_{\text{controlo}}} \right\} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

em que:

$\text{Abs}_{\text{controlo}}$  – Absorvância de DPPH em metanol

$\text{Abs}_{\text{amostra}}$  - Absorvância de DPPH na amostra de extrato

$\text{Abs}_{\text{branco}}$ - Absorvância da amostra em metanol

#### 3.2.2.2. Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais no extrato de carqueja foi determinado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Mensor *et al.* (2001) com alterações. Este método baseia-se na capacidade dos compostos fenólicos, na forma de ião fenolato, reduzirem o heteropolianião molibdotungnesteniosfórico (coloração amarela) presente no reagente de Folin-Ciocalteu, produzindo uma mistura de óxidos de tungsténio e molibdénio com coloração azul. Neste procedimento, adicionou-se 1mL da amostra, 60mL de água e 5mL de reagente de Folin-Ciocalteu num balão volumétrico de 100mL. Agitou-se durante 30 minutos e adicionou-se 15mL de solução saturada de carbonato de sódio a 20%. Após 8 minutos perfez-se o volume do balão com água destilada e incubou-se a 24°C, durante 2h e ao abrigo da luz. A leitura da absorvância foi feita a 765nm.

Para a quantificação do teor total de polifenóis foi construída uma curva de calibração, usando o ácido gálico como padrão de referência nas concentrações de 0 a 500mg/L. O teor total de polifenóis foi expresso em mg de equivalentes de ácido gálico/g de extrato.

### **3.2.3. Suplementação do óleo alimentar com o extrato de carqueja**

O extrato de carqueja foi adicionado ao óleo em duas concentrações distintas: 500 e 1000mg/kg. Posteriormente, o óleo foi acondicionado em garrafas de plástico de 1.5L, devidamente fechadas, envoltas em papel de alumínio e armazenadas num local protegido da luz à temperatura ambiente.

### **3.2.4. Ensaio de aquecimento do óleo alimentar**

Os ensaios de aquecimento foram efetuados para o óleo com e sem a adição do extrato de carqueja. Em ambos os casos, colocaram-se 4L de óleo alimentar numa fritadeira (Tefal, FR4048) com capacidade de 5L. Antes de ligar a fritadeira foram retiradas amostras correspondentes ao tempo inicial (0h). De seguida, procedeu-se ao aquecimento da fritadeira até 180°C e iniciou-se a contagem do tempo. É de referir que a fritadeira só foi aberta durante a retirada das amostras, permanecendo fechada no restante tempo de aquecimento. Foram efetuados três ciclos de aquecimento de 9h e a cada 3h recolheram-se amostras que foram colocadas em frascos de vidro (200mL) de cor escura e tampa inviolável. Após arrefecimento, os frascos devidamente rotulados foram conservados no congelador a -18°C até análise das amostras de óleo.

### **3.2.5. Ensaio de armazenamento do óleo alimentar à temperatura ambiente**

Os ensaios de armazenamento foram efetuados para o óleo com e sem a adição de extrato de carqueja. Em ambos os casos, colocou-se 1L de óleo alimentar numa garrafa de plástico envolta em papel de alumínio, para proteger da luz, e devidamente fechada. As garrafas foram conservadas à temperatura ambiente e retiraram-se amostras ao tempo inicial e após 15 e 30 dias de armazenamento.

### 3.2.6. Avaliação das características físico-químicas do óleo alimentar

#### 3.2.6.1. Acidez

A acidez foi determinada com base na adaptação da metodologia descrita na norma ISO 660:2009.

A amostra (20g) foi dissolvida numa mistura solvente de etanol e éter dietílico na proporção 1:1 e os ácidos gordos livres presentes foram titulados com uma solução de hidróxido de potássio (0.1M). A titulação decorreu na presença de solução de fenolftaleína como indicador e o ponto de equivalência caracterizou-se pelo aparecimento de uma tonalidade rosa ténue. O ensaio foi feito em triplicado.

O índice de acidez é expresso em miligrama de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos gordos livres presentes em um grama de gordura. A acidez ou ácidos gordos livres é expressa em percentagem de ácido oleico e foi obtida pela aplicação da equação 3:

$$\text{Acidez} = \frac{56,1 \times c \times V}{m} \quad (\text{Equação 3})$$

em que:

V – volume da solução de hidróxido de potássio gasto na titulação (mL)

c – concentração da solução de hidróxido de potássio (M)

m – massa da toma (g)

#### 3.2.6.2. Índice de peróxidos

O índice de peróxidos foi determinado pela adaptação da metodologia descrita na norma NP EN ISO 3960:2004.

A amostra (3g) em solução de ácido acético glacial e clorofórmio na proporção 2:1 foi tratada com uma solução saturada de iodeto de potássio. Posteriormente, a solução foi agitada durante 1 minuto e colocada ao abrigo da luz por 5 minutos para favorecer a ocorrência da reação. De seguida, foram adicionados 75mL de água para HPLC e solução de amido a 10g/L (indicador). A quantidade de iodo libertado, resultante da decomposição do iodeto de potássio por ação dos peróxidos presentes, foi titulada com uma solução de tiosulfato de sódio (0.002M), agitando-se até ao ponto de equivalência

que caracteriza-se pela neutralização da tonalidade violeta, adquirindo-se a cor natural do óleo. O ensaio foi realizado em triplicado.

O índice de peróxidos (IP), expresso em miliequivalente de oxigénio ativo por quilograma, foi obtido através da equação 4:

$$IP = \frac{1000 (V-V_0) c}{m} \quad (\text{Equação 4})$$

em que:

V – volume da solução de tiosulfato de sódio usado na determinação (mL)

V<sub>0</sub> – volume gasto na titulação do ensaio em branco (mL)

C – concentração da solução de tiosulfato de sódio (M)

m – massa da toma (g)

### 3.2.6.3. Índice de *p*-anisidina

A determinação do índice de *p*-anisidina baseou-se no método descrito na norma NP-1819, que consiste na leitura da absorvância a 350nm de uma solução da amostra de óleo com iso-octano, numa célula com percurso ótico de 1cm. Este método complementa a informação obtida nas determinações do índice de peróxidos, pois indica a presença de aldeídos formados no desenvolvimento a ranço no óleo.

O índice de *p*-anisidina (IpA) foi estimado com base na equação 5:

$$IpA = 25 \frac{(1.2A_2 - A_1)}{m} \quad (\text{Equação 5})$$

em que:

m – massa da toma de óleo (g)

A<sub>1</sub> – absorvância da solução de óleo antes da reação com a *p*-anisidina

A<sub>2</sub> – absorvância da solução de óleo após a reação com a *p*-anisidina

#### 3.2.6.4. Análise espectrofotométrica no UV

As absorvâncias foram determinadas pela adaptação na norma NP 970:1986. A amostra (0,05 g) foi dissolvida em iso-octano e analisada no espectrofotômetro (Helios  $\alpha$ , Thermo Electron Corporation) que efetuou a medição das extinções no ultravioleta aos comprimentos de onda de 232 e 270nm. Foi utilizado como referencia a extinção do solvente puro supracitado. Os valores das absorvâncias foram expressos em termos de extinção específica (extinção de uma solução de 1g de óleo em 100mL do solvente prescrito, para um percurso ótico de 1cm), designado coeficiente de extinção (K). Os coeficientes de extinção, nos diferentes comprimentos de onda definidos, foram determinados pela equação 6:

$$K\lambda = \frac{E\lambda}{c \times s} \quad (\text{Equação 6})$$

em que:

$K_\lambda$  – extinção específica no comprimento de onda  $\lambda$

c – concentração da solução (g/100mL)

s – percurso ótico (1cm)

#### 3.2.6.5. Índice de refração

A determinação do índice de refração baseou-se na norma NP EN ISO 6320:2004. Para o efeito, utilizou-se um refratômetro de Abbe (Lan Optics) previamente calibrado de acordo com as especificações do fabricante. Mediu-se o índice de refração das amostras em triplicado e à temperatura de 20°C.

O índice de refração ( ${}^t n_D$ ) foi calculado através da equação 7:

$${}^t n_D = {}^{t_1} n_D + (t_1 - t) \times F \quad (\text{Equação 7})$$

em que:

$t_1$ - corresponde à temperatura de medição, em grau Celsius

t- corresponde à temperatura de referência, em grau Celsius

F-fator (neste caso, igual a 0.00035 para T=20°C)

#### **3.2.6.6. Cor**

A medição da cor foi efetuada pela leitura das coordenadas Cielab ( $L^*, a^*, b^*$ ), usando um colorímetro (Chroma Meter CR – 400/410, Konica Minolta), previamente calibrado com uma cerâmica branca. Todas as medições foram realizadas em triplicado, numa célula para líquidos, à temperatura ambiente e a um ângulo de  $0^\circ$ .

#### **3.2.6.7. Densidade**

A leitura da densidade das amostras foi efetuada em triplicado com um densímetro (gama 0.900-1.00g/mL, Ludwig Schneider), à temperatura ambiente e com aproximadamente 200mL de amostra.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

#### 4.1. Avaliação do rendimento de extração da carqueja

O extrato de carqueja utilizado no presente estudo foi preparado, em triplicado, com etanol como solvente de extração, tendo-se alcançado um rendimento de  $60,2\% \pm 0,225$ .

O rendimento de extração obtido é superior ao apresentado em estudos similares. Luis *et al.* (2009) obtiveram um rendimento em extratos aquoso e etanólico de *Pterospartum tridentatum* de 12,01% e 28,61%, respetivamente. Também Pimenta (2012) ao avaliar o rendimento de extração de *Pterospartum tridentatum* colhida nas serras da Gardunha e da Malcata, em qualquer fase do ciclo vegetativo, alcançou um rendimento em extrato aquoso de 17,2% e 46%, respetivamente. No entanto, no período de repouso vegetativo, quer na amostra da Gardunha quer da Malcata, o rendimento foi máximo, sendo de 25,6% e 46%, respetivamente.

Um estudo desenvolvido com a espécie *Carissa opaca* (fruto medicinal utilizado no Paquistão) revelou um rendimento em extrato aquoso de 10,7% (Sahreem *et al.*, 2010). Sousa *et al.* (2007) apresentou o rendimento de extração de algumas plantas medicinais, utilizando etanol como solvente, nomeadamente, *C. prunifera* (4,6%); *T. brasiliensis* (5,8%); *Q. grandiflora* (9,8%); *C. macrophyllum* (13,7%) e *T. fagifolia* (22%).

#### 4.2. Caracterização da capacidade antioxidante do extrato de carqueja

A capacidade antioxidante é influenciada pelo solvente e pelo binómio tempo/temperatura aplicados no processo de extração (Mensor *et al.*, 2001). Segundo Scherer *et al.* (2009) um dos métodos mais usados para avaliar a capacidade antioxidante de plantas é o método do radical livre 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH). Este método baseia-se no princípio de que o DPPH, um radical de coloração violeta, aceita um eletrão ou um radical hidrogénio para tornar-se uma molécula estável, sendo reduzido na presença de um antioxidante, adquirindo a coloração amarela. Na forma radical, o DPPH possui uma absorção característica a 517nm que desaparece à medida que este radical vai sendo reduzido pelo hidrogénio doado por um composto antioxidante (Mensor *et al.*, 2001).

No presente estudo, o extrato de carqueja apresentou uma atividade antioxidante de  $61,7\% \pm 0,38$ , demonstrando uma elevada capacidade de sequestrar o radical DPPH. Melo *et al.* (2006) avaliaram a atividade antioxidante de extratos de hortaliças e classificaram de alta ação os extratos que apresentaram capacidade de sequestrar o radical DPPH superior a 70%. Por outro lado, os extratos que exibiram capacidade de sequestrar o radical DPPH entre 60-70% e inferior a 60% foram considerados de ação

moderada e ação reduzida, respetivamente. Segundo a classificação proposta por Melo *et al.* (2006) o extrato de carqueja apresenta uma ação antioxidante moderada. Luis *et al.* (2009) estudaram a atividade antioxidante de extrato etanólico de carqueja e verificaram igualmente um poder antioxidante moderado.

A capacidade antioxidante do extrato de carqueja é idêntica à apresentada em estudos similares utilizando outras plantas. Zhang *et al.* (2009) avaliaram a atividade antioxidante de extrato etanólico de alecrim em concentrações de 0,2%, 0,4% e 0,6%, verificando uma capacidade antioxidante de  $64,18\pm 0,12$ ;  $75,94\pm 0,10$  e  $82,23\pm 0,08$ , respetivamente. Iqbal e Bhangar (2005) investigaram a atividade antioxidante de extrato etanólico de alho, verificando uma capacidade antioxidante de  $87,2\pm 4,3$ . Shyamala *et al.* (2005) estudaram a atividade antioxidante de extratos etanólicos de várias plantas, nomeadamente, *Alternanthera sessilis*, *Brassica oleracea*, *Coriandrum sativum* e *Spinacia oleracea*, verificando que todas apresentaram uma elevada capacidade antioxidante (acima de 70%).

Segundo Celikler *et al.* (2009) existe uma correlação entre a quantidade de compostos fenólicos de plantas e a sua atividade antioxidante. Os compostos fenólicos, comumente designados por polifenóis, são antioxidantes primários que reagem como sequestradores de radicais livres e bloqueadores de reações em cadeia (Shahidi, 1995). Quimicamente, os compostos fenólicos são constituídos por um anel aromático, com um ou mais grupos hidroxilo, formando desde moléculas simples a compostos altamente polimerizados (Shahidi, 1995). O método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu é um dos mais frequentemente usados para a quantificação de compostos fenólicos. Baseia-se na capacidade dos compostos fenólicos, na forma de ião fenolato, reduzirem o heteropolianião molibdotungsteniofosfórico (coloração amarela) presente no reagente de Folin-Ciocalteu, produzindo uma mistura de óxidos de tungsténio e molibdénio com coloração azul (Mensor *et al.*, 2001).

No presente estudo, o extrato de carqueja apresentou um teor de compostos fenólicos de 22,4 mg de equivalentes de ácido gálico/g de extrato. Verifica-se que este resultado é muito inferior ao obtido por Luis *et al.* (2009) com extrato etanólico de carqueja (c.a.  $196,61\pm 3,49$  mg de equivalentes de ácido gálico/g de extrato). Comparativamente a estudos similares realizados com outras plantas verifica-se que o extrato de carqueja apresentou maior quantidade de polifenóis. Proestos *et al.* (2005) avaliaram extratos de ervas aromáticas como potenciais fontes de compostos fenólicos, os quais foram extraídos utilizando uma mistura metanol:água (62,5:37,5 v/v) e quantificados de acordo com o método de Folin-Ciocalteu. Os extrato de endro, sálvia, tomilho, alecrim e manjerona apresentaram teor de compostos fenólicos de 12,5; 13,6; 19,2; 21; e 16,9 mg

de equivalentes de ácido gálico/g de extrato, respetivamente. Bukhari *et al.* (2009) avaliaram o potencial antioxidante de extrato de cominho, utilizando diferentes solventes (metanol, etanol, diclorometano e hexano) para a extração de compostos fenólicos. O extrato etanólico de cominho destacou-se com o maior teor de polifenóis (c.a. 5,38 mg de equivalentes de ácido gálico/g de extrato). Zheng e Wang (2001) determinaram o teor de compostos fenólicos de 27 ervas aromáticas e 12 plantas medicinais. Entre as amostras analisadas estão o tomilho, orégãos, salsa e manjerição que apresentaram 2,13; 11,8; 1,12 e 2,23 mg de equivalentes de ácido gálico/g de extrato, respetivamente.

No presente estudo verifica-se não existir uma correlação entre a atividade antioxidante do extrato de carqueja e a quantidade de compostos fenólicos. Provavelmente, a quantidade reduzida de compostos fenólicos deveu-se às condições de extração não serem as mais adequadas para esta planta. Segundo Shahidi e Liyana-Pathirana (2005), a seleção de condições apropriadas é crucial para a extração de compostos fenólicos, já que essas variam de acordo com a natureza dos compostos fenólicos presentes nas plantas. Pimenta (2012) ao avaliar a influência da época de colheita e do tempo de extração na preparação de extratos aquosos de *Pterospartum tridentatum* verificou não existir uma relação direta entre o teor de polifenóis e a atividade antioxidante para os diferentes extratos.

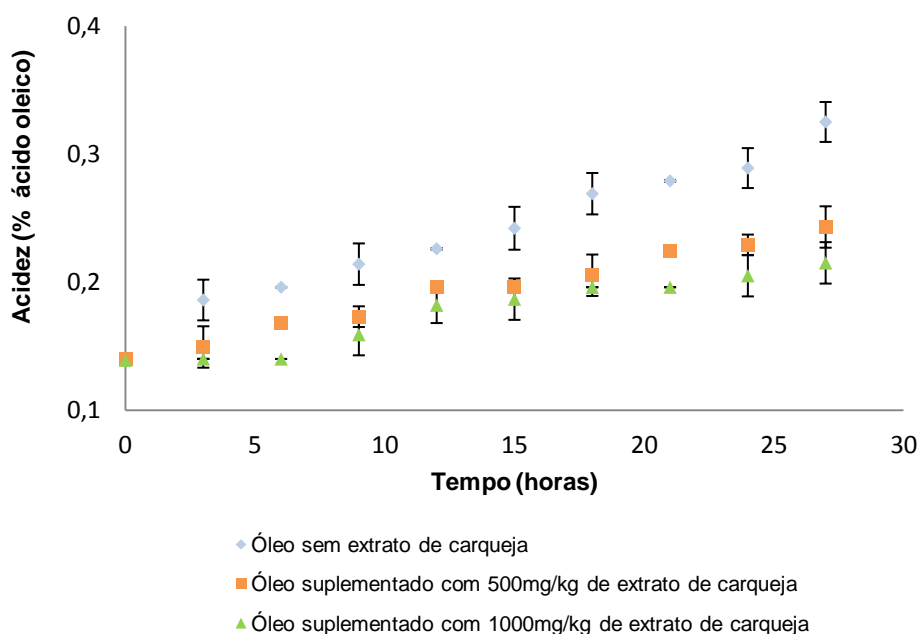
#### **4.3. Avaliação da estabilidade físico-química do óleo alimentar com e sem a adição de extrato de carqueja**

Com o intuito de avaliar a estabilidade físico-química do óleo sem extrato e do óleo suplementado com extrato de carqueja em concentrações diferentes (500 e 1000mg/Kg) foram efetuadas análises, em triplicado, ao longo de 27h de aquecimento a 180°C e durante 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente. É de salientar que o processo de aquecimento foi descontínuo e incluiu 3 ciclos de 9h, com recolha de amostra para análise ao fim de cada 3h.

### 4.3.1. Acidez

A determinação da acidez visa quantificar os ácidos gordos livres presentes nos óleos. É uma medida expressa em percentagem de ácido oleico e representa um dos mais importantes indicadores de deterioração de óleos durante o aquecimento. Uma grande quantidade de ácidos gordos na forma livre indica que o óleo foi sujeito a processo de hidrólise. É de salientar que, além de ácidos gordos livres, a hidrólise promove a formação de ácidos orgânicos de cadeia curta, nomeadamente, aldeídos e cetonas que conduzem à rancificação dos óleos (Jorge, 2010). A acidez de um óleo não é uma característica intrínseca mas uma variável relacionada com a natureza, qualidade da matéria-prima, grau de pureza, processamento e, principalmente, com as condições de conservação do óleo (Farhoosh *et al.*, 2009).

Na figura 4.3.1 é possível observar a evolução da acidez no óleo alimentar sem adição de extrato de carqueja e no óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato ao longo do processo de aquecimento.



**Figura 4.3.1.** Evolução da acidez, ao longo do tempo de aquecimento ( $T=180^{\circ}\text{C}$ ), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja ( $n=3 \pm$  desvio padrão).

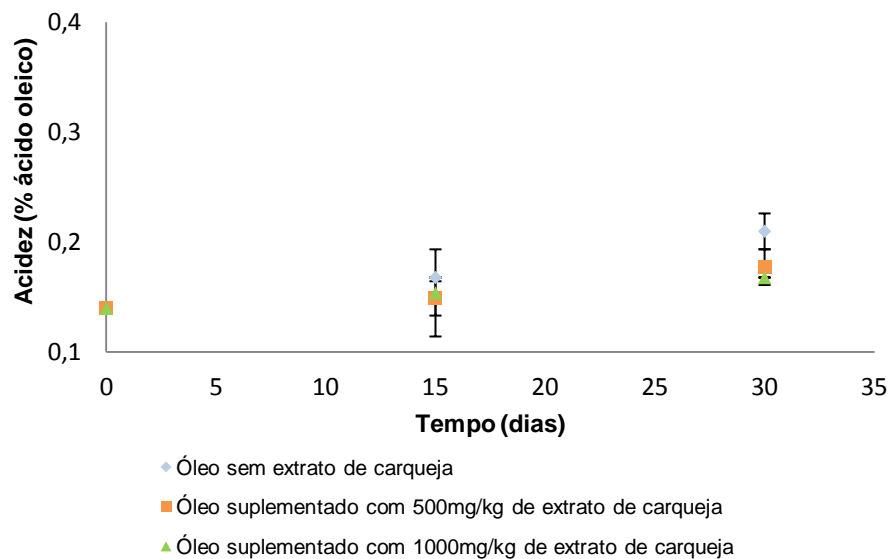
Quando comparados os resultados para a acidez do óleo sem extrato e dos óleos suplementados com 500 e 1000mg/kg de extrato de carqueja verificou-se que ao longo de 27h de aquecimento o teor de ácidos gordos aumentou 56,9% no óleo sem extrato e 42,4% e 35,3% nos óleos suplementados com 500 e 1000mg/kg, respetivamente.

Observa-se que o aumento de ácidos gordos livres é menos acentuado no óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato, evidenciando o seu efeito na redução da acidez do óleo.

Os resultados apresentados demonstram a existência de um aumento da acidez ao longo do tempo de aquecimento, sugerindo que o óleo sofreu reações de hidrólise originando ácidos gordos livres. Um acréscimo do teor de ácidos gordos livres no meio de aquecimento torna o óleo mais ácido. Este facto era expectável uma vez que os sucessivos ciclos de aquecimento e a elevada temperatura (180°C) no processo influenciam ativamente as reações hidrolíticas dos triacilgliceróis originando ácidos gordos livres e glicerol.

Um aumento do teor de ácidos gordos ao longo de 30 minutos de aquecimento a 180°C foi também observado por Bensmira *et al.* (2007) com óleo de girassol (incremento de c.a. 18,36 %), óleo de girassol suplementado com extrato de lavanda (11,1%) e com óleo de girassol suplementado com extrato de tomilho (11,6%). É notório o efeito de ambos os extratos na redução do teor de ácidos gordos, comparativamente ao controlo. No entanto, não se evidenciam diferenças significativas entre os extratos. Karoui *et al.* (2011) observaram um aumento do teor de ácidos gordos livres de 12,5% em óleo de milho e de 7,14% em óleo de milho suplementado com extrato de flores de tomilho, submetido a aquecimento (T=180°C) durante 30 minutos. À semelhança de Bensmira *et al.* (2007) é evidente o efeito do extrato de flores de tomilho na redução do teor de ácidos gordos do óleo suplementado em comparação com o controlo.

Na figura 4.3.2 está representada a evolução da acidez durante o armazenamento do óleo alimentar sem adição de extrato de carqueja e do óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato.



**Figura 4.3.2.** Evolução da acidez, ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja ( $n=3 \pm$  desvio padrão).

A análise dos resultados evidencia um aumento da acidez do óleo ao longo do tempo de armazenamento, sendo mais acentuado no óleo sem extrato (acrécimo do teor de ácidos gordos livres de 33,3%), seguindo-se o óleo suplementado com 500mg/kg (20,9%) e 1000mg/kg (16,6%) de extrato. Tal como foi demonstrado nos resultados referentes ao aquecimento, o óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato de carqueja apresentou menor teor de ácidos gordos livres comparativamente ao óleo sem extrato e ao óleo suplementado com 500mg/kg de extrato, revelando também o seu efeito na redução da acidez à temperatura ambiente. Verifica-se que o aumento dos ácidos gordos livres e, conseqüentemente, a acidez do óleo foi menor comparativamente ao processo de aquecimento, o que já era esperado uma vez que à temperatura ambiente as reações de hidrólise ocorrem lentamente (Moretto e Fett, 1998).

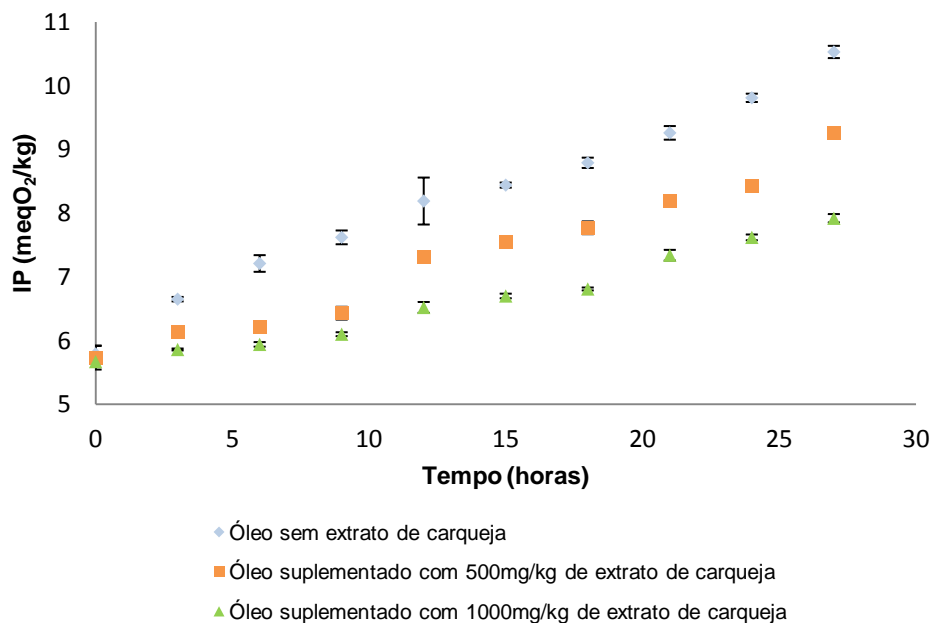
#### 4.3.2. Índice de peróxidos

O índice de peróxidos (IP) avalia a concentração de peróxidos e hidroperóxidos formados na fase inicial da oxidação lipídica, sendo o método mais comum para detectar a rancificação em óleos. Expressa-se em miliequivalente de oxigênio ativo por quilograma (Zhang *et al.* 2009).

Os peróxidos são os produtos iniciais da oxidação de óleos com formação de radicais livres e, conseqüentemente, de radicais peróxido. Os radicais livres formados provocam novas reações de oxidação, gerando a multiplicação de radicais livres e peróxido. Os radicais peróxido possuem baixa estabilidade oxidativa, decompondo-se em produtos secundários da oxidação, nomeadamente, aldeídos, álcoois, cetonas e hidrocarbonetos que são voláteis e responsáveis pelo odor a ranço (Casal *et al.*, 2010). A presença de peróxidos em óleos é indício da sua deterioração. No entanto, um nível baixo destes compostos não é garantia de boa estabilidade oxidativa (Silva *et al.*, 1999). Com efeito, segundo Morales *et al.* (1997), não existe uma correlação efetiva entre o IP e a estabilidade oxidativa de óleos, sendo necessário investigar a formação de compostos secundários de oxidação.

A peroxidação é um processo autocatalítico e uma vez iniciado desenvolve-se em cadeia. Fatores como a disponibilidade de oxigênio, a temperatura, a humidade, a presença de luz e iões metálicos podem influenciar a formação de peróxidos (Silva *et al.*, 1999).

A figura 4.3.3 mostra a evolução do IP ao longo do processo de aquecimento do óleo alimentar sem adição de extrato de carqueja e suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato.



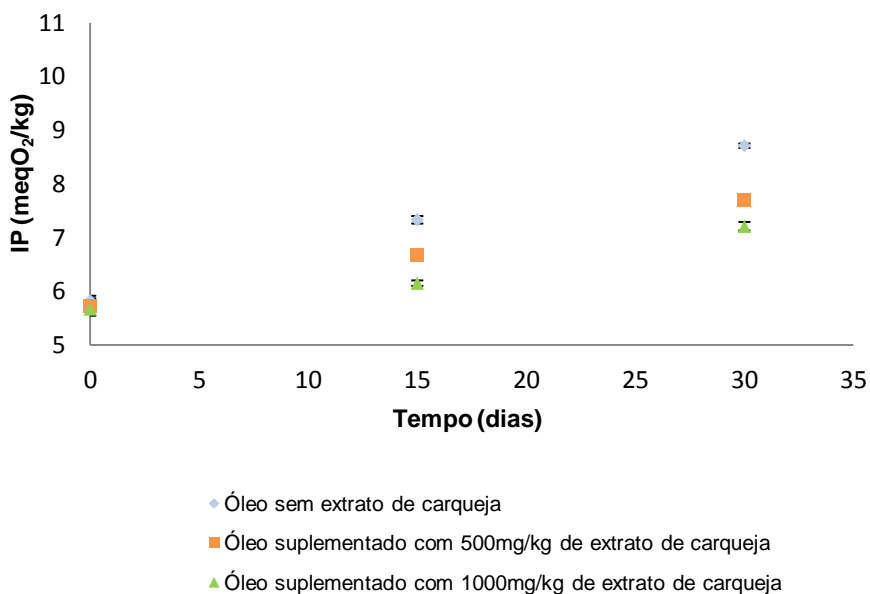
**Figura 4.3.3.** Evolução do índice de peróxidos, ao longo do tempo de aquecimento ( $T=180^{\circ}\text{C}$ ), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja ( $n=3 \pm$  desvio padrão).

Pela análise dos resultados observa-se um aumento do IP ao longo de 27h de aquecimento, sendo no óleo sem extrato de cerca de 45% e no óleo suplementado com 500mg/kg e 1000mg/kg de 38,1% e 28,4%, respetivamente. Estes resultados sugerem que o óleo à temperatura de  $180^{\circ}\text{C}$  sofreu oxidação e, conseqüentemente, houve a formação de peróxidos e hidroperóxidos. No óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato verifica-se um aumento menos acentuado do IP, indicando que a adição de extrato de carqueja ao óleo alimentar tem efeito na estabilidade oxidativa do óleo.

O aumento do IP em óleos suplementados com extratos de plantas, ao longo do tempo de aquecimento, foi comprovado por vários investigadores. Nor *et al.* (2008) ao estudarem o efeito da adição de 0,1%; 0,2%; 0,3% e 0,4% de extrato de folhas de *Pandanus amaryllifolius* ao óleo de palma, submetido a aquecimento ( $T=180^{\circ}\text{C}$ ) durante 32 horas, verificaram um aumento do IP, sendo mais acentuado no óleo sem extrato e menos no óleo com 0,4% de extrato de folhas de *Pandanus amaryllifolius*, evidenciando o efeito do extrato na redução deste parâmetro. Buta *et al.* (2013) observaram um aumento do IP em óleo de girassol, sob aquecimento a  $180^{\circ}\text{C}$  durante 16 horas, suplementado com diferentes concentrações de extrato de tomilho (200, 600 e 1000ppm), sendo mais acentuado no óleo sem extrato seguindo-se o óleo suplementado com 200ppm, 600ppm e 1000ppm. É evidente o efeito da adição de extrato de tomilho na diminuição do IP. Bensmira *et al.* (2007) observaram um aumento do índice de peróxidos no óleo de girassol (c.a. 58,2%) e nos óleos suplementados com tomilho (c.a. 30,4%) e lavanda (c.a.

29,6%), submetidos a aquecimento a 180°C durante 30 minutos. Os resultados demonstram não existirem diferenças significativas entre os extratos, pelo que a adição de ambos tem influência na redução do índice de peróxidos.

A figura 4.3.4 apresenta a evolução do IP durante o armazenamento do óleo alimentar sem adição de extrato de carqueja e do óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato.



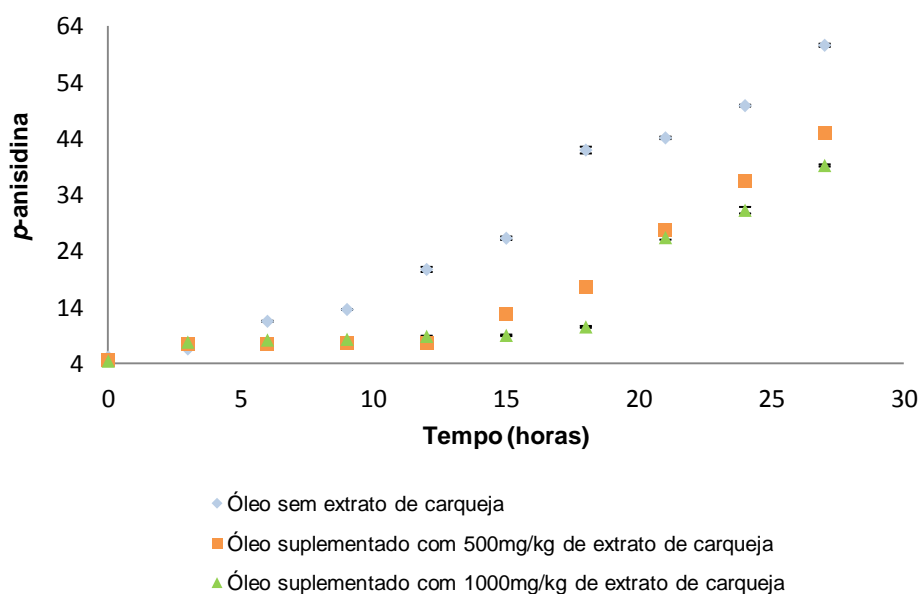
**Figura 4.3.4.** Evolução do índice de peróxidos, ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja ( $n=3 \pm$  desvio padrão).

Verifica-se um aumento do IP ao longo de 30 dias de armazenamento, sendo de 33,2% no óleo sem extrato, de 25,6% no óleo suplementado com 500mg/kg e de 21,4% no óleo suplementado com 1000mg/kg. À semelhança dos resultados obtidos para o óleo submetido a aquecimento, observa-se um aumento menos evidente do IP no óleo armazenado à temperatura ambiente, comparativamente ao óleo submetido a processo de aquecimento, era expectável pois as temperaturas elevadas aceleram o processo de oxidação e, conseqüentemente, a formação de peróxidos (Zhang *et al.*, 2009).

### 4.3.3. Índice de *p*-anisidina

O índice de *p*-anisidina quantifica os compostos secundários, nomeadamente, os aldeídos formados pela decomposição de óleos durante o processo de aquecimento e complementa a informação obtida pela determinação do IP (Marmeset *et al.*, 2009). Este método, apesar de ser uma determinação empírica, está bem correlacionado com o nível de produtos secundários da oxidação (Casal *et al.*, 2010).

Na figura 4.3.5 está representada a evolução do índice de *p*-anisidina, durante o aquecimento a 180°C, do óleo alimentar sem adição de extrato de carqueja e do óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato.



**Figura 4.3.5.** Evolução do índice de *p*-anisidina ao longo do tempo de aquecimento (T=180°C), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja (n=3 ± desvio padrão).

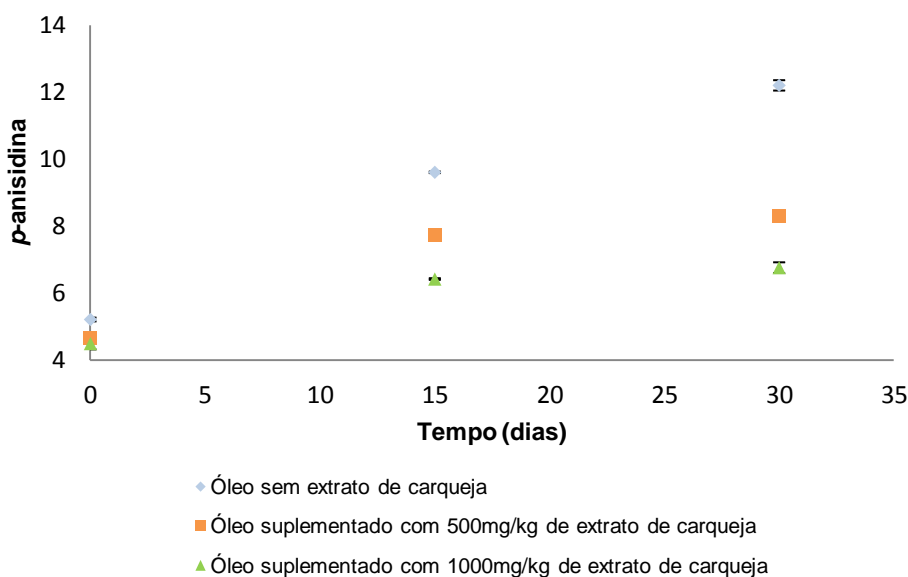
Os resultados demonstram que ao longo de 27 horas de aquecimento (T=180°C) o índice de *p*-anisidina aumentou 91,4% no óleo sem extrato, enquanto que no óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato de carqueja o acréscimo foi 89,6% e 88,6%, respetivamente. Verifica-se que a adição de extrato de carqueja diminuiu o valor de *p*-anisidina no óleo, embora a diferença entre o óleo suplementado e o óleo sem extrato seja reduzida (c.a. 1,8% entre o óleo suplementado com 500mg/kg e o óleo sem extrato; c.a. 2,8% entre o óleo suplementado com 1000mg/kg e o óleo sem extrato).

No óleo sem extrato e no óleo suplementado o aumento do índice de *p*-anisidina foi mais acentuado após 9 horas e 18 horas de aquecimento, respetivamente. Estes

resultados indiciam que os peróxidos e hidroperóxidos, devido à temperatura de aquecimento, foram decompostos em produtos secundários da oxidação, nomeadamente aldeídos (Marmeset *et al.*, 2009). É de salientar que a formação de compostos secundários da oxidação nos óleos suplementados demora o dobro do tempo a ocorrer comparativamente ao óleo sem extrato, evidenciando-se o efeito do extrato de carqueja na diminuição da formação destes compostos. Um elevado índice de *p*-anisidina é indicativo que o óleo está numa fase avançada de oxidação lipídica (Marmeset *et al.*, 2009).

O aumento do índice de *p*-anisidina ao longo do tempo de aquecimento a 180°C foi comprovado em estudos anteriores. Raza *et al.* (2014) verificaram um aumento do índice de *p*-anisidina em óleo de girassol submetido a aquecimento durante 60 minutos (incremento *c.a.* 94,4%) e em óleo de girassol suplementado com *Althea rosea* (*c.a.* 93,3%), *Chenopodium album* (*c.a.* 93,5%), *Cichorium intybus* (*c.a.* 85,5%) e *Fumaria indica* (*c.a.* 75%) submetidos às mesmas condições. Buta *et al.* (2013) observaram o aumento do índice de *p*-anisidina em óleo de girassol, sob aquecimento durante 16 horas, suplementado com diferentes concentrações de extrato de tomilho (200, 600 e 1000ppm), sendo que no óleo sem extrato o aumento foi mais pronunciado seguindo-se o óleo suplementado com 200ppm, 600ppm e 1000ppm.

A figura 4.3.6 evidencia a evolução do índice de *p*-anisidina do óleo alimentar sem adição de extrato de carqueja e do óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato durante 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente



**Figura 4.3.6.** Evolução do índice de *p*-anisidina, ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja ( $n=3 \pm$  desvio padrão).

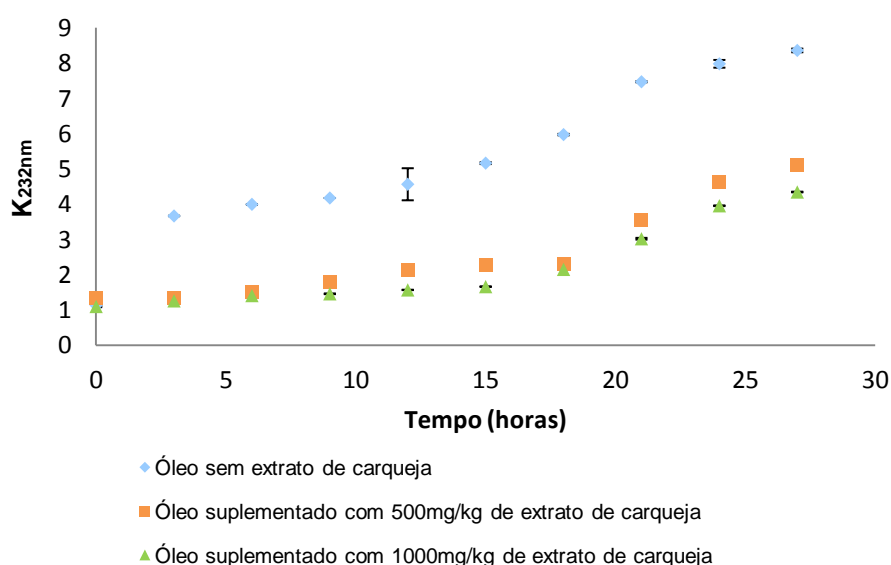
Os resultados mostram que houve um aumento do índice de *p*-anisidina durante o armazenamento, sendo mais acentuado no óleo sem extrato (c.a. 57,3%) seguindo-se o óleo suplementado com 500mg/kg (c.a. 43,8%) e o óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato de carqueja (c.a. 33,6%). É notório o efeito do extrato de carqueja na redução deste parâmetro também à temperatura ambiente. Observa-se que o aumento do índice de *p*-anisidina no óleo armazenado à temperatura ambiente foi menos acentuado do que no óleo aquecido a 180°C, sendo este resultado esperado visto que a temperaturas mais baixas a velocidade de formação de compostos secundários da oxidação é menor (Marmeset *et al.*, 2009). Zhang *et al.* (2009) verificaram igualmente o aumento do índice de *p*-anisidina durante o armazenamento (T=60°C, durante 21 dias) em óleo de girassol e em óleo de girassol suplementado com BHT, BHA, TBHQ e com extrato de alecrim. O aumento mais acentuado foi verificado no óleo sem suplementação, seguindo-se o óleo com BHT, BHA, extrato de alecrim e TBHQ.

#### **4.3.4. Análise espectrofotométrica no UV**

A análise espectrofotométrica na região do UV fornece informações sobre a qualidade de um óleo, o seu estado de conservação e as alterações causadas pelo seu processamento. É uma análise que está relacionada com os processos de oxidação (Casal *et al.*, 2010).

Durante o aquecimento de óleos ocorre a decomposição de ácidos gordos polinsaturados em peróxidos, verificando-se a migração de ligações duplas e, conseqüentemente, a formação de dienos conjugados que têm maior absorção a 232nm. Os compostos secundários de oxidação, incluindo os trienos conjugados, apresentam um máximo de absorção a 270nm (Fennema, 2000). O aumento da absorção na região do ultravioleta é proporcional à absorção de oxigénio e formação de peróxidos durante os estágios iniciais de oxidação, sendo as determinações do índice de peróxidos e de dienos conjugados indicadores bem estabelecidos da formação de produtos de oxidação primária em óleos (Kulas e Ackman, 2001).

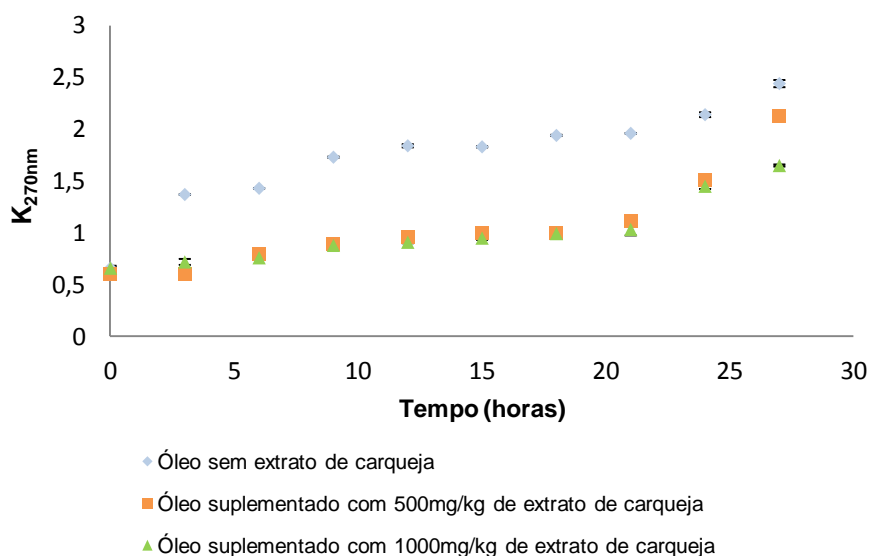
A figura 4.3.7 representa a evolução dos valores de  $K_{232nm}$  durante o aquecimento a 180°C, do óleo alimentar sem adição de extrato de carqueja e do óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato.



**Figura 4.3.7.** Evolução dos valores de  $K_{232nm}$  ao longo do tempo de aquecimento ( $T=180^{\circ}C$ ), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja ( $n=3 \pm$  desvio padrão).

Pela análise dos resultados observa-se que ao longo de 27h de aquecimento houve um aumento do coeficiente de extinção específica a 232nm ( $K_{232nm}$ ), sendo mais acentuado no óleo sem extrato (c.a. 86,5%) seguindo-se o óleo suplementado com 500mg/kg (c.a. 78,21%) e o óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato de carqueja (c.a. 74,7%). Os valores de  $K_{232nm}$  estão relacionados com a formação de compostos primários de oxidação, sendo que quanto maior o valor de  $K_{232}$  maior é a formação de compostos primários de oxidação (De Marco *et al.*, 2007). Os resultados demonstram que no óleo sem extrato a formação destes compostos é mais acentuada, ao contrário do verificado no óleo suplementado, evidenciando o efeito da adição de extrato de carqueja na estabilidade oxidativa do óleo. Raza *et al.* (2014) verificaram um aumento dos valores de  $K_{232nm}$  em óleo de girassol submetido a aquecimento a  $180^{\circ}C$  durante 60 minutos (incremento c.a. 89,9 %) e em óleo de girassol suplementado com *Althea rosea* (c.a. 86,7%), *Chenopodium album* (c.a. 85,9%), *Cichorium intybus* (c.a. 85,45%) e *Fumaria indica* (c.a. 75%) submetidos às mesmas condições.

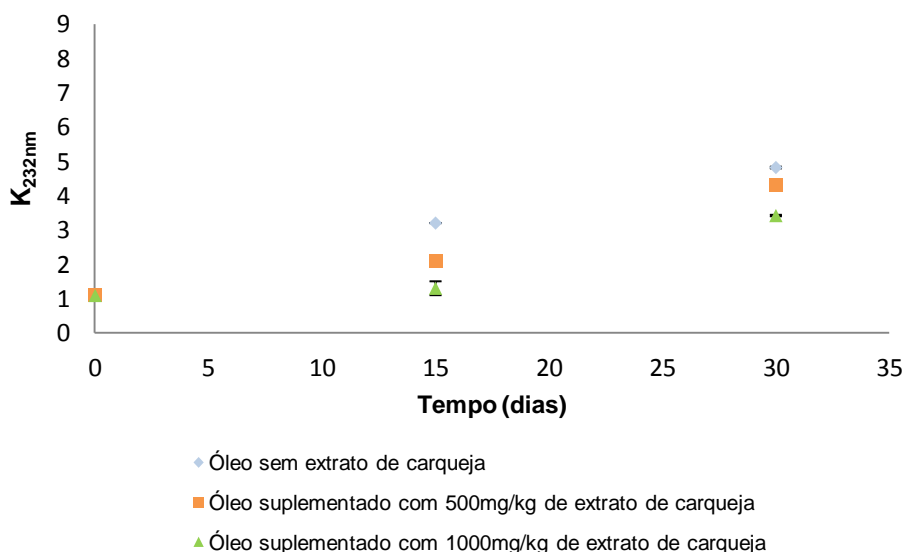
Na figura 4.3.8 está representada a evolução dos valores de  $K_{270nm}$  durante o aquecimento a  $180^{\circ}C$ , do óleo alimentar sem adição de extrato de carqueja e do óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato.



**Figura 4.3.8.** Evolução dos valores de  $K_{270nm}$  ao longo do tempo de aquecimento ( $T=180^{\circ}C$ ), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja ( $n=3 \pm$  desvio padrão).

Os resultados demonstram que ao longo de 27h de aquecimento o coeficiente de extinção específica a 270nm ( $K_{270nm}$ ) aumentou, sendo que no óleo sem extrato o acréscimo foi de 72,9% e no óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato foi de 71,6% e 60%, respectivamente. Este aumento está relacionado com a formação de produtos secundários de oxidação e de trienos conjugados (De Marco *et al.*, 2007). Verifica-se que o óleo sem extrato apresentou valores de  $K_{270nm}$  mais elevados do que o óleo suplementado, indicando que a formação de compostos secundários de oxidação é mais acentuada na ausência de extrato de carqueja. Por outro lado, o aumento menos acentuado nos óleos suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato de carqueja evidencia o seu efeito na estabilidade oxidativa do óleo. Raza *et al.* (2014) também verificaram um aumento dos valores de  $K_{270nm}$  em óleo de girassol submetido a aquecimento a  $180^{\circ}C$  durante 60 minutos (incremento *c.a.* 90,7%) e em óleo de girassol suplementado com *Althea rosea* (*c.a.* 87,7%), *Chenopodium album* (*c.a.* 86,4%), *Cichorium intybus* (*c.a.* 85,7%) e *Fumaria indica* (*c.a.* 84,9%) submetidos às mesmas condições.

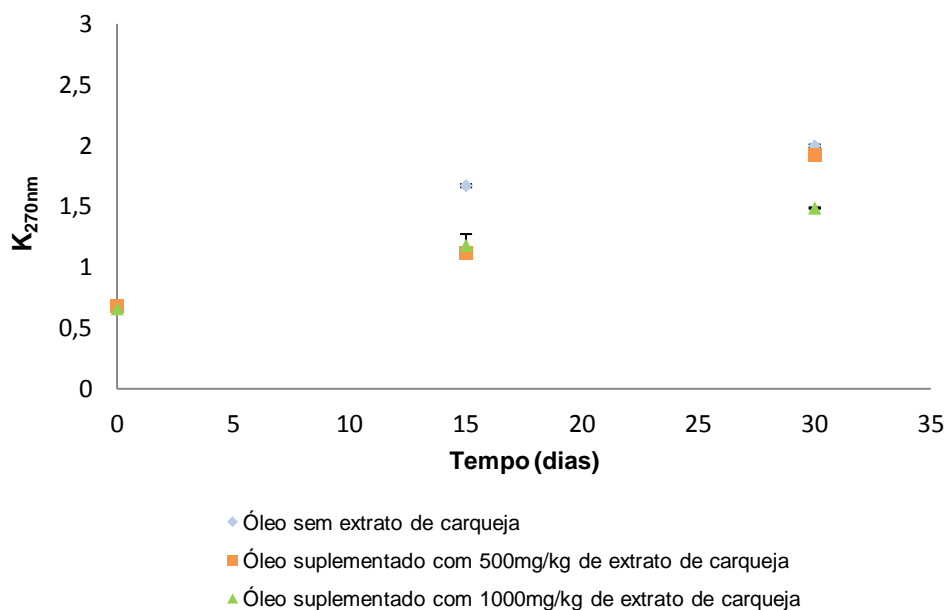
A figura 4.3.9 mostra a evolução dos valores de  $K_{232nm}$  durante o armazenamento do óleo alimentar sem adição de extrato de carqueja e do óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato.



**Figura 4.3.9.** Evolução dos valores de  $K_{232nm}$ , ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja ( $n=3 \pm$  desvio padrão).

A análise dos resultados evidencia um aumento dos valores de  $K_{232nm}$  ao longo de 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente, sendo mais acentuado no óleo sem extrato (c.a. 77%) e menos no óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato (c.a. 67,9%). Quanto maior o aumento dos valores de  $K_{232nm}$  ao longo do tempo maior é a formação de compostos primários de oxidação (Fennema, 2000). Observa-se que a adição de extrato de carqueja ao óleo também influencia a redução dos valores de  $K_{232nm}$  à temperatura ambiente. Comparando os valores de  $K_{232nm}$  com os obtidos para o óleo sob aquecimento verifica-se que existe uma diferença de 16,5% no óleo sem extrato e de 6,8% no óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato de carqueja. Estes resultados eram espectáveis visto que à temperatura de aquecimento ( $T=180^{\circ}C$ ) a formação de produtos primários de oxidação é mais acentuada (Fennema, 2000). Raza *et al.* (2009) verificaram um aumento dos compostos primários de oxidação de 82,3% no óleo de girassol sem extrato e de 69% no óleo de girassol suplementado com óleo essencial de centela (*Centella asiatica*), armazenado à temperatura ambiente ( $20^{\circ}C$ ) durante 7 semanas.

A figura 4.3.10 apresenta a evolução dos valores de  $K_{270nm}$  durante o armazenamento do óleo alimentar sem adição de extrato de carqueja e do óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato.



**Figura 4.3.10.** Evolução dos valores de  $K_{270nm}$ , ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja ( $n=3 \pm$  desvio padrão).

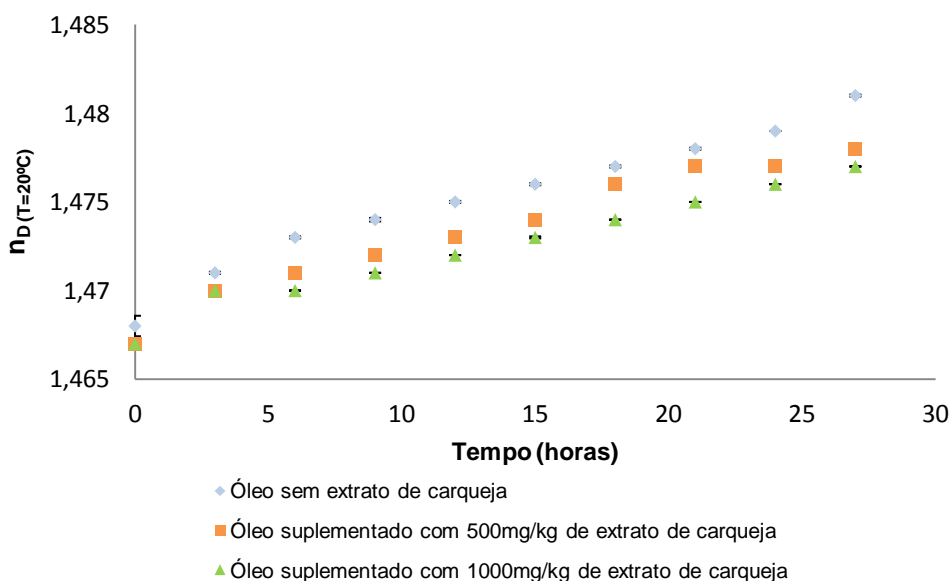
Os resultados mostram que ao longo do tempo de armazenamento houve um aumento dos valores de  $K_{270nm}$  de 66,3% no óleo sem extrato e de 64,6% e 49,3% no óleo suplementado com 500mg/kg de extrato e no óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato, respetivamente. Observa-se que no óleo sem extrato a formação de compostos secundários de oxidação é mais acentuada, indicando um nível de oxidação avançado. Por outro lado, no óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato de carqueja a formação destes compostos é menor, verificando-se o efeito da adição do extrato na estabilidade oxidativa do óleo. Comparativamente aos valores de  $K_{270nm}$  obtidos com o óleo submetido a aquecimento verifica-se uma diminuição de 6,6% no óleo sem extrato, de 7% no óleo suplementado com 500mg/kg de extrato e de 10,7% no óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato. Estes resultados eram expectáveis uma vez que a elevadas temperaturas as reações oxidativas ocorrem rapidamente e, conseqüentemente, a formação de compostos secundários de oxidação é mais acentuada. A ocorrência de oxidação à temperatura ambiente e a 180°C difere apenas no facto de a 180°C os compostos primários de oxidação serem rapidamente degradados em compostos secundários (Warner, 2002). Raza *et al.* (2009) observaram um incremento de compostos secundários de oxidação de 81,5% no óleo de girassol sem extrato e de 72,5% no óleo

de girassol suplementado com óleo essencial de centela (*Centella asiatica*), armazenado à temperatura ambiente (20°C) durante 7 semanas.

#### 4.3.5. Índice de refração

O índice de refração é a relação entre a velocidade da luz no vácuo e a velocidade da luz na substância testada (Gray, 1978). Este parâmetro é muito usado como critério de qualidade e identidade, visto que é característico de cada tipo de óleo (Gertz, 2000). Para além disso, é indicador para determinar a concentração de polímeros e está relacionado com o grau de insaturação, compostos de oxidação e tratamento térmico. Durante o aquecimento prolongado de óleos há formação de dienos conjugados e polímeros, os quais podem acarretar o aumento do índice de refração ao longo do processo (Jorge *et al.*, 2005).

Na figura 4.3.11 está representada a evolução do índice de refração durante o aquecimento a 180°C, do óleo alimentar sem adição de extrato de carqueja e do óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato.

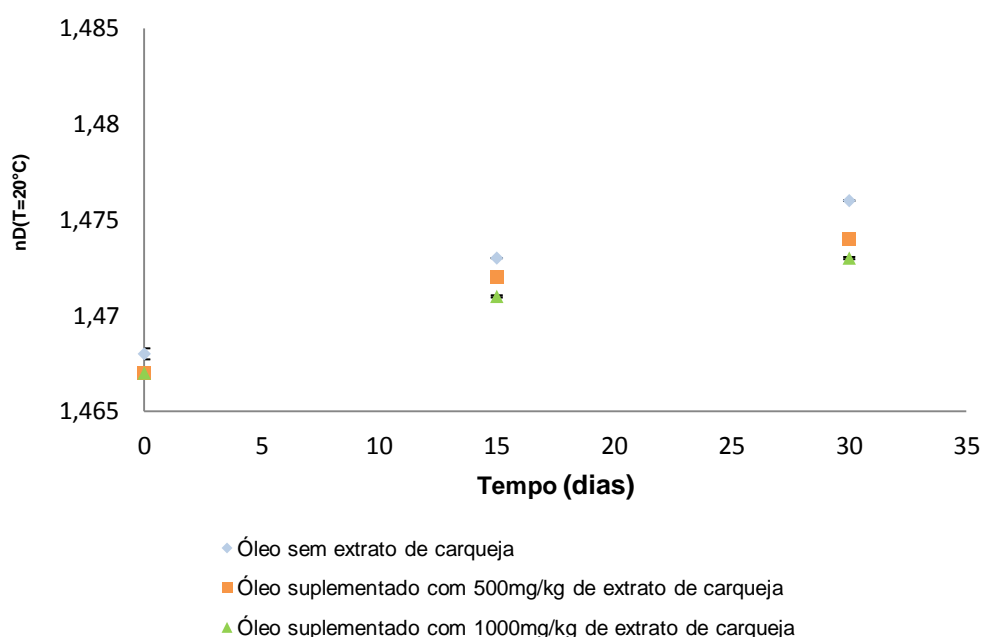


**Figura 4.3.11.** Evolução do índice de refração ao longo do tempo de aquecimento ( $T=180^\circ\text{C}$ ), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja ( $n=3 \pm$  desvio padrão).

A análise dos resultados evidencia um aumento do índice de refração ao longo de 27 horas de aquecimento, sendo mais acentuado no óleo sem extrato (c.a. 0,87%) seguindo-se o óleo suplementado com 500mg/kg (c.a. 0,74%) e 1000mg/kg de extrato (c.a. 0,67%). Observa-se que no óleo sem extrato a formação de compostos oriundos da oxidação,

nomeadamente dienos conjugados e polímeros, é mais acentuada do que no óleo suplementado, verificando-se o efeito do extrato de carqueja na redução do índice de refração. Quanto maior o índice de refração do óleo maior é o grau de oxidação e, conseqüentemente, o seu estado de deterioração (Gray, 1978).

A figura 4.3.12 evidencia a evolução do índice de refração durante o armazenamento do óleo alimentar sem adição de extrato de carqueja e do óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato.



**Figura 4.3.12.** Evolução do índice de refração, ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja ( $n=3 \pm$  desvio padrão).

Os resultados demonstram que ao longo de 30 dias de armazenamento houve um aumento do índice de refração de 0,54% no óleo sem extrato, 0,47% no óleo suplementado com 500mg/kg de extrato e 0,41% no óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato. Verifica-se que o óleo sem extrato apresenta um grau de oxidação mais elevado, ao contrário do óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato, constatando-se o efeito do extrato de carqueja na diminuição do índice de refração do óleo armazenado à temperatura ambiente. Comparativamente aos valores de índice de refração obtidos com o óleo submetido a aquecimento ( $T=180^{\circ}\text{C}$ ) observa-se uma diminuição de 0,33% no óleo sem extrato e de 0,27% e 0,26% no óleo suplementado com 500mg/kg e 1000mg/kg de extrato de carqueja, respetivamente. Estes resultados eram esperados visto que à

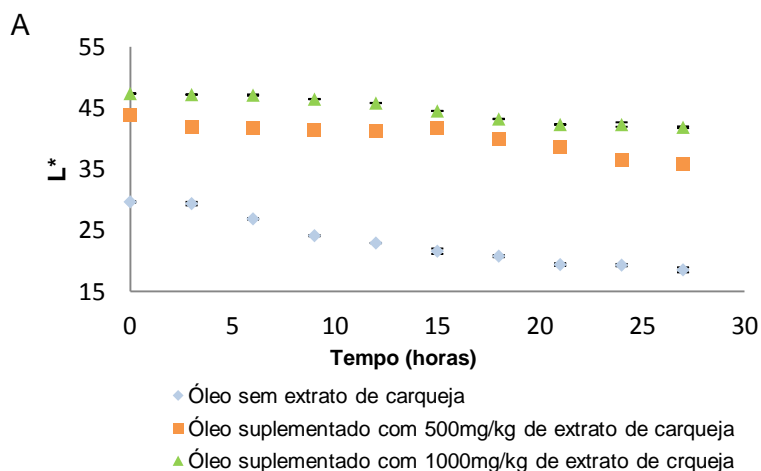
temperatura ambiente as reações de oxidação e, conseqüentemente a formação de produtos de oxidação, ocorrem mais lentamente (Gray, 1978).

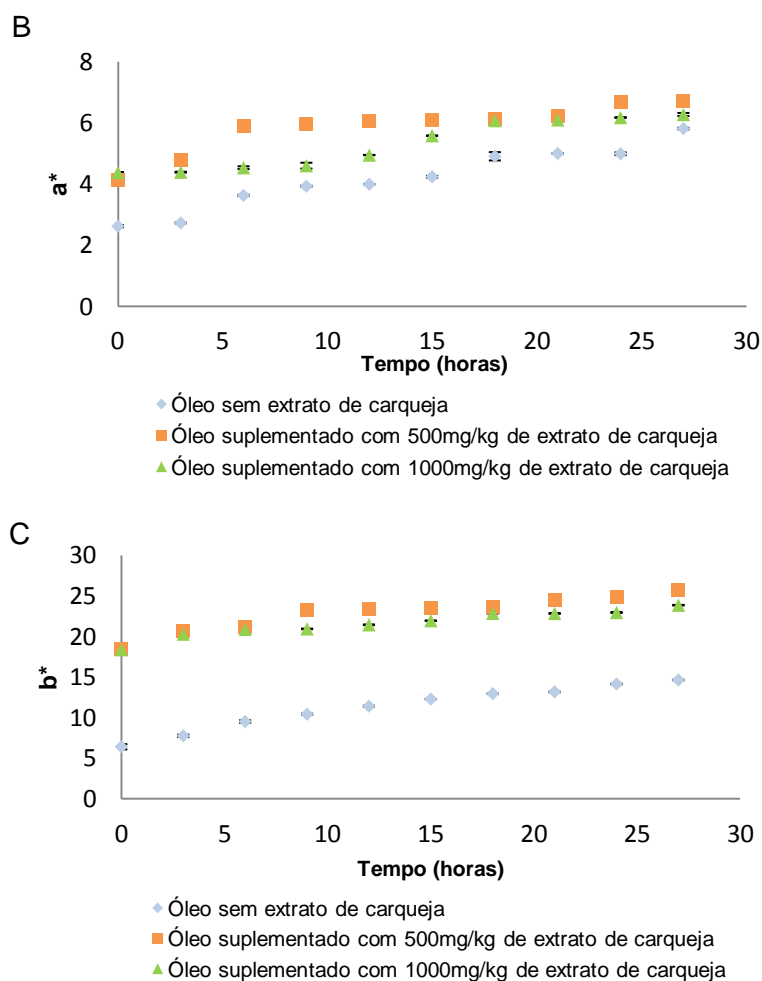
#### 4.3.6. Cor

A cor resulta da interação física de uma fonte de energia com um objeto e depende da visão do observador. Assume extrema importância na aceitabilidade de um produto por parte do consumidor e pode relacionar-se com outros atributos de qualidade e de defeito, ajudando de forma indireta no controle destes (Gertz, 2000).

A *Comission International d'Eclairaige* (CIE) define cor como a percepção visual de um objeto que um observador distingue mediante o tamanho, forma, textura, posição e brilho, os quais dependem da posição espectral da luz incidente e da geometria ótica da visualização (Gertz, 2000). O sistema de cor CIE transforma o espectro de reflexão ou transmissão da amostra num espaço de cor tridimensional usando a distribuição espectral de potência do iluminante e a correspondência às cores dos padrões observados. Este sistema, também conhecido por CIELAB, é atualmente o mais usado na indústria alimentar e a medição da cor é feita mediante a leitura dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ , que distinguem intervalos de cores primárias. O parâmetro  $L^*$  mede a luminosidade e varia entre zero (preto) e cem (branco); o parâmetro  $a^*$  apresenta o desvio da cor entre o verde (valores negativos) e o vermelho (valores positivos) e o parâmetro  $b^*$  apresenta o desvio entre o azul (valores negativos) e o amarelo (valores positivos) (Gertz, 2000).

A figura 4.3.13 representa a evolução dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  durante o aquecimento a 180°C, do óleo alimentar sem adição de extrato de carqueja e do óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato.





**Figura 4.3.13.** Evolução dos parâmetros L\* (Figura A), a\* (Figura B) e b\* (Figura C) ao longo do tempo de aquecimento (T=180°C), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja (n=3 ± desvio padrão).

A análise dos resultados mostra que o óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato de carqueja, apesar de seguir uma tendência semelhante ao óleo sem extrato, apresenta valores substancialmente diferentes que podem ser explicados pela migração de compostos da carqueja durante o processo de suplementação. Esses compostos podem ser ácidos orgânicos, compostos fenólicos, pigmentos (clorofilas e carotenóides), óleos essenciais entre outros que influenciam a cor dos óleos (Ribeiro *et al.* 2000).

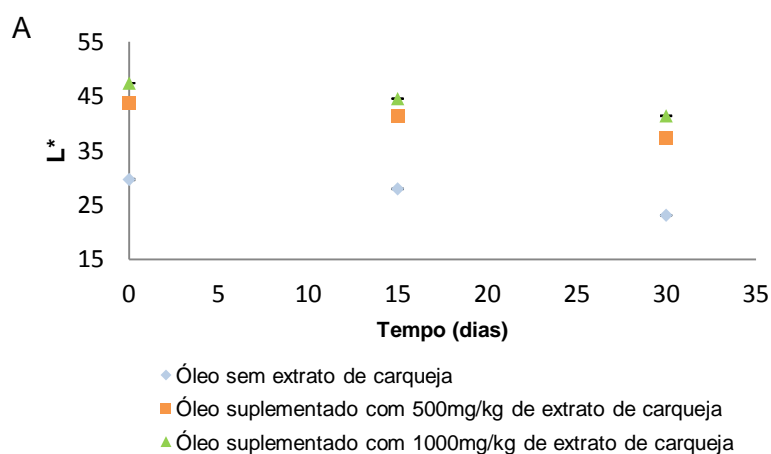
Em termos de luminosidade (L\*) os resultados demonstram um decréscimo do parâmetro L\* ao longo de 27 horas de aquecimento, sendo mais acentuado no óleo sem extrato (c.a. 38,45%) e menos no óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato (c.a. 11,65%), evidenciando que a adição de extrato de carqueja ao óleo alimentar influencia positivamente este parâmetro. Ao longo do tempo de aquecimento todos os óleos analisados ficaram mais escuros, o que era expectável uma vez que a temperatura

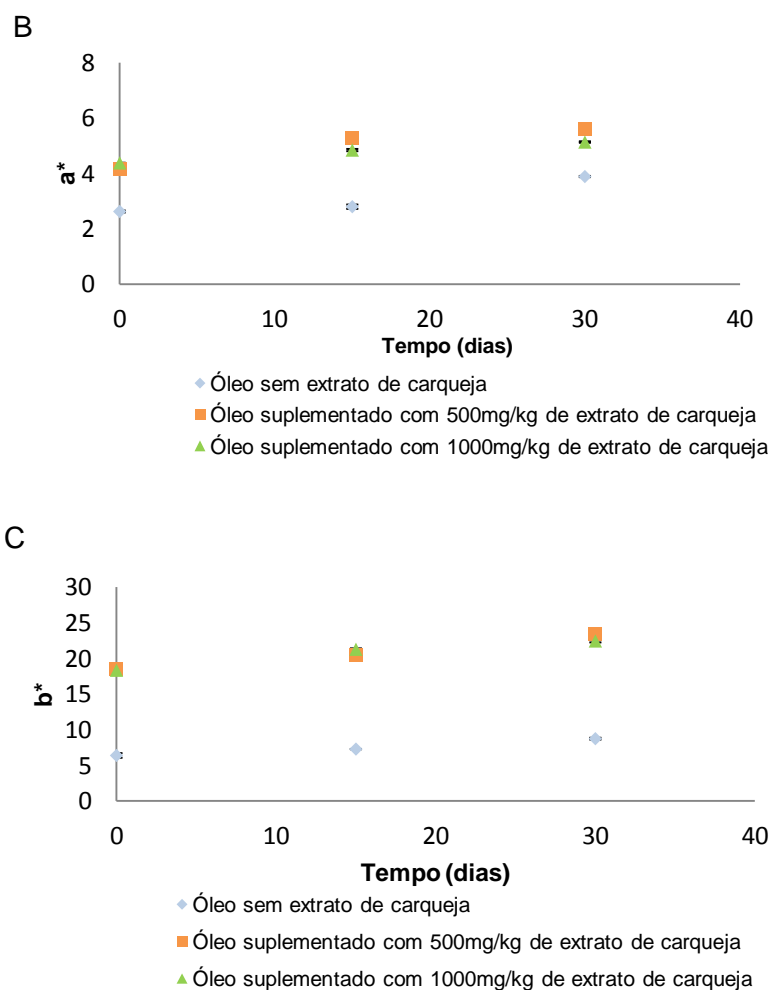
( $T=180^{\circ}\text{C}$ ) do processo de aquecimento propicia as reações de oxidação e, conseqüentemente, a formação de compostos como os ácidos carboxílicos que causam alterações na cor dos óleos (Fennema, 2000).

No que respeita ao parâmetro  $a^*$  os resultados evidenciam um aumento de 54,8% no óleo sem extrato, e de 38,2% e 30,3% no óleo suplementado com 500mg/kg e 1000mg/kg de extrato respetivamente, comprovando-se o efeito do extrato de carqueja na diminuição deste parâmetro. Observa-se que ao longo de 27 horas de aquecimento o parâmetro  $a^*$  aumentou, indicando a tendência para a cor vermelha. Este facto pode ser explicado pela ocorrência de isomerização das duplas ligações, induzindo a migração e formação de ligações duplas conjugadas, as quais absorvem maiores quantidades de luz e, conseqüentemente, intensificam a cor alaranjada nos óleos (Lawson, 1995).

Para o parâmetro  $b^*$  verificou-se um aumento de 56,2% no óleo sem extrato, 28,1% no óleo suplementado com 500mg/kg de extrato e 22,9% no óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato. O aumento do parâmetro  $b^*$  ao longo do aquecimento reflete a intensificação da tonalidade amarela característica dos óleos, indiciando a ocorrência de fotoxidação ou oxidação. No presente estudo a fotoxidação é minimizada com o armazenamento do óleo em frascos de vidro âmbar protegidos da luz. Assim, o aumento verificado pode dever-se, essencialmente, à ocorrência de oxidação numa fase avançada (terminação) com formação de compostos estáveis responsáveis pela intensificação da cor amarela (Fennema, 2000).

A figura 4.3.14 mostra a evolução dos parâmetros  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  durante o armazenamento do óleo alimentar sem adição de extrato de carqueja e do óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato.





**Figura 4.3.14.** Evolução dos parâmetros L\* (Figura A), a\* (Figura B) e b\* (Figura C), ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja ( $n=3 \pm$  desvio padrão).

A diminuição da luminosidade (L\*) foi mais acentuada no óleo sem extrato (22,2%), indicando que se encontrava mais escuro e, conseqüentemente, mais oxidado. Por outro lado, no óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato a diminuição do parâmetro L\* foi menor (12,7%), comprovando-se o efeito positivo do extrato de carqueja neste parâmetro. Comparando estes resultados com os obtidos para o óleo submetido ao processo de aquecimento ( $T=180^{\circ}\text{C}$ ) observa-se uma diminuição do parâmetro L\* no óleo sem extrato (c.a. 34%), no óleo suplementado com 500mg/kg de extrato (c.a. 13,2%) e no óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato (c.a. 10,2%). Estes resultados eram esperados uma vez que à temperatura ambiente as reações de oxidação ocorrem de forma mais

lenta e, conseqüentemente, a formação de ácidos carboxílicos insaturados responsáveis pelo escurecimento dos óleos é menor (Fennema, 2000).

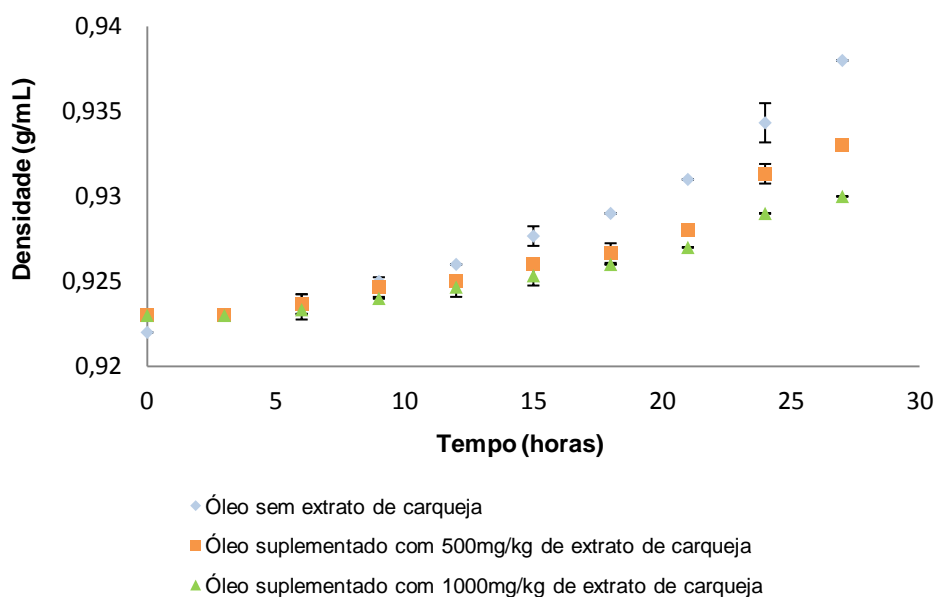
Para o parâmetro  $a^*$  observou-se um aumento de 32,3% no óleo sem extrato e de 26,4% e 14,4% no óleo suplementado com 500mg/kg e 1000mg/kg de extrato, respectivamente. Comparando estes resultados com os obtidos para o parâmetro  $a^*$  em óleo submetido a aquecimento ( $T=180^{\circ}\text{C}$ ) verifica-se um decréscimo de 22,5% no óleo sem extrato, 11,8% no óleo suplementado com 500mg/kg de extrato e 15,9% no óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato. É possível constatar que à temperatura ambiente a ocorrência de isomerização das duplas ligações é menor e, conseqüentemente, a migração e formação de ligações duplas conjugadas que intensificam a cor alaranjada nos óleos é reduzida (Lawson, 1995).

No que diz respeito ao parâmetro  $b^*$  os resultados mostram um aumento de 26,9% no óleo sem extrato, 21,3% e 18,2%, respectivamente, nos óleos suplementados com 500mg/kg e 1000mg/kg de extrato. Observa-se que a adição de extrato de carqueja ao óleo alimentar armazenado à temperatura ambiente também tem efeito na redução deste parâmetro. Comparando os resultados com os resultados obtidos para o parâmetro  $b^*$  dos óleos sob aquecimento a  $180^{\circ}\text{C}$  verifica-se uma diminuição de 29,3%; 6,8% e 4,7%, respectivamente, no óleo sem extrato; no óleo suplementado com 500mg/kg e no óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato. Isto era expectável uma vez que à temperatura o processo de oxidação é lento e, conseqüentemente, formação de compostos estáveis responsáveis pela intensificação da cor amarela é menor (Fennema, 2000).

#### **4.3.7. Densidade**

A densidade define-se como o quociente entre a massa e o volume de um corpo e mede o grau de concentração de massa em determinado volume (Femmena, 2000). Com a evolução das reações de degradação de um óleo as quebras das ligações duplas originam moléculas mais saturadas, facilitando o agrupamento espacial. A quantidade de moléculas por unidade de volume aumenta na composição do óleo, resultando no aumento da densidade. Este aumento está ainda estreitamente relacionado com as reações de polimerização (Femmena, 2000).

Na figura 4.3.15 está representada a evolução da densidade durante o aquecimento a  $180^{\circ}\text{C}$  do óleo sem adição de extrato de carqueja e do óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato.

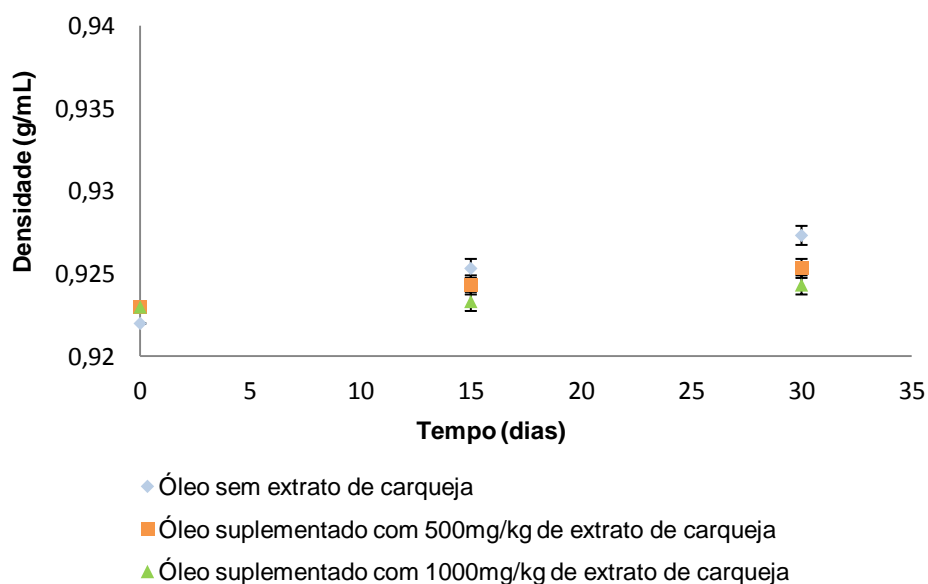


**Figura 4.3.15.** Evolução da densidade ao longo do tempo de aquecimento ( $T=180^{\circ}\text{C}$ ), em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja ( $n=3 \pm$  desvio padrão).

No tempo inicial existe uma ligeira diferença entre a densidade do óleo sem extrato ( $0,922\text{g/mL}$ ) e do óleo suplementado com extrato de carqueja ( $0,923\text{g/mL}$ ), que pode ser explicada pela migração de compostos da carqueja para o óleo durante a suplementação.

Ao longo de 27h de aquecimento observa-se um ligeiro aumento da densidade, sendo mais acentuado no óleo sem extrato (*c.a.* 1,7%), seguindo-se o óleo suplementado com 500mg/kg (*c.a.* 1,1%) e o óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato (*c.a.* 0,75%). Verifica-se que a adição de extrato de carqueja ao óleo alimentar sob aquecimento tem influência na diminuição deste parâmetro. O aumento da densidade nos óleos é indício de oxidação, visto que este parâmetro está relacionado com a formação de polímeros (Femmena, 2000). Assim, quanto mais acentuado for o aumento da densidade do óleo ao longo do processo de aquecimento maior é o grau de oxidação.

Na figura 4.3.16 está representada a evolução da densidade durante o armazenamento à temperatura ambiente do óleo alimentar sem adição de extrato de carqueja e do óleo suplementado com 500 e 1000mg/kg de extrato.



**Figura 4.3.16.** Evolução da densidade, ao longo do tempo de armazenamento à temperatura ambiente, em amostras de óleo com e sem adição de extrato de carqueja,  $n=3 \pm$  desvio padrão.

Os resultados mostram que ao longo de 30 dias de armazenamento à temperatura ambiente houve um aumento da densidade, sendo mais acentuado no óleo sem extrato (c.a. 0,65%) e menos no óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato (c.a. 0,11%), observando-se o efeito do extrato de carqueja na redução deste parâmetro. Comparativamente aos valores de densidade obtidos para o óleo submetido a aquecimento ( $T=180^{\circ}\text{C}$ ) verifica-se um ligeiro decréscimo, de 0,5% no óleo sem extrato e de 0,1% no óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato. Estes resultados eram esperados visto que à temperatura ambiente não há uma formação relevante de polímeros (Femmena, 2000). Existem diferenças substanciais entre as alterações oxidativas originadas a baixas e a elevadas temperaturas, no entanto em ambos os casos a via principal de obtenção de compostos de alteração inclui a formação de peróxidos (Frankel, 1991). A temperaturas baixas a velocidade de formação de peróxidos é maior que a sua decomposição e, portanto, os compostos formados são essencialmente monómeros e triacilgliceróis oxidados. Ao contrário, a elevadas temperaturas a velocidade de decomposição de peróxidos é maior que a sua formação, resultando numa concentração praticamente nula e os principais compostos formados são dímeros e polímeros (Nawar, 1984).

## **5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPETIVAS FUTURAS**

No presente trabalho estudou-se a estabilidade físico-química de óleo alimentar suplementado com extrato etanólico de carqueja (*Pterospartum tridentatum*) na concentração de 500 mg/Kg e de 1000 mg/Kg.

Os parâmetros químicos (acidez, índice de peróxidos, índice de *p*-anisidina e absorvâncias no UV) e físicos (índice de refração, cor e densidade) analisados aumentaram, com exceção da cor, no decurso do processo de aquecimento do óleo a 180°C bem como durante o seu armazenamento à temperatura ambiente. Este aumento foi mais acentuado no óleo submetido a aquecimento uma vez que as reações de oxidação ocorrem mais rapidamente a elevadas temperaturas.

Observaram-se alterações mais relevantes no óleo sem extrato do que no óleo suplementado, comprovando-se o efeito do extrato de carqueja na redução da oxidação e, conseqüentemente, no aumento da estabilidade físico-química do óleo alimentar. O óleo suplementado com 1000mg/kg de extrato de carqueja revelou-se o mais estável à oxidação.

O presente estudo conduziu a resultados promissores pelo que será interessante prosseguir a investigação a diferentes níveis, nomeadamente analisar: (i) o efeito do extrato de carqueja na estabilidade físico-química de óleo alimentar aquecido por um período de tempo mais prolongado; (ii) o efeito do extrato de carqueja na estabilidade físico-química de óleo alimentar sujeito a ciclos de fritura com alimento; (iii) as características sensoriais do alimento submetido a fritura com o óleo suplementado; (iv) a estabilidade físico-química de óleo alimentar suplementado com antioxidante sintético (BHT ou BHA), comparativamente ao óleo suplementado com extrato de carqueja e (v) a composição microbiológica do produto final.

## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



Aladedunye, F., Matthäus, B. (2014). *Phenolic extracts from Sorbus aucuparia and Malus baccata berries: antioxidant activity and performance in rapeseed oil during frying and storage*. Food Chemistry, 159, 273-281.

Al-Jaber, N. A., et al. (2011). *Review on some antioxidant plants growing in Arab world*. Journal Saudi Chemistry Society, 15, 293-259.

Ângelo, A. J. S. T. (1996). *Lipid oxidation in foods*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 36 (3), 175-224.

Ângelo, P. M., Jorge, N. (2008). *Avaliação do óleo de girassol adicionado de antioxidantes sob armazenamento*. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 28 (2), 1-5.

Araújo, J. M. A. (2004). *Química de alimentos: teoria e prática*. Viçosa: Editora UFV.

Aylón, Y. A. M. (2003). *Estudio de utilizacion de aceites para fritura en establecimientos alimentarios de comidas preparadas*. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 76 (3), 83-89.

Bandoniene, D., et al. (2002). *Antioxidative activity of sage (Salvia officinalis), savory (Satureja hortensis) and borage (Borago officinalis) extracts in rapeseed oils*. European Journal of Lipid Science Technology, 104, 286-292.

Bensmira, M., et al. (2007). *Effect of lavender and thyme incorporation in sunflower seed oils on its resistance to frying temperature*. Food Res. Int., 40, 341-346.

Bukhari, S. B., et al. (2009). *Antioxidant potential of commercially available cumin (Cuminum cyminum) in Pakistan*. International Journal of Food Sciences and Nutrition, 60 (3), 240-247.

Buta, N. I., et al. (2013). *Evaluation of the antioxidant effect of Thymus vulgaris extract sunflower oil used in food thermal applications*. Agriculture and Rural Development, 2, 181-184.

Casal, S., et al. (2010). *Olive oil stability under deep-frying conditions*. Food and Chemical Toxicology, 48, 2972-2979.

Celikler, S., et al. (2009). *Evaluation of anti-oxidative, genotoxic and antigenotoxic potency of Codium tomentosum Stackhouse ethanolic extract in human lymphocytes in vitro*. Food and Chemical Toxicology, 47, 796-801.

De Marco, E., et al. (2007). *Accelerated oxidation: Comparative study of a new reactor with oxidation stability instrument*. European Journal of Lipid Science and Technology, 109, 237-246.

Decreto-Lei nº106/2005 de 29 de agosto. *Diário da República nº 123 – Série I-A*. Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas. Lisboa.

Farhoosh, R., Einafshar, S., Sharayei, P. (2009) *The effect of commercial refining steps on the rancidity measures of soybean and canola oils*. Food Chemistry, 115, 933-938.

Fennema, O. R. (2000). *Química de los Alimentos*. 2ª edição. Zaragoza: Editora Acribia.

Frankel, E. (1991). *Recent advances in lipid oxidation*. Journal of Science Food Agriculture, 54 (4), 495-511.

Gertz, C. (2000). *Chemical and Physical parameters as quality indicator of used frying fat*. European Journal of Lipid Science and Technology, 102 (8-9), 566-572.

Gil, D., et al. (2011). *Herbal infusions bioelectrochemical polyphenolic index: green tea-the galic acid interference*. Food Chemistry, 129, 1537-1543.

Gray, J. I. (1978). *Measurement of lipid oxidation: a review*. Journal of the American Oil Chemists' Society, 55, 539-546.

Grosso, A., et al. (2006). *Essential oil composition of Pterospartum tridentatum grown in Portugal*. Food Chemistry, 102, 1083-1088.

Iqbal, S., Bhangar, M. I. (2005). *Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage*. Food Chemistry, 100, 246-254.

Jorge, N. (2004). *Alterações químicas de óleos e gorduras de fritura*. Nutrição Brasil, 3 (4), 247-263.

Jorge, N. et al. (2005). *Medidas da estabilidade oxidativa e compostos polares totais do óleo de soja refinado e de gordura vegetal hidrogenada em frituras*. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 64 (2), 162-166.

Jorge, N., Soares, B. B. P. (2004). *Comportamento de óleo de milho em frituras*. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 63 (1), 63-69.

Jorge, R. (2010). *Caracterização de azeites virgem extra "gourmet" variedades e "blends" comercializados no mercado do Rio Grande do Sul*. Dissertação para a obtenção de grau de doutor. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Brasil.

Jorge, N., Lopes, V. R. M. (2005). *Determinação de compostos polares totais em óleos e gorduras de fritura*. Revista Higiene Alimentar, 19 (134), 46-50.

Karoui, I., et al. (2011). *Thermal stability of corn oil flavoured with Thymus capitatus under heating and deep-frying conditions*. Journal Science Food Agricultural 91, 927-933.

Keijbets, M. J. H., Ebbenhorst-Seller, G., Ruisch, J. B. (1986). *Deep-fat finish-frying of French fries in unhydrogenated refined soybean oil*. Fett Seifen Anstrichmittel, 88 (2), 48-52.

Kochhar, S. P. (2000). *Stabilization of frying oils with natural antioxidative components*. European Journal of Lipid Science and Technology, 102, 552-559.

Kulas, E., Ackman, R. G. (2001). *Different tocopherols and the relationship between two methods for determination of primary oxidation products in fish oil*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49 (4), 1724-1729.

Lawson, H. (1995). *Food oils and fat: technology, utilization and nutrition*. New York: Editora Chapman e Hall.

Lopes, I. M. G. (2000). *Extração e Caracterização do Óleo de Bolota*. Dissertação para a obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

Luís, A., et al. (2009). *Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: Pterospartum tridentatum, Cytisus scoparius and Erica spp.* Journal of Medicine Plants Research, 3 (11), 886-893.

Marmesat, S., et al. (2009). *Quality of used frying fats and oil: comparison of rapid tests based on chemical and physical oil properties.* Internacional Journal of Food Science and Techonology, 42, 601-608.

Mehta, U., Swinburn, B. (2001). *A review of factos affecting fat absorption in hot chips.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 4 (12), 133-154.

Melo, E. Q., et al. (2006). *Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas.* Ciência e Tecnologia dos Alimentos, 26 (3), 639-644.

Mensor, L. L., et al. (2001). *Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method.* Phytotherapy Research, 15 (2), 127-130.

Monferrer, A. Villalta, J. (1993). *La fritura desde un punto de vista práctico (I).* Alimentacion, Equipos y Tecnologia, 21 (4), 85-90.

Morales, M. T., et al. (1997). *Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: flavors and off-flavors.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 2666-2673.

Moretto, E., Fett, R. (1998). *Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos.* São Paulo: Editora Varela.

Nawar, W. W. (1984). *Lipids: food chemistry.* New York: Marcel Dekker

Nor, F. M., et al. (2008). *Antioxidative properties of Pandanus Amaryllifolius leaf extracts in accelerated oxidation and deep-frying studies.* Food Chemistry, 110 (2), 319-327.

NP 1819:1984 (1984). *Gorduras e óleos comestíveis – determinação do índice de p-anisidina.* Caparica. Instituto Português da Qualidade.

NP 2037:2004 (2004). *Gorduras e óleos alimentares comestíveis – óleo alimentar: definição, características e acondicionamento.* Caparica: Instituto Português da Qualidade.

NP 970:1986 (1986). *Gorduras e óleos comestíveis – absorvâncias no ultravioleta.* Caparica: Instituto Português da Qualidade.

NP EN ISO 3960:2009 (2009). *Óleos e gorduras de origem animal e vegetal - determinação do índice de peróxidos.* Caparica. Instituto Português da Qualidade.

NP EN ISO 6320:2004 (2004). *Óleos e gorduras de origem animal e vegetal - determinação do índice de refração.* Caparica. Instituto Português da Qualidade.

NP EN ISO 660:2009 (2009). *Óleo e gorduras de origem animal e vegetal – determinação do índice de acidez.* Caparica. Instituto Português da Qualidade.

O'Brien, R. D. (2009). *Fats and Oils Formulating and Processing for Applications.* CRC Press, 1 (4), 166-167.

Paul, S., Mittal, G. S. (1996). *Regulating the use of degraded oil/fat in deep oil/fat food frying*. Critical Review in Food Science and Nutrition, 37 (7), 635-662.

Pimenta, A. C. M. (2012). *Extratos aquosos de Pterospartum tridentatum L: teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante*. Dissertação para obtenção do grau de mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

Proestos, C., et al. (2005). *Analysis of the phenolic compounds of plant extracts: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (4), 1190-1195.

Ramadan, M. F., Wahdan, K. M. (2012). *Blending of corn oil with cominhos (Cuminum cyminum) and entros (Coriandrum sativum) seed oils: Impact on functionality, stability and radical scavenging activity*. Food Chemistry, 3 (1), 345-347.

Ramalho, V. C., Jorge, N. (2006). *Antioxidants used in oils, fats and fatty foods*. Química Nova, 29 (4), 755-760.

Raza, S. A., et al. (2014). *Evaluation of oxidative stability of sunflower oil at frying temperature in presence of butylated hydroxytoluene and methanolic extracts of medicinally important plants of Pakistan*. International Food Research Journal, 21, 331-334.

Raza, S. A., et al. (2009). *Comparison of antioxidant activity of essential oil of Centella asiatica and butylated hydroxyanisole in sunflower oil at ambient conditions*. Biharean Biologist, 3 (1), 71-75.

Regulamento (UE) nº1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008. *Jornal Oficial da União Europeia nº354/16*. Comunidade Europeia. Bruxelas.

Ribeiro, J. A., Monteiro, A. M., Silva, M. F. (2000). *Etnobotânica de plantas bravias, comestíveis, condimentares e medicinais*. Mirandela: Editora João Azevedo.

Sahreen, S., et al. (2010). *Evaluation of antioxidant activities of various solvent extracts of Carissa opaca fruits*. Food Chemistry. 122, 1205-1211.

Scherer, R., Gody, H. (2009). *Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-picrylhydrazyl method*. Food Chemistry. 112, 654-658.

Shahidi, F. J., Wanasundara, U. N. (1998). *Methods for measuring oxidative rancidity fats and oils*. Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology, 377-396.

Shahidi, F., Liyana-Pathirana, C. (2005). *Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology*. Food Chemistry, 93, 47-56.

Shahidi, F., Naczk, M. (1995). *Antioxidant properties of food phenolics: food phenolics sources, chemistry, effects, applications*. Technology Publishing Company, 235-279.

Shan, B., et al. (2005). *Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (20), 749-759.

Shymala, B. N., *et al.* (2005). *Leafy vegetable extracts-antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils*. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 6, 239-245.

Silva, F. A. M., *et al.* (1999). *Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante*. Química Nova, 22 (10), 94-103.

Silva, S. R. G. P. (2001). *Estudo da formação dos isómeros trans durante o processo de refinação do óleo de soja*. Relatório do trabalho de fim de curso de Engenharia Agro – Industrial. Instituto Superior de Agronomia, Lisboa.

Sousa, C. M. *et al.* (2007). *Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais*. Química Nova, 30 (2), 351-355.

Teixeira, G., Pereira, A. (2004). *Winged stems in Pterospartum tridentatum: morphoanatomical study*. Acta Botânica Gallica, 151 (1), 103-109.

Vitor, R. F., *et al.* (2004). *Flavonoids of an extract of Pterospartum tridentatum showing endothelial protection against oxidative injury*. Journal of Ethnopharmacology, 93(2-3), 367-370.

Warner, K., Neff, W. E., Eller, F. J. (2002). *Enhancing quality and oxidative stability of aged fried food with  $\gamma$ -tocopherol*. Journal Food Chemistry, 52 (3), 623-627.

Yanishlieva-Maslarova, N. V. (2001). *Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas*. Antioxidants in food: practical application. USA: CRC Press, 210-263.

Zhang, Y. *et al.* (2009). *Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage*. Food Chemistry 11, 656-662.

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

Zia-ur-Rehman, A. M., *et al.* (2003). *Antioxidant activity of ginger extract in sunflower oil*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 83, 624-629.

