

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

TRANSFORMAÇÕES QUÍMICAS NA OXIDAÇÃO ACELERADA DE  
ÓLEOS VEGETAIS E SUA RELAÇÃO COM A CAPACIDADE  
ANTIOXIDANTE TOTAL, UMA ABORDAGEM MULTIVARIADA

VANESSA NACIUK CASTELO BRANCO

2013



TRANSFORMAÇÕES QUÍMICAS NA  
OXIDAÇÃO ACELERADA DE ÓLEOS  
VEGETAIS E SUA RELAÇÃO COM A  
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL,  
UMA ABORDAGEM MULTIVARIADA.

Vanessa Naciuk Castelo Branco

Tese de Doutorado apresentada ao Programa  
de Pós-graduação em Ciências de Alimentos,  
Instituto de Química da Universidade  
Federal do Rio de Janeiro, como parte dos  
requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em  
Ciências de Alimentos.

Orientador: Alexandre Guedes Torres

Rio de Janeiro

Outubro de 2013

C349

Castelo Branco, Vanessa Naciuk.

Transformações químicas na oxidação acelerada de óleos vegetais e sua relação com a capacidade antioxidante total, uma abordagem multivariada / Vanessa Naciuk Castelo Branco. -- Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2013.

171f.; il.

Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Rio de Janeiro, 2013.

Orientador: Alexandre Guedes Torres.

1. Estabilidade oxidativa. 2. Antioxidantes. 3. Estatística Multivariada. I. Torres, Alexandre Guedes. (Orient.). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD:572

TRANSFORMAÇÕES QUÍMICAS NA OXIDAÇÃO ACELERADA DE  
ÓLEOS VEGETAIS E SUA RELAÇÃO COM A CAPACIDADE  
ANTIOXIDANTE TOTAL, UMA ABORDAGEM MULTIVARIADA

Vanessa Naciuk Castelo Branco

Orientador: Alexandre Guedes Torres

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Aprovada por:

---

Presidente, Prof<sup>o</sup> Alexandre Guedes Torres

---

Prof<sup>o</sup> Daniel Perrone

---

Prof<sup>a</sup> Eliane Fialho de Oliveira

---

Prof<sup>a</sup> Mônica Costa Padilha

---

Prof<sup>a</sup> Maria Alice Zarur Coelho

Rio de Janeiro

Outubro de 2013

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação do Prof<sup>o</sup>Alexandre Guedes Torres.

Apoio Financeiro: CNPq, CAPES, FAPERJ.

Ao meu pequeno príncipe, Mateus

## AGRADECIMENTOS

No dia 20 de Agosto de 2006 entrei no LBNA\* pela primeira vez e nunca imaginei que neste espaço eu viveria tantas histórias. No LBNA conheci profissionais exemplares, fiz amizades que quero que dure a vida inteira, trabalhei muito, mas também dei boas risadas, estudei bastante, mas também tomei muito café, por muitas vezes me senti em casa e até tirei o sapato. E no final das contas, sem perceber, o LBNA e toda a sua equipe virou a minha família carioca da qual tenho muito orgulho de fazer parte. Agora mais um ciclo se acabou e espero que o próximo seja tão bom quanto este, onde tantas pessoas participaram e merecem o meu agradecimento:

Ao meu orientador, Prof<sup>o</sup> Alexandre Guedes Torres, por compartilhar os seus conhecimentos comigo, por esclarecer as minhas dúvidas sempre, pelas conversas amigas e pela confiança no meu trabalho;

Ao meu marido, Rafael, por todo o apoio, nas horas boas e ruins, e por todo o seu esforço para ser o melhor pai possível enquanto eu estava meio distante;

À minha família gaúcha que mesmo lá dos Pampas torce por mim como se estivessem aqui do ladinho;

À Vanessa Di Sarli, minha querida aluna de iniciação científica, que trabalhou para valer na bancada, sempre com muita responsabilidade e disposição, me ajudando muito nestes anos de Doutorado;

À professora Suely Freitas, da Escola de Química, por ceder o laboratório e o equipamento de *Rancimat* para a realização das análises de estabilidade oxidativa dos óleos;

À Juliana, minha amiga mais que especial, pela companhia no laboratório, pelas longas horas de conversas, por sempre estar presente nas horas em que eu mais precisei e como ela mesma diz: minha *et al.*,

Ao Daniel Perrone, meu amigo, colega e professor, por sempre estar pronto para me ajudar com os seus conhecimentos e com o seu ombro amigo. Obrigado por todas as suas contribuições ao longo destes quatro anos de doutorado;

À Mariana Monteiro, meu exemplo de recém-doutor de sucesso! Obrigado por me mostrar que com muita dedicação, trabalho e esforço a gente consegue tudo que a gente quer!

\*Laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos

À Nathália Moura Nunes por todo o seu carinho e preocupação, e por sempre ter essa energia maravilhosa que levanta o astral de qualquer um;

À Giselle Duarte e Vivivane Xavier pela amizade e torcida;

A Isabelle Santana, uma das amigas queridas que o doutorado me deu de presente! Obrigada pela ajuda no *Rancimat*, pelos cafés, pela companhia no melhor congresso de 2013 (rsrs) e pela troca de conhecimentos neste mundo dos óleos vegetais!

À Suellen, Nívea e Emília pelas trocas de ideias, pela ótima companhia no cantinho dos HPLCs e pela ajuda na bancada sempre que precisei;

Ao pessoal da nova geração do LBNA, Fabrício, Michelle, Ellen, Laís, Kim, Genilton e Andressa sempre tão gentis e simpáticos comigo! Obrigada pela companhia agradável de vocês!

À querida Patrícia, técnica do laboratório, não apenas por lavar as minhas vidrarias, mas pelas conversas matutinas tão divertidas! Meu dia na bancada já começava mais feliz depois de umas boas risadas com você!

E por fim, às Professoras Nadia Trugo e Carmen Donangelo que tive a oportunidade de conviver e ouvir um pouco das suas histórias de vida que me estimulam todos os dias a seguir a vida acadêmica!

Enfim, a todos, que de certa forma, colaboraram para o desenvolvimento dessa tese,

**MUITO OBRIGADA!**

**Tudo Novo de Novo**

**(Paulinho Moska)**

Vamos começar  
Colocando um ponto final  
Pelo menos já é um sinal  
De que tudo na vida tem fim

Vamos acordar  
Hoje tem um sol diferente no céu  
Gargalhando no seu carrossel  
Gritando nada é tão triste assim

É tudo novo de novo  
Vamos nos jogar onde já caímos  
Tudo novo de novo  
Vamos mergulhar do alto onde subimos

Vamos celebrar  
Nossa própria maneira de ser  
Essa luz que acabou de nascer  
Quando aquela de trás apagou

E vamos terminar  
Inventando uma nova canção  
Nem que seja uma outra versão  
Pra tentar entender que acabou

Mas é tudo novo de novo  
Vamos nos jogar onde já caímos  
Tudo novo de novo  
Vamos mergulhar do alto onde subimos

## RESUMO

Castelo Branco, Vanessa Naciuk. TRANSFORMAÇÕES QUÍMICAS NA OXIDAÇÃO ACELERADA DE ÓLEOS VEGETAIS E SUA RELAÇÃO COM A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL, UMA ABORDAGEM MULTIVARIADA. Rio de Janeiro, 2013. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos). Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

O objetivo geral do presente trabalho foi investigar as transformações químicas ocorridas durante condições distintas de oxidação acelerada, em diferentes tipos de óleos vegetais, e aplicar análise estatística multivariada a fim de associar as transformações químicas e sua associação com a capacidade antioxidante total (CAT). Os óleos refinados de soja, milho girassol e canola e os óleos de nozes (amêndoa doce, avelã, castanha-do-Brasil, macadâmia e noz-pecã) prensados a frio foram utilizados para investigar os seguintes aspectos: a influência da composição em ácidos graxos e tocóis e do teor de compostos fenólicos totais para a CAT e a estabilidade oxidativa dos óleos por meio da análise de Modelo Linear Generalizado (Capítulo 1), a associação entre a degradação de ácidos graxos, tocóis e compostos fenólicos totais e as alterações dos produtos de oxidação e da CAT por Correlações Canônicas (Capítulo 2) e o potencial uso da CAT como indicador de estabilidade oxidativa dos óleos (Capítulo 3). No Capítulo 1 foi observado que o  $\alpha$ - e o  $\gamma$ -tocoferol foram os principais determinantes da CAT, avaliada pelo ensaio de TEAC (do inglês; *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) Por outro lado, o teor de compostos fenólicos totais e o  $\gamma$ -tocoferol foram os principais determinantes da estabilidade oxidativa, pelo método de *Rancimat*. No Capítulo 2 os óleos foram submetidos à oxidação acelerada (Estufa de Schaal, foto-oxidação e termo-oxidação) e foi observado que as degradações do  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol foram os principais determinantes das transformações químicas ocorridas, independente das condições de oxidação lipídica. Destaca-se que a perda de  $\alpha$ -tocoferol apresentou relação com a estabilidade oxidativa, enquanto a perda de  $\gamma$ -tocoferol, com o a variação da CAT. No Capítulo 3, foi observada uma forte correlação entre a CAT dos óleos frescos e a formação dos produtos primários e secundários durante o teste de Estufa de Schaal bem como com o período de indução determinado pelo método de *Rancimat*. Desta forma, a CAT inicial foi capaz de predizer adequadamente a estabilidade oxidativa dos óleos, caracterizando-se como um bom indicador de qualidade oxidativa. Por fim, foi proposto, pela primeira vez, um limite mínimo de CAT para óleos refinados de boa qualidade de 2,20 mmol ET/kg de óleo.

Palavras-chave: estabilidade oxidativa, oxidação acelerada, antioxidantes, tocoferóis, estatística multivariada

## ABSTRACT

Castelo Branco, Vanessa Naciuk. CHEMICAL TRANSFORMATIONS IN VEGETABLE OILS ACCELERATED OXIDATION AND THEIR ASSOCIATION WITH TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY, A MULTIVARIATE APPROACH. Rio de Janeiro, 2013. These (PhD in Food Science). Instituto de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

The aims of the present work was to investigate the chemical transformations occurring during distinct tests of accelerated oxidation in different types of vegetable oils and to apply multivariate statistical analysis in order to associate the chemical transformations and their associations with oils' total antioxidant capacity (TAC). Refined soybean, corn, sunflower and canola oils and cold pressed nut oils (almond, hazelnut, Brazil-nut, macadamia and pecan-nut) were used to investigate the following aspects: the influence of fatty acid and tocopherols composition and total phenolic compounds on vegetable oils TAC and oxidative stability by Generalized Linear Models (Chapter 1), the association of losses in fatty acids, tocopherols and total phenolic compounds with the changes in oxidation products and TAC by Canonical Correlations (Chapter 2) and the potential application of TAC as an oxidative stability index on vegetable oils (Chapter 3). In *Chapter 1* we observed that  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols were the main determinants of TAC by the TEAC assay. On the other hand, total phenolic compounds and  $\gamma$ -tocopherol were the main determinants of oils' oxidative stability by *Rancimat*. In *Chapter 2*, oils were submitted to accelerated oxidation (Schaal Oven test, photooxidation and termooxidation). It was observed that degradation of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherol were the major determinants of the chemical transformations, independently of the oxidation conditions. Additionally,  $\alpha$ -tocopherol loss was associated with oxidative stability, whereas  $\gamma$ -tocopherol loss associated with vegetable oils TAC. In *Chapter 3* we observed a strong correlation between initial TAC and the formation of primary and secondary oxidation products in Schaal Oven test as well as with the induction time by *Rancimat* test. Moreover, TAC of fresh oils was a proxy of oils' oxidative stability. Finally, for the first time, we proposed a lower limit of good quality refined vegetable oils TAC of 2.20 mmol TE/ kg of oil.

Keywords: oxidative stability, accelerated oxidation, antioxidants, tocopherols, multivariate statistical analysis

### **Artigos publicados em periódicos:**

CASTELO-BRANCO, VN & TORRES, AG. Generalized linear model describes determinants of total antioxidant capacity of refined vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.114, p.332 - 342, 2012.

### **Resumos publicados em anais de congressos:**

CASTELO-BRANCO, VN; DI SARLI, VPO; TORRES, AG. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay might predict oxidative stability of refined vegetable oils. In: 104th AOCs Annual Meeting & Expo, 2013, Montreal.

CASTELO-BRANCO, VN; DI SARLI, VPO; TORRES, AG. Comparação da estabilidade oxidativa entre óleo de soja e girassol expostos à temperatura de fritura. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2012, Campinas.

DI SARLI, VPO; CASTELO-BRANCO, VN; TORRES, AG. Investigação da oxidação acelerada do óleo de castanha-do-Brasil (*Bertholletia Excelsa*) prensado a frio. In: XXII Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2012, Campinas.

DI SARLI, VPO; CASTELO-BRANCO, VN; TORRES, AG. Óleo de noz-pecã (*Carya Illinoensis K*) é mais estável do que o óleo de castanha-do-Brasil (*Bertholletia Excelsa*). In: Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ, 2012, Rio de Janeiro.

CASTELO-BRANCO, VN; OLIVEIRA, TC; GIL, AP; TORRES, AG. Associação positiva entre a estabilidade oxidativa e a capacidade antioxidante total em óleo de castanha-do-Brasil (*Bertholletia Excelsa*) prensado a frio submetido ao teste de shaal In: 9º SLACA - Simpósio Latino-Americano de Ciência de Alimentos, 2011, Campinas- São Paulo- Brasil.

CASTELO-BRANCO, VN; OLIVEIRA, TC; TORRES, AG. Índice de peróxido parece ser um bom indicador de qualidade de óleo de castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*) prensado a frio em ensaio de oxidação acelerada In: XXII CBCTA - Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010, Bahia-Brasil.

CASTELO-BRANCO, VN; OLIVEIRA, TC; GIL, AP; TORRES, AG. Variação da capacidade antioxidante total do óleo de castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*) prensado a frio em ensaio de oxidação acelerada em estufa In: XXII CBCTA - Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010, Bahia-Brasil.

CASTELO-BRANCO, VN; OLIVEIRA, TC; TORRES, AG. Comportamento dos hidroperóxidos, dienos conjugados e malonaldeído (TBA) de óleo de soja durante teste em estufa a 60°C. In: 8º SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos, 2009, Campinas-Brasil.

OLIVEIRA, TC; CASTELO-BRANCO, VN; TORRES AG. Análise da formação de produtos primários e secundários da peroxidação lipídica induzida pela ação da temperatura em óleo de soja. In: XXXI Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ, 2009, Rio de Janeiro-Brasil.

## SUMÁRIO

Revisão bibliográfica.....	22
1. Óleos vegetais: Importância econômica e para a saúde humana.....	23
2. Óleos de nozes prensados a frio: a relevância de seu estudo.....	27
3. Oxidação lipídica em óleos vegetais.....	29
3.1 Mecanismo geral e produtos de oxidação.....	30
3.2 Principais vias de iniciação da oxidação lipídica e as suas diferenças.....	37
3.3 Influência da composição química para a oxidação lipídica dos óleos vegetais.....	42
4. Capacidade antioxidante total em óleos vegetais.....	48
5. Estatística multivariada: uma abordagem analítica para acessar a relação entre a estabilidade oxidativa e a CAT dos óleos vegetais.....	52
Objetivos.....	54
Capítulo 1.....	56
1. Introdução.....	57
2. Objetivos .....	59
3. Materiais e métodos.....	60
3.1 Reagente e padrões.....	60
3.2 Aliquotagem e armazenamento das amostras.....	60
3.3 Indicadores de qualidade inicial.....	61
3.4 Determinação da composição química.....	61
3.4.1 Ácidos graxos.....	61
3.4.2 Tocoferóis e tocotrienóis.....	62
3.4.3 Teor de compostos fenólicos totais.....	63
3.5 Determinação da estabilidade oxidativa.....	64
3.6 Determinação da capacidade antioxidante total.....	65
3.7 Análises estatísticas.....	66
4. Resultados e discussão.....	67
4.1 Qualidade inicial dos óleos vegetais.....	67
4.2 Composição inicial quanto ao conteúdo de ácidos graxos.....	70

4.3	Composição inicial quanto ao teor de tocoferóis e tocotrienóis.....	74
4.4	Teor de compostos fenólicos totais.....	80
4.5	Capacidade antioxidante total dos óleos vegetais.....	84
4.6	Estabilidade oxidativa dos óleos vegetais.....	86
4.7	Principais determinantes químicos da capacidade antioxidante total e estabilidade oxidativa dos óleos vegetais.....	89
5.	Conclusão.....	97
Capítulo 2.....		99
1.	Introdução.....	100
2.	Objetivos.....	102
3.	Materiais e métodos.....	103
3.1	Aliquotagem e armazenamento das amostras.....	103
3.2	Testes de oxidação acelerada.....	103
3.3	Monitoramento da estabilidade oxidativa.....	104
3.4	Determinação da composição em ácidos graxos, tocóis, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante total.....	105
3.5	Análises estatísticas.....	105
4.	Resultados e discussão.....	106
4.1	Estabilidade oxidativa dos óleos vegetais refinados e prensados a frio no teste de Estufa de Schaal (65°C).....	106
4.2	Estabilidade oxidativa dos óleos vegetais refinados a 180°C.....	110
4.3	Estabilidade oxidativa dos óleos de nozes prensados a frio durante a foto-oxidação.....	114
4.4	Comportamento da composição química durante os testes de oxidação acelerada.....	117
4.4.1	Ácidos graxos.....	117
4.4.2	Tocoferóis .....	120
4.4.3	Compostos fenólicos totais.....	129
4.5	Transformações da capacidade antioxidante total.....	131
4.6	Influência das transformações da composição química para a variação dos produtos de oxidação e da capacidade antioxidante total.....	134
5.	Conclusão.....	135

Capítulo 3.....	139
1. Introdução.....	140
2. Objetivos.....	141
3. Materiais e métodos.....	142
4.Resultados e discussão.....	142
4.1 Relação entre a capacidade antioxidante total e a estabilidade oxidativa.....	142
4.2 Recomendação de um valor mínimo da CAT para óleos de boa qualidade.....	146
5. Conclusão.....	148
Conclusões finais.....	149
Referências.....	153

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azino- <i>bis</i> -(3-etil-benzotiazolina)-6-sulfônico
ACC	Análise de Correlações Canônicas
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
AGS	Ácidos graxos saturados
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AUC	Área baixo da curva
CAT	Capacidade Antioxidante Total
CLAE	Cromatografia de Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometro de massas
DC	Dienos conjugados
DPPH	2,2- difenil-1-picrilhidrazilo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EMAG	Ésteres metílicos de ácidos graxos
FRAP	do inglês <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
GLM	do inglês <i>General Linear Models</i>
HAT	do inglês: <i>Hydrogen Atom Transfer</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IA	Índice de acidez
IP	Índice de peróxido
IpA	Índice de <i>p</i> -anisidina
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LO <sup>•</sup>	Radical lipídico alcoxila
LOO <sup>•</sup>	Radical lipídico peroxila
LOOH	Hidroperóxidos
ORAC	do inglês <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
PCA	Análise de Componentes Principais
PI	Período de indução
RO <sup>•</sup>	Radical alcoxila

ROO <sup>•</sup>	Radical peroxila
SET	do inglês: <i>Single Eletron Transfer</i>
TBHQ	Terc-butilhidroquinona
TEAC	do inglês: <i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity</i>
TRAP	do inglês <i>Total Radical-trapping Antioxidant Parameter</i>
TROLOX	6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão Bibliográfica

Figura 1. Produção e consumo mundial dos principais óleos vegetais durante o ano de 2012.....	23
Figura 2. Diferentes nozes e suas sementes.....	27
Figura 3. Principais etapas da oxidação lipídica de óleos vegetais.....	30
Figura 4. Posicionamento dos carbonos $\alpha$ -metilênicos nos principais ácidos graxos insaturados utilizados como substratos para a oxidação lipídica em óleos vegetais.....	32
Figura 5. Formação de dienos conjugados a partir da abstração de hidrogênio do ácido linoleico ( $18:2n-6$ ).....	32
Figura 6. Decomposição dos hidroperóxidos por $\beta$ -clivagem homolítica do radical alcóxil.....	34
Figura 7. Influência dos antioxidantes primários e secundários para o aparecimento da fase lag durante a oxidação lipídica dos óleos vegetais.....	36
Figura 8. Diferentes mecanismos da via de foto-oxidação em óleos vegetais.....	39
Figura 9. Estrutura molecular das diferentes formas de tocoferóis e tocotrienóis existentes em óleos vegetais.....	44
Figura 10. Estrutura química dos principais ácidos fenólicos observados nos óleos vegetais.....	47
Figura 11. Esquema simplificado dos mecanismos envolvidos na determinação da capacidade antioxidante total por diferentes ensaios.....	50

### Capítulo 1

Figura 1. Definição do período de indução pelo software Metrohm 743 para uma amostra de óleo vegetal investigada.....	65
Figura 2. Esquema da reação entre o radical $ABTS^{*+}$ e um antioxidante durante o ensaio de TEAC.....	66
Figura 3. Teor de compostos fenólicos totais nos diferentes tipos de óleos vegetais e nas diferentes marcas comerciais dos óleos refinados.....	81
Figura 4. Estrutura química do antioxidante sintética tert-butilhidroquinona.....	82
Figura 5. Capacidade antioxidante total de diferentes tipos de óleos vegetais e nas diferentes marcas comerciais dos óleos refinados determinada por meio do ensaio de TEAC.....	85
Figura 6. Estabilidade oxidativa de diferentes tipos de óleos e marcas de óleos vegetais refinados determinada pelo Método de <i>Rancimat</i> .....	87

Figura 7. Distribuição das amostras e variáveis após análise de componentes principais em 17 amostras de óleos vegetais incluindo as variáveis: compostos fenólicos totais, $\alpha$ -, $\gamma$ - e $\delta$ -tocoferol e AGPI/AGS.....	90
Figura 8. Distribuição das amostras e variáveis após Análise de Componentes Principais em 17 amostras de óleos vegetais incluindo as variáveis: $\alpha$ -, $\gamma$ -tocoferol e AGPI/AGS.....	91
Figura 9. Estimativa da capacidade antioxidante total e estabilidade oxidativa por meio dos modelos ajustados por Modelo Linear Generalizado.....	98

## Capítulo 2

Figura 1. Formação dos produtos de oxidação em óleos refinados e de nozes prensados a frio oxidados em Estufa de Schaal.....	107
Figura 2. Comportamento dos produtos de oxidação a 180°C dos óleos vegetais refinados de soja, milho, girassol e canola.....	113
Figura 3. Formação dos produtos de oxidação durante o teste de foto-oxidação (30°C) em óleos de nozes prensados a frio.....	115
Figura 4. Degradação dos principais ácidos graxos oxidáveis nos óleos vegetais refinados de soja, milho, girassol e canola e nos óleos de nozes prensados a frio.....	118
Figura 5. Degradação dos tocoferóis durante teste de Estufa de Schaal em óleos refinados de soja, milho, girassol e canola.....	122
Figura 6. Degradação dos tocoferóis durante teste de Estufa de Schaal em óleos de nozes prensados a frio.....	123
Figura 7. Formação do radical $\alpha$ -tocoferoxil após a degradação do $\alpha$ -tocoferol e suas possíveis reações com os substratos lipídicos e radicais livres.....	125
Figura 8. Degradação dos tocoferóis durante teste de oxidação a 180°C em óleos refinados de soja, milho, girassol e canola.....	126.
Figura 9. Degradação dos tocoferóis durante teste de foto-oxidação de óleo de nozes prensados a frio.....	128
Figura 10. Teor de compostos fenólicos totais após oxidação dos óleos refinados de soja, milho, girassol e canola e dos óleos de nozes prensados a frio.....	130
Figura 11. Teor de compostos fenólicos totais após oxidação em Estufa de Schaal e em 180°C nas diferentes marcas dos óleos refinados de soja, milho, girassol e canola.....	131

Figura 12. Alterações da capacidade antioxidante total dos óleos refinados de soja, milho, girassol e canola e dos óleos de nozes prensados a frio ao longo de diferentes testes de oxidação lipídica.....	132
--	-----

### **Capítulo 3**

Figura 1. Estimativa da capacidade antioxidante total e da estabilidade oxidativa por meio dos modelos ajustados por Modelo Linear Generalizado.....	145
Figura 2. Relação entre a capacidade antioxidante total e o índice de peróxido em óleos frescos.....	148

## LISTA DE TABELAS

### Revisão Bibliográfica

Tabela 1. Volume de óleos vegetais produzidos, exportados e consumidos no Brasil em 2012.....	24
---	----

### Capítulo 1

Tabela 1. Tipo de antioxidante sintético adicionado nos óleos vegetais refinados investigados.....	61
Tabela 2. Qualidade inicial dos óleos vegetais refinados e prensados a frio quanto aos índices de peróxido e de acidez.....	69
Tabela 3. Composição em ácidos graxos (g/ 100g de ácidos graxos) dos óleos vegetais refinados de soja, milho, girassol e canola.....	71
Tabela 4. Composição em ácidos graxos (g/ 100g) dos óleos vegetais de nozes prensados a frio de castanha-do-Brasil, noz-pecã, avelã, amêndoa doce e macadâmia.....	72
Tabela 5. Composição em tocoferóis (mg / 100g) dos óleos vegetais refinados e dos óleos de nozes prensados a frio.....	76
Tabela 6. Principais determinantes químicos para a capacidade antioxidante total e para o período de indução dos óleos vegetais refinados e prensados a frio obtidos por Modelo Linear Generalizado.....	93

### Capítulo 2

Tabela 1. Correlações canônicas e pares canônicos estimados entre o comportamento da composição química e a formação de produtos de oxidação em óleos vegetais refinados de soja, milho, girassol e canola e de óleos de nozes prensados a frio submetidos a diferentes condições de oxidação acelerada.....	136
--	-----

### Capítulo 3

Tabela 1. Contribuição da capacidade antioxidante total e do índice de peróxido inicial para a estabilidade oxidativa dos óleos em diferentes condições de oxidação acelerada.....	143
--	-----

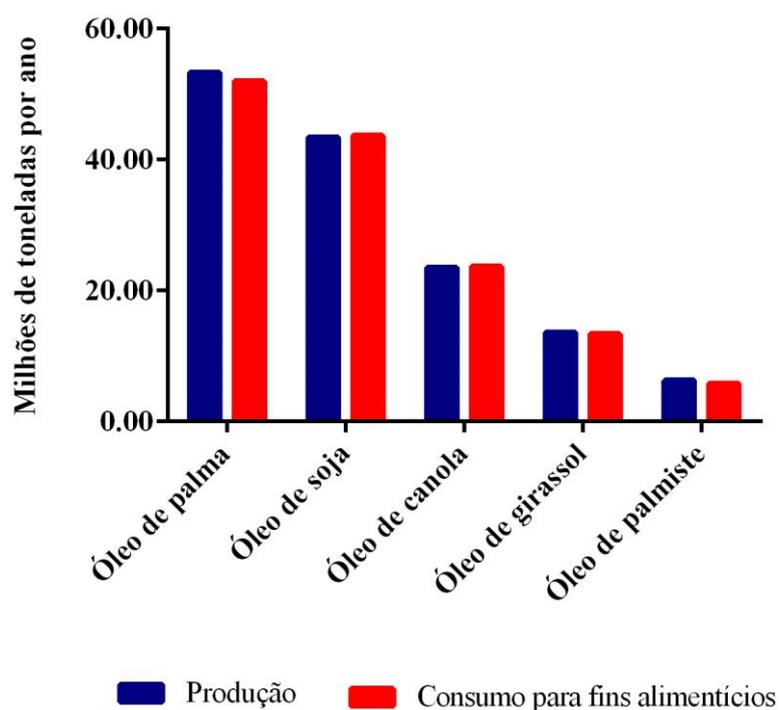
## **Revisão bibliográfica**

## 1. Óleos vegetais: Importância econômica e para a saúde humana

Os óleos vegetais são alimentos lipídicos extraídos de sementes oleaginosas, nozes, cereais e frutas. Os óleos representam uma fonte concentrada de energia, além de serem carreadores de vitaminas lipossolúveis e conterem nutrientes essenciais para o desenvolvimento humano, tais como os ácidos graxos essenciais e vitamina E (Ghazani *et al.*, 2013; Kamal-Eldin & Andersson, 1997; Desai *et al.*, 1988).

Desde a década de 80, o consumo e a produção de óleos vegetais tem apresentado um aumento marcante no mundo todo. A produção mundial de óleos vegetais aumentou de 40,3 milhões de toneladas para 157,0 milhões de toneladas entre os anos de 1984/85 e 2012/13 (*Foreign Agricultural Service, USDA, 2013*). De acordo com as projeções da *Food and Agricultural Organization of the United Nation (FAO)*, espera-se que a produção de óleos vegetais, liderada pelos países em desenvolvimento, aumente em 30% até o ano de 2020 (OECD-FAO, 2011). Atualmente, o Brasil ocupa o 6° e o 7° lugar no ranking de maiores consumidores e produtores de óleos vegetais no mundo, respectivamente (*Foreign Agricultural Service, USDA, 2013*).

Os óleos de palma, soja, canola e girassol são os principais óleos produzidos em escala mundial (Figura 1). O óleo de palma, o mais consumido mundialmente, concentra a sua produção nos países asiáticos da Indonésia e da Malásia. Por outro lado, os óleos de soja e de canola, o 2° e o 3° mais consumidos, concentram a sua produção na China e nos países da União Europeia, respectivamente. Juntos, os óleos de palma e de soja correspondem a mais de 60% da produção mundial de óleos vegetais (*Foreign Agricultural Service, USDA, 2013; FEDIOL, 2011*).



**Figura 1.** Produção e consumo mundial dos principais óleos vegetais durante o ano de 2012 (Fonte: *Foreign Agricultural Service, USDA, 2013*).

No Brasil, a produção e o consumo de óleos vegetais correspondem cerca de 8,0 milhões de toneladas ao ano, sendo a indústria brasileira considerada de grande porte. Neste cenário, a produção de óleo de soja contribui com aproximadamente 90% da produção e do consumo nacional de óleos vegetais, tornando o Brasil o 4º maior produtor mundial de óleo de soja (Tabela 1). O restante da produção nacional corresponde à produção dos óleos de algodão, palma, amendoim, girassol, milho e canola (Oil World, 2013).

A maior parte da produção mundial dos óleos vegetais (80%) é utilizada para fins alimentícios (Figura 1), tais como o uso do óleo *in natura*, a aplicação dos óleos em processos de fritura e o desenvolvimento de produtos derivados como margarinas e cremes vegetais (OECD-FAO, 2011). Portanto, ainda existe um grande interesse no estudo das propriedades nutricionais e tecnológicas dos diferentes tipos de óleos vegetais.

**Tabela 1.** Total de óleos vegetais produzidos, exportados e consumidos no Brasil em 2012.

<b>Tipo de óleo</b>	<b>Produção (1.000 t/ano)</b>	<b>Exportação (1.000 t/ano)</b>	<b>Consumo interno (1.000 t/ano)</b>
Soja	7.072	1.500	5.700
Algodão	371	1	374
Palma + Palmiste	338	58	703
Milho	89	37	52
Mamona	48	4	51
Girassol	35	1	72
Canola	29	1	40
<b>Total</b>	<b>8.014</b>	<b>1.618</b>	<b>7.009</b>

(Fonte: Oil World, 2013).

Os óleos vegetais constituem-se predominantemente por triacilgliceróis, frequentemente ricos em ácidos graxos insaturados, incluindo os ácidos graxos essenciais, ácido linoleico (18:2n-6) e ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3n-3). Além disso, os óleos vegetais contêm pequenas quantidades de esteróis, tocoferóis, tocotrienóis, compostos fenólicos, pigmentos (carotenoides e clorofilas) e metais de transição como ferro e cobre (Chen *et al.*, 2011; Chaiyasit *et al.*, 2007).

Mondini & Monteiro (1994) sugerem que, inicialmente, o aumento no consumo de óleos vegetais ocorreu devido à recomendação de restringir o consumo da gordura de origem animal, rica em ácidos graxos saturados, para prevenir o desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Na década de 70, um importante estudo epidemiológico, o “*Seven Countries Study*”, avaliou sistematicamente a associação entre o estilo de vida, a dieta e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em populações de diferentes regiões do mundo.

Este estudo concluiu que o risco para o desenvolvimento destas doenças estava associado com o nível de colesterol plasmático, assim como com o teor de gordura saturada da dieta habitual, sugerindo a substituição dos lipídeos saturados pelos insaturados (Keys, 1970).

A partir deste momento, tornou-se crescente o interesse em investigar o efeito bioativo dos ácidos graxos insaturados presentes nos óleos vegetais. Até os dias atuais, variados estudos demonstram uma associação inversa entre o consumo de óleos vegetais ricos em ácidos graxos insaturados e o risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (Esmailzadeh & Azadbakht, 2011; Vega-López *et al.*, 2006). Diferentes autores sugerem que o efeito protetor do consumo de óleos vegetais à saúde humana relacione-se, principalmente, com os teores do ácido oleico (18:1n-9), ácido graxo monoinsaturado (AGMI), e com os teores de 18:3n-3 presentes nos óleos (Zatonski *et al.*, 2008; Ruiz-Gutiérrez *et al.*, 1997; Renaud *et al.*, 1995; Matson & Grundy 1985).

Matson & Grundy (1985) avaliaram a influência do consumo de óleos vegetais ricos em 18:1n-9 e 18:2n-6 nos níveis plasmáticos de colesterol total, triacilglicerol e das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), baixa densidade (LDL) e alta densidade (HDL). Estes autores observaram que o 18:1n-9 e o 18:2n-6 foram capazes de reduzir a LDL, diminuindo o risco cardiovascular. No entanto, somente o 18:1n-9 não reduziu os níveis de HDL, um fator protetor em relação ao risco cardiovascular.

Da mesma forma, Zatonski *et al.* (2008) observaram que a taxa de mortalidade por doenças cardiovasculares foi reduzida em países do leste europeu que apresentaram alto consumo de óleos ricos em 18:3n-3. Possivelmente este efeito esteja associado com a capacidade do 18:3n-3 em inibir a agregação plaquetária e a formação de trombos, em reduzir a pressão arterial e os triacilgliceróis plasmáticos bem como em diminuir os marcadores inflamatórios, reduzindo a incidência de doenças cardíacas (Simopoulos, 2006).

No entanto, os compostos minoritários presentes nos óleos vegetais, tais como os antioxidantes naturais pertencentes à classe da vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) e dos compostos fenólicos também influenciam positivamente a saúde humana (Kritchevsky, 2002). Os antioxidantes presentes nos óleos vegetais estão associados à prevenção de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônico-degenerativas, pois são capazes de proteger os sistemas biológicos contra a ação de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, responsáveis por danos oxidativos aos lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Halliwell, 2012).

Adicionalmente, os tocoferóis, os tocotrienóis e os compostos fenólicos apresentam outras funções biológicas, tais como as atividades anti-inflamatória e quimiopreventiva, que também contribuem para a prevenção de doenças crônico-degenerativas (Haloom *et al.*, 2012; Saldeen & Saldeen, 2005; Bendini *et al.*, 2007).

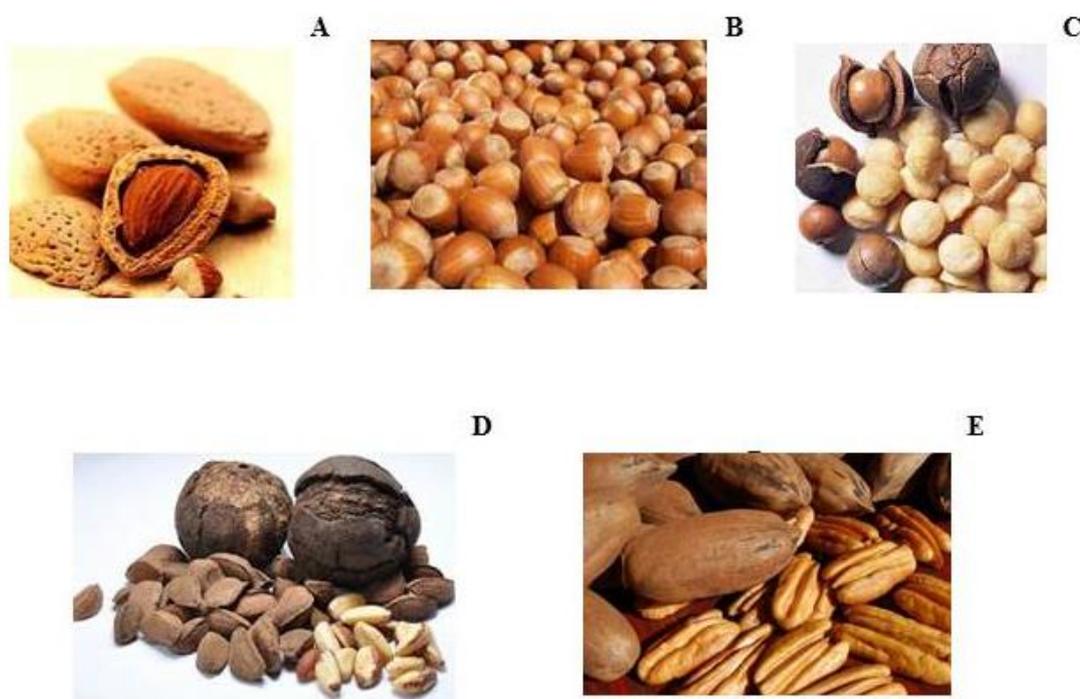
Neste contexto, outros óleos além daqueles habitualmente consumidos vêm despertando interesse da comunidade científica devido a sua composição em ácidos graxos e compostos antioxidantes, tais como os óleos de nozes. De acordo com Hu & Stampfer (1999), o consumo de óleos de nozes pode exercer um maior efeito cardioprotetor do que o consumo das suas respectivas nozes. No entanto, ainda são poucas as informações sobre a composição química dos óleos de nozes, tornando-se relevante o seu estudo para aumentar o conhecimento sobre os potenciais efeitos destes para à saúde humana.

Portanto, considerando as evidências que sugerem uma associação positiva entre o consumo de diferentes óleos vegetais e a redução no risco de doenças, é constante a preocupação com a manutenção da qualidade nutricional e sensorial dos óleos vegetais. Contudo, devido ao elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), os óleos são altamente suscetíveis à oxidação lipídica, principal forma de degradação desta matriz alimentar. Desta forma, os óleos vegetais têm sido foco de interesse científico e tecnológico

nas áreas de Ciência de Alimentos e Nutrição através da investigação da estabilidade oxidativa e da sua relação com a composição nutricional dos óleos a fim de promover um melhor controle de qualidade do produto final assim como um melhor aproveitamento dos compostos bioativos presentes nos óleos.

## 2. Óleos de nozes prensados a frio: a relevância de seu estudo

As nozes são frutos secos que geralmente apresentam apenas uma semente e são envolvidos por uma casca rígida, tais como a noz-pecã (*Carya illinoensis*), avelã (*Corylus avellana*), macadâmia (*Macadamia integrifolia*), amêndoa-doce (*Prunus dulcis*) e a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*) que apresenta mais de uma semente em seu fruto (Freitas & Naves, 2010; Figura 2).



**Figura 2.** Diferentes nozes e suas sementes: (A) Amêndoa doce; (B) Avelã; (C) Macadâmia; (D) Castanha-do-Brasil; (E) Noz-pecã.

As nozes apresentam um valor nutricional elevado, sendo importantes fontes de lipídeos (40-80%, em especial 18:1*n*-9) e proteínas (8-20%). Além disso, também podem apresentar quantidades relevantes de minerais, vitaminas e de alguns compostos bioativos como os fitoesteróis e variados compostos fenólicos (Alasalvar & Shahidi, 2009; Venkatachalam & Sathe, 2006). Diferentes estudos epidemiológicos sugerem que o consumo de nozes promove variados efeitos cardioprotetores, em especial, devido a sua fração lipídica constituída de AGMI, tocoferóis e fitosteróis (Yang, 2009; Coates & Peter, 2007; Blomhoff *et al.*, 2006).

Em Julho de 2003, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou a alegação de saúde a qual estabelece que o consumo de 42 g/dia de algumas nozes (amêndoa doce, avelã, amendoim, noz-pecan, e pistache) pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares. Desta forma, é provável que os óleos extraídos das nozes, fonte concentrada de compostos lipídicos, também apresentem potencial para exercer benefícios à saúde.

No entanto, o número de artigos investigando o efeito do consumo dos óleos de nozes ainda é limitado (Alasalvar & Pelvan, 2011). Similarmente, ainda são escassos os estudos sobre a composição química dos óleos de nozes. Atualmente, Fereidoon Shahidi e seus colaboradores são o principal grupo de pesquisa a investigar as propriedades nutricionais e tecnológicas dos óleos de nozes, especificamente extraídos por diferentes solventes (Eron *et al.*, 2013; La Rosa *et al.*, 2011; Miraliakbari & Shahidi, 2008; Alasalvar & Shahidi, 2009; Alasalvar *et al.*, 2006).

De acordo com a literatura, existem duas formas principais de extração dos óleos vegetais: a extração por meio de solvente e a extração por meio de prensagem mecânica, as quais influenciam de forma diferente a composição final dos óleos (Siger *et al.*, 2008). O método de extração de óleos por solvente envolve altas temperaturas causando a perda de

alguns compostos minoritários presentes nos óleos. Além disso, óleos extraídos por solventes devem ser submetidos ao processo de refino para tornarem-se comestíveis. Relata-se que, aproximadamente, 80% dos compostos fenólicos e dos tocoferóis são removidos dos óleos durante o processo de refino, que envolve condições bruscas de temperatura e reagentes químicos (Ghazani & Marangoni, 2013; Lindley, 1998; Desai *et al.*, 1988).

Por outro lado, a extração por prensagem mecânica, especialmente a frio, tende a preservar as propriedades nutricionais dos óleos tendo em vista que não envolve aquecimento ou tratamento químico posterior (Vujasinovic *et al.*, 2010; Siger *et al.*, 2008). Desta forma, considerando o interesse do consumidor por alimentos capazes de promover benefícios à saúde, os óleos de nozes têm sido comercializados após sua obtenção pelo processo de prensagem mecânica a frio, tornando importante a investigação da composição nutricional destes óleos bem como a sua tendência à oxidação lipídica as quais devem diferenciar-se em relação aos óleos de nozes extraídos por solvente.

### **3. Oxidação lipídica em óleos vegetais**

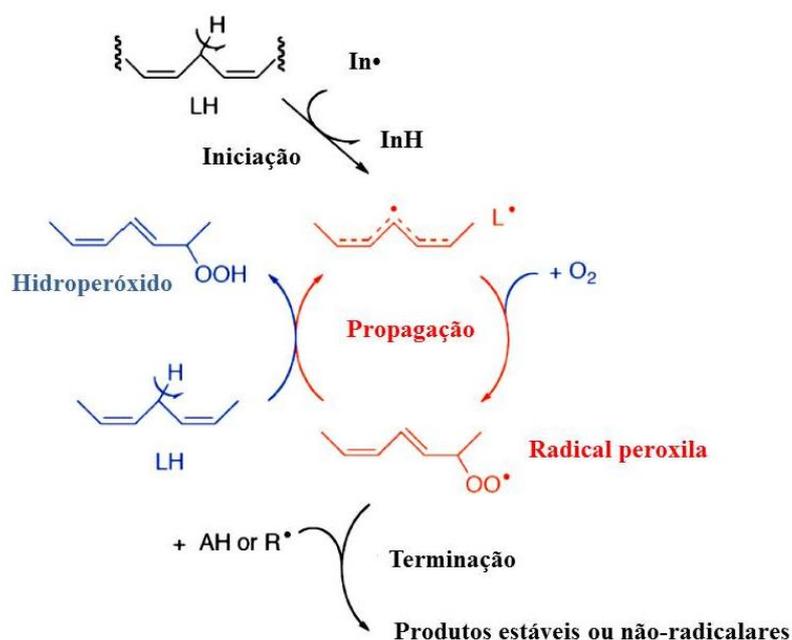
3. De uma forma geral, todos os óleos são suscetíveis à oxidação lipídica. Esta reação oxidativa resulta na degradação irreversível de diversos componentes, causando depreciação nutricional e sensorial dos óleos (Shahidi & Zhong, 2010a; Choe & Min, 2006). Além disso, compostos potencialmente tóxicos podem ser formados ao longo desta reação (Sutherland *et al.*, 2007; Seppanen & Csallany, 2002). Conseqüentemente, a oxidação lipídica tem implicação direta no valor nutricional, comercial e na segurança dos óleos vegetais, representando importante causa de perdas econômicas para a indústria de alimentos (Chaiyasit *et al.*, 2007). Portanto, torna-se relevante o conhecimento da estabilidade oxidativa bem como das transformações

químicas ocorridas ao longo do processo oxidativo para um adequado controle de qualidade dos óleos vegetais.

### 3.1 Mecanismo geral da oxidação lipídica e seus produtos

A oxidação lipídica envolve complexas reações radiculares autopropagadoras, originadas a partir da oxidação dos ácidos graxos insaturados dos óleos vegetais pelas espécies reativas de oxigênio, moléculas que apresentam elétrons de valência não emparelhados, cuja maioria pode ser considerada um radical livre (Choe & Min, 2006).

Essa reação oxidativa inicia-se de maneira auto-catalítica ou acelerada pela presença de metais de transição, da luz, de temperaturas elevadas e de altas concentrações de oxigênio. No entanto, a oxidação lipídica sempre se divide em três etapas: iniciação, propagação e terminação, as quais podem ser inibidas ou retardadas pela ação dos diferentes antioxidantes presentes nos óleos vegetais (Figura 3; Schneider, 2009).



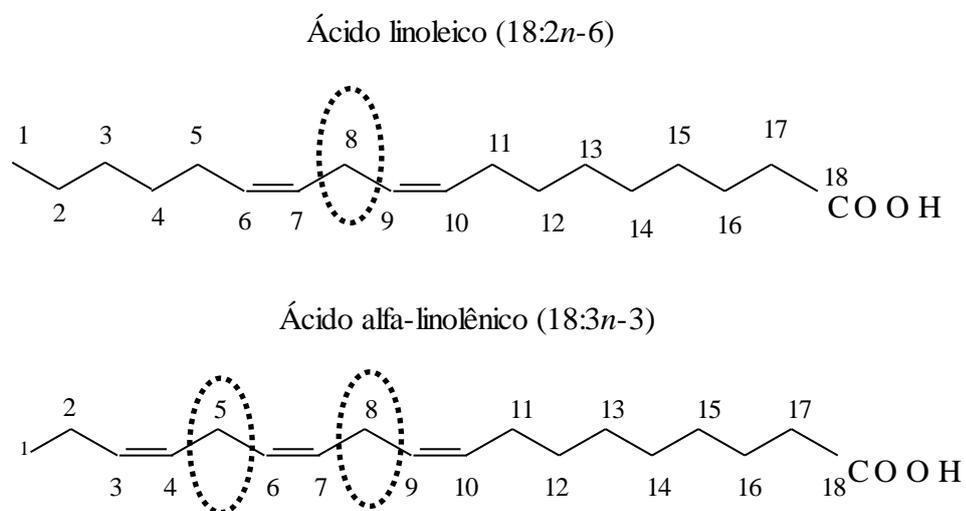
**Figura 3.** Principais etapas da oxidação lipídica de óleos vegetais.  $In\cdot$ : radical iniciador; LH: substrato lipídico insaturado;  $L\cdot$ : radical alquila; AH: antioxidante (Adaptado de Schneider, 2009).

Conforme apresentado na Figura 3, na etapa de iniciação, o radical lipídico alquila ( $L^\bullet$ ) é formado através da abstração de um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos insaturados por um radical iniciador ( $In^\bullet$ ) cuja via de formação ainda não está completamente elucidada (Silvagni *et al.*, 2010). Durante esta etapa, existe o acúmulo crescente de  $L^\bullet$  que na presença do oxigênio forma o radical lipídico peroxila ( $LOO^\bullet$ ), dando início a principal etapa da oxidação lipídica: a etapa de propagação (Chaiyasit *et al.*, 2007; Frankel, 2005a).

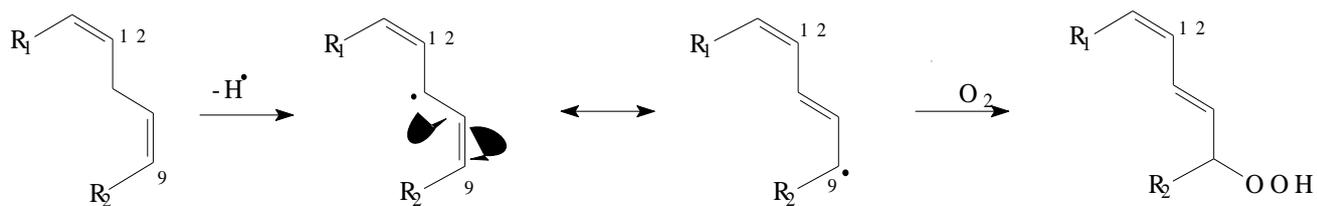
A etapa de propagação envolve baixa energia de ativação e, conseqüentemente, uma alta constante de velocidade da reação, ocorrendo rapidamente. Desta forma, o radical  $LOO^\bullet$  é capaz de abstrair um átomo de H de outro ácido graxo insaturado rapidamente, resultando na formação do principal produto primário da oxidação, os hidroperóxidos lipídicos (LOOH). Um novo radical  $L^\bullet$  também é formado que reiniciará a sequência da reação em cadeia, gerando um acúmulo de espécies radicalares (Laguerre *et al.*, 2007).

Durante a etapa de propagação, a abstração do H da molécula de ácido graxo insaturado pelo  $LOO^\bullet$  ocorre, preferencialmente, nos átomos de carbono que apresentam baixa energia de dissociação de ligação, ou seja, naqueles carbonos mais próximos das duplas ligações, denominados carbonos  $\alpha$ -metilênicos. Conseqüentemente, os grupos  $\alpha$ -metilênicos presentes entre duas duplas ligações vizinhas, como no caso da estrutura do 18:2n-6 e do 18:3n-3, são oxidados com maior facilidade, tornando estes ácidos graxos os principais substratos da oxidação lipídica em óleos vegetais (Min & Boff, 2008; Figura 4).

Neste contexto, os LOOH formados a partir da abstração de um átomo de H do 18:2n-6 podem apresentar dupla ligação conjugada em sua estrutura. Os LOOH conjugados, denominados de dienos conjugados, são formados devido a um rearranjo da dupla ligação do carbono  $\alpha$ -metileno interrompido, sendo também considerados produtos primários da oxidação lipídica (Frankel, 2005; Figura 5).



**Figura 4.** Posicionamento dos carbonos  $\alpha$ -metilênicos não interrompidos nos principais ácidos graxos insaturados substratos para a oxidação lipídica em óleos vegetais (Nomenclatura dos ácidos graxos pelo sistema  $\omega$ ).



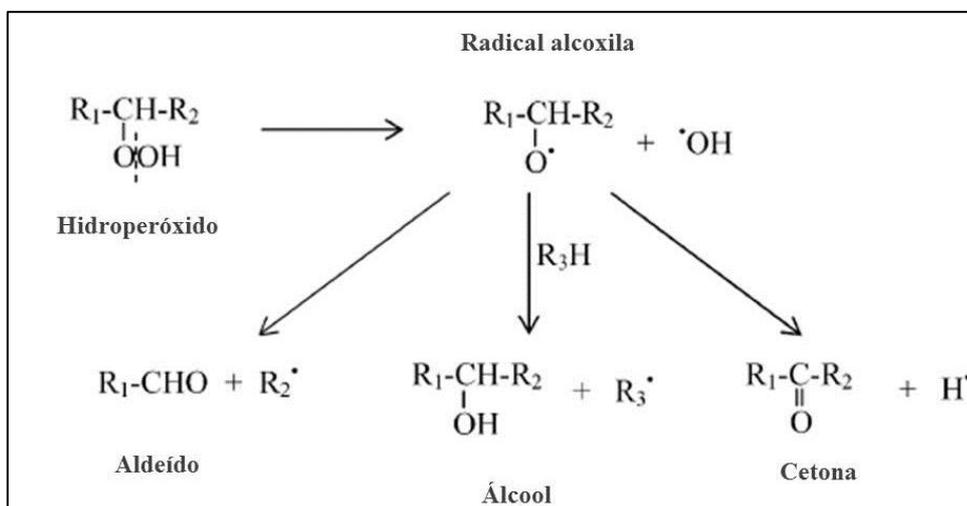
**Figura 5.** Esquema de formação de dienos conjugados a partir da abstração de hidrogênio do ácido linoleico (18:2n-6).

Muitos isômeros de LOOH são formados durante a etapa de propagação, os quais variam de acordo com a composição em ácidos graxos dos óleos vegetais. No entanto, de uma forma geral, os LOOH são intermediários instáveis e decompõem-se espontaneamente ou em reações aceleradas pela presença de temperaturas elevadas ou de metais de transição. Usualmente, a decomposição dos LOOH ocorre através da hidrólise da ligação entre seus dois átomos de oxigênio que apresenta uma baixa energia de ligação (44 kcal/mol) quando comparada a energia de ligação entre os átomos de oxigênio e hidrogênio (90 Kcal/mol). Após a decomposição, um radical hidroxila ( $\text{OH}^\bullet$ ) e outro radical  $\text{LO}^\bullet$  são formados (Choe & Min, 2009).

Na sequência, o radical  $\text{LO}^\bullet$  formado, participa de diversas reações secundárias resultando em um grande número de compostos de diferentes pesos moleculares, os quais correspondem aos produtos secundários da oxidação lipídica. A principal via de formação dos produtos secundários ocorre a partir da clivagem homolítica do  $\text{LO}^\bullet$ , conhecida como reação de  *$\beta$ -clivagem* (Figura 6). Esta reação gera diferentes compostos voláteis de baixo peso molecular, tais como os aldeídos, cetonas, álcoois e hidrocarbonetos de cadeia curta, responsáveis pelo *off-flavor* dos óleos oxidados (Silvagni *et al.*, 2010; Chaiyasit *et al.*, 2007). Por conseguinte, embora os LOOH sejam incolores e inodoros, estas estruturas são as principais precursoras do aroma característico de ranço dos óleos vegetais (Silva, 1999).

Com a progressão da reação em cadeia, existe uma extensa formação de produtos secundários e de compostos radicalares. Neste contexto, os compostos radicalares tendem a polimerizarem-se entre si nos estágios avançados da oxidação lipídica, resultando em produtos terciários. Os produtos terciários são os principais produtos da etapa de terminação e correspondem a dímeros e polímeros não radicalares de alto peso molecular que influenciam

negativamente nas características sensoriais dos óleos como cor e viscosidade (Dana & Saguy, 2001).



**Figura 6.** Decomposição dos hidroperóxidos por β-clivagem homolítica do radical alcóxila. OH<sup>•</sup> - radical hidroxila; R<sub>3</sub>H – substrato lipídico.

Normalmente, a oxidação lipídica ocorre lentamente nos estágios iniciais até atingir um aumento repentino na formação dos produtos de oxidação, intervalo conhecido como *período de indução*. Desta forma, o período de indução reflete a resistência dos óleos à degradação lipídica, que por sua vez corresponde à estabilidade oxidativa dos óleos. Portanto, óleos com um período de indução mais prolongado são considerados mais estáveis.

Neste contexto, a estabilidade oxidativa é um importante parâmetro para prever o grau de degradação dos óleos em diferentes condições de armazenamento e processamentos tecnológicos (Shahidi & Zong, 2010a; Choe & Min, 2006). Existem variados indicadores de estabilidade oxidativa que refletem a formação dos produtos primários e secundários da oxidação lipídica, sendo amplamente utilizados para acompanhar o grau de oxidação dos

óleos (Frankel, 1993). No entanto, até o momento, não existe nenhum indicador que se refira, diretamente, ao teor de compostos antioxidantes presentes nos óleos vegetais.

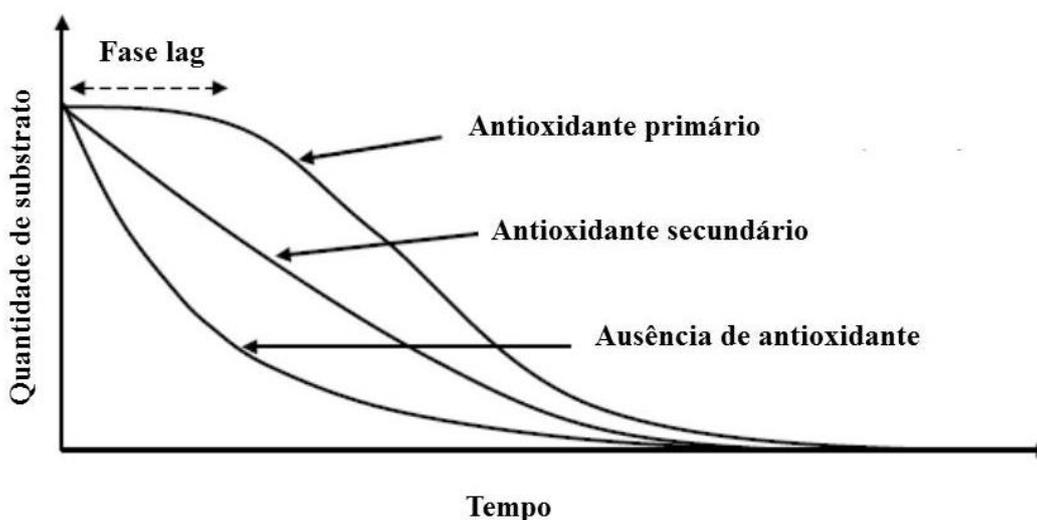
Os óleos vegetais contêm diversos antioxidantes naturais, tais como, os tocoferóis, os compostos fenólicos, os fitoesteróis e os carotenoides, que são capazes de inibir e/ou retardar a oxidação lipídica. Por outro lado, os óleos também podem ser adicionados de antioxidantes sintéticos como o tert-butil-hidroquinona (TBHQ), o butil-hidroxianisol (BHA) e o butil-hidroxitolueno (BHT), porém possíveis efeitos toxicológicos já foram associados a estes antioxidantes (Ramalho & Jorge, 2006).

Os antioxidantes presentes nos óleos vegetais prolongam o período de indução ou reduzem a taxa de oxidação por meio de diferentes mecanismos, como a ação bloqueadora dos radicais livres e do oxigênio singlete e a ação quelante de metais de transição. Estes mecanismos dividem os antioxidantes em dois grupos, os antioxidantes primários e os secundários (Chaiyasit *et al.*, 2007).

Os antioxidantes primários, tais como os tocoferóis e os compostos fenólicos, agem interrompendo a reação em cadeia através da doação de H para os radicais livres, especialmente para os  $LOO^{\bullet}$ . A eficiência destes antioxidantes está relacionada, em sua maior parte, com a sua habilidade em doar H para os radicais livres. Desta forma, a energia de dissociação de ligação e o potencial de ionização de cada composto são fatores fundamentais para determinar a sua eficiência como antioxidante (Prior *et al.*, 2005). Além disso, compostos com o potencial de redução menor do que os dos radicais livres são capazes de bloquear estas estruturas. Neste contexto, os radicais  $L^{\bullet}$ ,  $LO^{\bullet}$  e o  $LOO^{\bullet}$  apresentam potencial de redução de 600 mV, 1600 mV e 1000 mV, respectivamente. Por outro lado, os tocoferóis, principais antioxidantes lipofílicos dos óleos vegetais, apresentem potencial de redução igual a 500 mV (Choe & Min, 2006).

Em contrapartida, os antioxidantes secundários interrompem a reação em cadeia sem interagir diretamente com os radicais livres. Os antioxidantes secundários tais como o ácido cítrico (adicionado aos óleos), podem apresentar ação quelante aos metais de transição, inibindo a decomposição dos LOOH. Da mesma forma, o  $\beta$ -caroteno pode inativar o oxigênio singleto, reduzindo a taxa de oxidação iniciada por esta molécula (Chaiyasit *et al.*, 2007).

Portanto, os antioxidantes primários e secundários inibem e/ou retardam a oxidação lipídica em diferentes etapas. Além disso, os antioxidantes primários induzem ao aparecimento de uma fase *lag* (estacionária) relacionada ao período de indução dos óleos. Essa fase dura até o total desaparecimento do antioxidante. Entretanto, os antioxidantes secundários não ocasionam o aparecimento da fase *lag* (Figura 7; Laguerre *et al.*, 2007).



**Figura 7.** Influência dos antioxidantes primários e secundários para o aparecimento da fase *lag* durante a oxidação lipídica dos óleos vegetais (Adaptado de Laguerre *et al.*, 2007).

A ação dos antioxidantes nos óleos vegetais pode ser influenciada por vários fatores como a concentração destes compostos nos óleos, sua interação sinérgica e/ou antagônica com os outros constituintes bem como a sua localização nas diferentes interfaces ar-óleo e água-

óleo presente nos óleos vegetais (Laguerre *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2011; Frankel, 1996). Além disso, as diferentes vias de iniciação da oxidação lipídica também influenciam na eficiência dos antioxidantes, alterando a formação dos produtos da oxidação, assim como a estabilidade oxidativa dos óleos.

### 3.2 Principais vias de iniciação da oxidação lipídica e as suas diferenças

A oxidação lipídica é acelerada, principalmente, pela presença de temperaturas elevadas e pela exposição à luz. Desta forma, a oxidação nos óleos vegetais pode iniciar-se por meio de vias distintas, destacando-se três vias principais, a saber: via de auto-oxidação (iniciada de forma espontânea), de foto-oxidação (iniciada pela exposição à luz) e de termo-oxidação (iniciada pela exposição a temperaturas  $> 100^{\circ}\text{C}$ ). As três vias de iniciação apresentam uma cinética diferenciada em relação às etapas de iniciação, propagação e terminação. Conseqüentemente, os produtos formados em cada via de iniciação podem apresentar variação quanto à estrutura química e concentração, influenciando na ação dos antioxidantes e no grau de oxidação dos óleos vegetais.

A auto-oxidação é o processo que acontece espontaneamente em condições moderadas do meio, sendo o principal processo de degradação dos óleos vegetais frescos (Choe & Min 2006). Por outro lado, a foto-oxidação é a principal forma de degradação dos óleos vegetais acondicionadas em embalagens plásticas transparentes durante a sua comercialização (Sacchi *et al.*, 2008), enquanto a termo-oxidação representa o principal mecanismo de oxidação que ocorre em óleos submetidos ao processo tecnológico de fritura (Dana & Saguy, 2001).

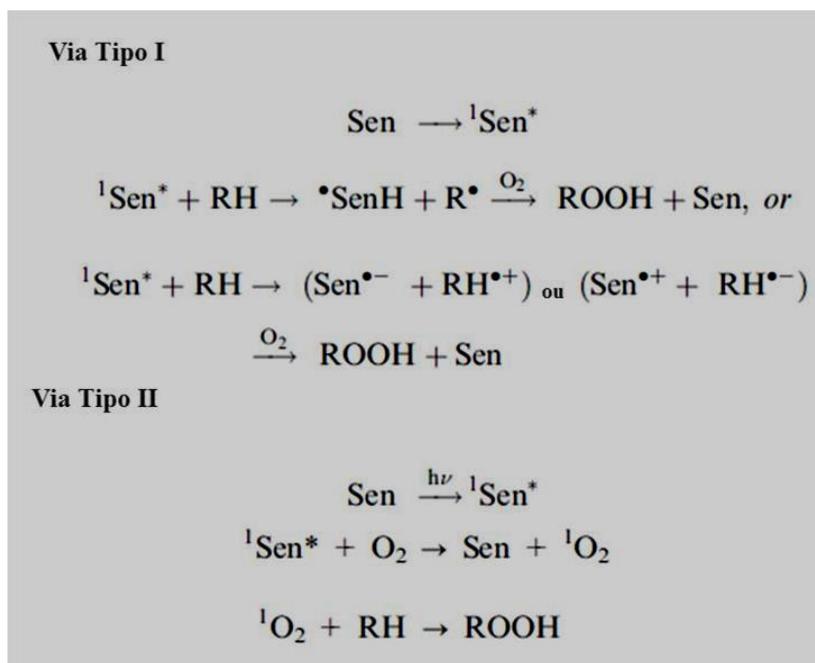
As principais diferenças entre as três vias de iniciação ocorrem devido ao tipo de oxigênio envolvido na reação bem como as suas concentrações. Na via de auto-oxidação, o oxigênio tripleto ( $^3\text{O}_2$ ) interage com o carbono  $\alpha$ -metilênico dos radicais lipídicos, enquanto

na via de foto-oxidação, o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) interage diretamente com as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados. Por outro lado, na via de termo-oxidação, a disponibilidade de  $^3\text{O}_2$  é reduzida devido às temperaturas elevadas, diminuindo a sua interação com os radicais lipídicos (Shahidi & Zhong, 2010a; Frankel, 2005a; Hamilton *et al.*, 1997).

O  $^3\text{O}_2$  é um átomo biradical que representa a forma mais abundante e estável de oxigênio da natureza. O  $^3\text{O}_2$  apresenta um par de elétrons livre nos seus orbitais moleculares de mais alta energia, promovendo a sua reação com os radicais lipídicos na posição do carbono  $\alpha$ -metilênico. Por outro lado, a forma excitada do  $^3\text{O}_2$ , o  $^1\text{O}_2$  (não radical) apresenta um orbital com elétrons pareados e outro completamente vazio, tornando-o mais eletrofílico do que o  $^3\text{O}_2$ . Devido a sua maior afinidade por elétrons, o  $^1\text{O}_2$  é capaz de reagir diretamente com as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, resultando em interações extremamente rápidas. Relata-se que o  $^1\text{O}_2$  pode reagir com os ácidos graxos insaturados de 1000 a 3000 vezes mais rápido do que o  $^3\text{O}_2$ . Desta forma, o  $^3\text{O}_2$  e o  $^1\text{O}_2$  reagem com os ácidos graxos em localização diferenciada, resultando em produtos de oxidação, em especial os LOOH, quantitativa e qualitativamente diferentes (Choe & Min, 2006).

Neste contexto, a interação entre os ácidos graxos insaturados e o  $^3\text{O}_2$  e suas espécies reativas corre de acordo com o mecanismo básico descrito no item 3.1 durante a via de auto-oxidação. A via de auto-oxidação é caracterizada pela presença de teores significativos de LOOH devido à relativa estabilidade destas estruturas em condições moderadas de temperatura. Demonstra-se que a formação dos produtos durante a via de auto-oxidação aumenta proporcionalmente ao aumento de temperatura, no entanto, o mecanismo de oxidação somente altera-se significativamente acima de  $60^\circ\text{C}$ . Nestas temperaturas a solubilidade do  $^3\text{O}_2$  no meio encontra-se reduzida, alterando a cinética da reação de oxidação (Gómez-Alonso *et al.*, 2004).

Em relação à via de foto-oxidação são necessários três elementos iniciais para que a reação ocorra:  $^1\text{O}_2$ , foto-sensibilizadores e luz visível ou ultravioleta. Os foto-sensibilizadores presentes nos óleos absorvem energia da luz e são convertidos aos seus estados químicos excitados ( $^1\text{Sen}^*$ ). Todavia, o estado excitado dos foto-sensibilizadores é bastante instável e tende a voltar para o seu estado fundamental. Esta interconversão acontece por meio da reação direta com o substrato lipídico (via tipo I) gerando radicais livres; ou por meio da conversão do  $^3\text{O}_2$  a  $^1\text{O}_2$  que iniciará o processo oxidativa, gerando LOOH (via tipo II; Figura 8; Shahidi & Zong, 2010a). Desta forma, a via Tipo II não forma radicais livres nos estágios iniciais da oxidação. Embora as duas vias de foto-oxidação possam acontecer nos óleos vegetais, a via tipo II é o principal mecanismo de foto-oxidação dos óleos, facilitado pela presença da clorofila, um dos principais pigmentos desta matriz alimentar (Choe & Min, 2006).



**Figura 8.** Diferentes mecanismos da via de foto-oxidação nos óleos vegetais. Sen = fotossensibilizador no estado fundamental;  $^1\text{Sen}^*$  = fotossensibilizador no estado excitado; ROOH= hidroperóxido; RH= substrato lipídico;  $\text{R}^\bullet$  = radical alcóxila.

Na foto-oxidação, os radicais livres formam-se somente após a decomposição dos LOOH, dando início à propagação da reação em cadeia. Portanto, a foto-oxidação caracteriza-se pela ausência de um período de indução devido à rápida formação dos LOOH. Desta forma, os LOOH continuam sendo os principais produtos de oxidação formados (Frankel, 2005).

Rukmini & Raharjo (2010) e Rastrelli *et al.* (2002) compararam a formação de LOOH em óleo de coco e azeite de oliva oxidados a 60°C (no escuro) e foto-oxidados por um mesmo período de tempo. Ambos os estudos observaram que a formação de LOOH foi significativamente maior nos óleos foto-oxidados. Além disso, a percepção do *off-flavor* de ranço nos óleos de coco foto-oxidados antecedeu a dos óleos protegidos da luz. Portanto, a via de foto-oxidação parece alterar as características sensoriais e nutricionais dos óleos de forma mais rápida do que a via de auto-oxidação.

Diferente das duas condições de oxidação relatadas até o momento, a via de termo-oxidação é acelerada devido a presença de temperaturas elevadas (> 100°C) que tornam limitante a disponibilidade do  $^3\text{O}_2$  no meio de reação, alterando significativamente a cinética da oxidação lipídica. Por conseguinte, a termo-oxidação é a via oxidativa mais distinta entre as três vias (Kamal-eldin, 2006; Frankel, 2005).

Durante a termo-oxidação, a importância da etapa de propagação é minimizada, tendo em vista que a taxa de reação do  $^3\text{O}_2$  com os  $\text{L}^\bullet$  iniciais é bastante reduzida. Desta forma, existe uma diminuição na formação de LOOH e um acúmulo de  $\text{L}^\bullet$ . Por sua vez, os  $\text{L}^\bullet$  polimerizam-se a produtos mais estáveis e de alto peso molecular, correspondentes os produtos terciários da oxidação. Além disso, os poucos LOOH formados são altamente instáveis e decompõem-se rapidamente em uma série de compostos voláteis e não voláteis.

Portanto, os produtos secundários e, especialmente, os produtos terciários são os principais produtos da termo-oxidação (Choe & Min, 2007).

A via de termo-oxidação usualmente ocorre em processos de fritura de alimentos cuja temperatura utilizada varia entre 180-240°C. Durante o processo de fritura, outras reações químicas além da termo-oxidação ocorrem, tais como as reações de hidrólise lipídica (devido a umidade proveniente do alimento) e a polimerização térmica, resultando em dímeros e polímeros de triacilgliceróis. Embora as reações de termo-oxidação, hidrólise e polimerização térmica estejam inter-relacionadas, o estudo da termo-oxidação de forma isolada é importante para avaliar a influência da estabilidade dos óleos para a qualidade do alimento submetido ao processo de fritura (Dana & Saguy, 2001).

Portanto, observa-se que a oxidação lipídica dos óleos vegetais é um conjunto de reações que apresentam a sua cinética influenciada por diferentes fatores, tais como o tipo e concentração de oxigênio e de pró-oxidantes presentes (metais de transição, ácidos graxos livres, clorofilas, produtos da oxidação), assim como o tipo de energia disponível no meio (calor ou luz). Além disso, o grau de degradação oxidativa dos óleos também está fortemente associado com composição química em ácidos graxos e antioxidantes naturais, especialmente em tocóis e compostos fenólicos (Roman *et al.*, 2013; Silvagni *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010; Warner & Moser, 2009; Savage *et al.*, 1999).

Neste contexto, os mecanismos da oxidação lipídica e os fatores que os influenciam tem sido extensivamente estudados a fim de obter mais informações a respeito dos determinantes químicos da estabilidade oxidativa dos óleos vegetais. Entretanto, ainda são poucos os estudos que avaliam simultaneamente a influência das transformações ocorridas durante a oxidação, tais como a formação e degradação dos produtos de oxidação e

degradação da composição química para a estabilidade oxidativa dos óleos, tornando-se relevante o seu estudo.

### *3.3 Influência da composição química para a oxidação lipídica dos óleos vegetais*

A importância da composição química para o grau de oxidação lipídica dos óleos tem sido investigada por diferentes grupos de pesquisa, especialmente em relação à influência da composição em ácidos graxos, tocoferóis e compostos fenólicos (Chen *et al.*, 2011; Seppanen *et al.*, 2010; Kamal-Eldin, 2006; Huang *et al.*, 1994).

Os óleos vegetais são constituídos, aproximadamente, por 95% de triacilgliceróis, principalmente esterificados a ácidos graxos insaturados (Silva *et al.*, 1999). Os ácidos graxos insaturados são os principais substratos para oxidação lipídica devido à facilidade de abstração de H destas estruturas pelos radicais livres formados durante a oxidação. No entanto, o grau de degradação dos ácidos graxos insaturados varia de acordo com o número de ligações duplas em sua cadeia de hidrocarbonetos (Frankel, 2005a).

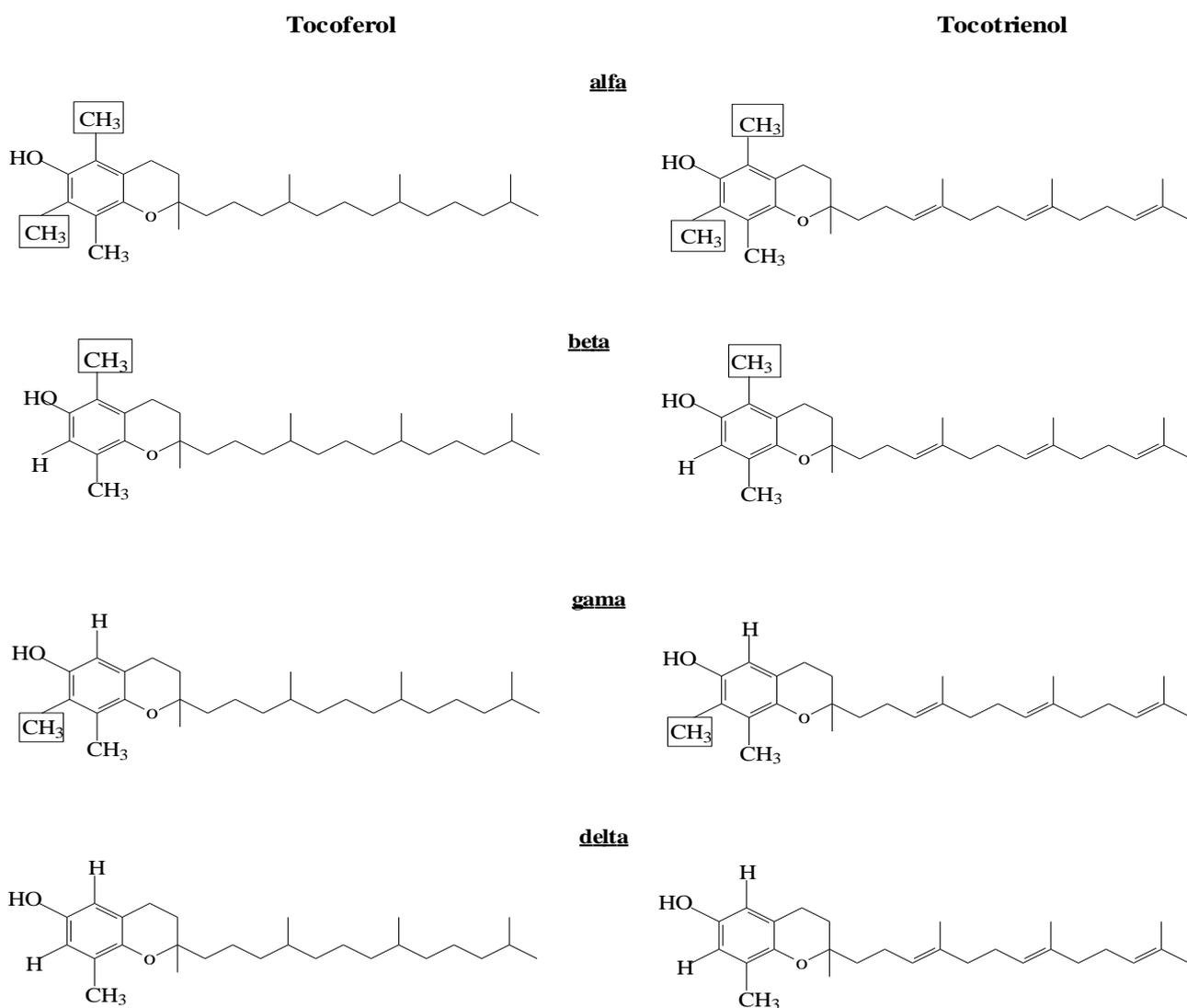
Os principais ácidos graxos insaturados presentes na maioria dos óleos vegetais são o 18:1 $n$ -9, 18:2 $n$ -6 e o 18:3 $n$ -3 cuja taxa de oxidação é na ordem de 1:50:100 e de 1:12:25 considerando a taxa de consumo de oxigênio e a de formação de peróxidos, respectivamente. Desta forma, espera-se que óleos com um maior conteúdo de 18:2 $n$ -6 e de 18:3 $n$ -3 apresentem uma menor estabilidade oxidativa (Min & Boff, 2008).

De fato, Roman *et al.* (2013) observaram que a estabilidade oxidativa dos óleos de girassol (rico em 18:2 $n$ -6) e canola (rico em 18:1 $n$ -9), ambos isentos de tocoferol, esteve relacionada com o tipo de ácido graxo insaturado predominante em cada óleo. No entanto, Hoshina *et al.* (2004) observaram que a posição dos ácidos graxos na estrutura do triacilglicerol também pode influenciar no grau de degradação dos ácidos graxos insaturados.

Alguns autores sugerem que triacilgliceróis contendo ácidos graxos insaturados na posição *sn*-2 são mais estáveis do que aqueles contendo os mesmos ácidos graxos nas posições *sn*-1 ou *sn*-3. Contudo, ainda existem muitas controversas a respeito desta hipótese (Kamal-Eldin, 2006).

Além disso, os compostos antioxidantes presentes nos óleos vegetais também podem influenciar no grau de oxidação dos ácidos graxos insaturados e, conseqüentemente, na estabilidade oxidativa dos óleos. Barrera-Arellano *et al.* (2002) observaram que, em óleos oxidados a 180°C por 10 horas, a influência do número de instauração dos ácidos graxos para a oxidação dos óleos somente ocorreu para aqueles óleos ausentes de tocoferóis. Neste contexto, relata-se que os óleos vegetais apresentam uma variedade de compostos antioxidantes, destacam-se os tocoferóis e os tocotrienóis, principais antioxidantes lipofílicos dos óleos; e os compostos fenólicos, principais antioxidantes hidrofílicos dos óleos (Shahidi & Zhong, 2010b).

Os tocoferóis e os tocotrienóis (tocóis) fazem parte do grupo da vitamina E e apresentam estruturas químicas similares entre si (Figura 9). Esses compostos são derivados do 6-hidroxicromano e diferenciam-se de acordo com a sua cadeia lateral, completamente saturada, no caso dos tocoferóis, e contendo três ligações duplas, no caso dos tocotrienóis. Existem quatro diferentes formas de tocoferóis e tocotrienóis na natureza, as quais se diferenciam pelo número e posição dos grupos metila no anel cromanol: a forma  $\alpha$  apresenta três grupos metila, as formas  $\beta$  e  $\gamma$  apresentam dois grupos metila e a forma  $\delta$  apresenta apenas um grupo metila. As formas  $\beta$  e  $\gamma$  diferenciam-se pela posição dos grupos metila no anel cromanol, que estão nas posições 5 e 8 e 7 e 8, respectivamente (Seppanen *et al.*, 2010; Hunter & Cahoon, 2007).



**Figura 9.** Estrutura química das diferentes formas de tocoferóis e tocotrienóis existentes nos óleos vegetais (adaptado de Sen *et al.*, 2006).

Os tocóis são considerados antioxidantes primários, reagindo rapidamente com os radicais livres, inibindo a formação de LOOH. Contudo, os tocóis também podem evitar a decomposição dos LOOH (Tabee *et al.*, 2008; Mkinen *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 1994). A atividade antioxidante dos tocoferóis, de acordo com a sua habilidade em doar H, apresenta a seguinte ordem decrescente:  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$  (Seppanen *et al.*, 2010). Entretanto, essa ordem pode ser alterada por diversos fatores, tais como temperatura, concentração de oxigênio

disponível, exposição à luz (Yoshida *et al.*, 2007). Além disso, muitos autores demonstram que a atividade antioxidante dos tocoferóis é dependente das suas concentrações no meio de reação (Dolde & Wang, 2011; Tabee *et al.*, 2008; Kulás & Ackman, 2001; Wagner & Elmadfa, 2000; Huang *et al.*, 1994). Da mesma forma, existem evidências de que em certas condições, o  $\alpha$ -tocoferol também pode agir como pró-oxidante nos óleos vegetais (Elisia *et al.*, 2013; Seppanen *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 1994).

Por outro lado, a atividade antioxidante dos tocotrienóis ainda é pouco investigada. No entanto, os poucos estudos existentes sugerem que os tocotrienóis apresentem atividade antioxidante maior ou igual a dos seus respectivos tocoferóis. Yoshida *et al.* observaram que os tocoferóis e tocotrienóis correspondentes apresentam a mesma eficiência antioxidante contra os ROO<sup>•</sup> formados a partir de um gerador sintético de radicais a 37°C (Yoshida *et al.*, 2007; Yoshida *et al.*, 2003). Contudo, o  $\gamma$ -tocotrienol tende a apresentar uma atividade antioxidante maior do que a do  $\alpha$ -tocotrienol em óleos vegetais (Wong & Radhakrishnan, 2012; Rossi *et al.*, 2007).

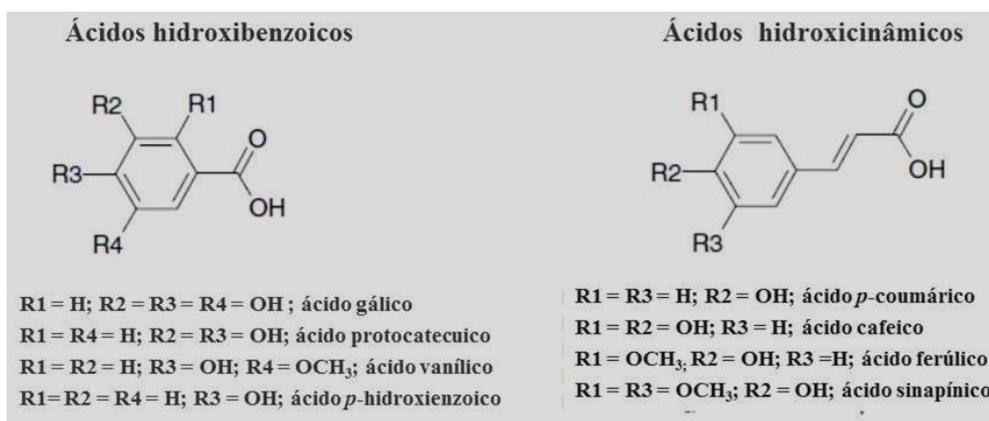
Dolde & Wang (2011) investigaram a estabilidade oxidativa de óleo de milho oxidado a 60°C e adicionado de tocoferóis e tocotrienóis em concentrações que variaram de 100 a 5000 ppm. Esses autores observaram que os  $\alpha$ -tocóis apresentaram atividade pró-oxidante em concentrações acima de 700 ppm. Entretanto, o aumento da atividade antioxidante dos  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocóis foi proporcional ao aumento das suas concentrações. Huang *et al.* (1994) também observaram atividade pró-oxidante do  $\alpha$ -tocoferol em óleo de milho oxidado a 60 °C em relação à formação de LOOH, enquanto o  $\gamma$ -tocoferol inibiu a formação destes produtos em todas as concentrações estudadas. Por outro lado, ambos os tocoferóis inibiram a decomposição dos LOOH.

Entretanto, contrastando com a ação pró-oxidante observada por Dolde & Wang (2011) e Huang *et al.* (1994), Makinen *et al.* (2000) verificaram que o  $\alpha$ -tocoferol apresentou ação antioxidante, independente das suas concentrações, em sistema lipídico de metil-linoleato oxidado a 40°C. Portanto, observa-se que os tocoferóis podem se comportar como antioxidantes ou pró-oxidantes dependendo das suas concentrações, das condições de ensaio e das etapas de oxidação lipídica investigadas, sendo necessários mais estudos para a melhor compreensão da ação antioxidante dos tocois nos óleos vegetais. Além disso, são escassas as informações sobre o comportamento antioxidante da mistura de tocois nas proporções naturalmente presentes nos óleos vegetais durante a oxidação lipídica (Elisia *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2010).

Similarmente, também existem muitas controversas em relação à atividade antioxidante dos compostos fenólicos nos óleos vegetais. Os compostos fenólicos são metabólitos do metabolismo secundário das plantas, sendo amplamente distribuídos no reino vegetal. Este conjunto de compostos divide-se em subgrupos de acordo com a sua estrutura química, a saber: flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, lignanas e estilbenos (Tsao, 2010; Balasundram *et al.*, 2006). Dentre estas classes, os ácidos fenólicos são os principais compostos identificados nos óleos vegetais (Siger *et al.*, 2008).

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por apresentarem um anel benzênico, um grupo carboxila (COOH) e um ou mais grupamentos hidroxila (OH) ligados ao anel benzênico na molécula, dividindo-se em dois grandes grupos: os ácidos hidroxibenzoicos e os hidroxicinâmicos (Figura 10; Soares, 2002). Os principais ácidos hidroxibenzoicos observados nos óleos vegetais são os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e o síringico. Por outro lado, os principais ácidos hidroxicinâmicos observados nos óleos são os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e o sinapínico (Siger *et al.*, 2008). Relata-se

que o azeite de oliva é uma das principais fontes de ácidos fenólicos, sendo o mais investigado entre os óleos vegetais quanto a influencia destes compostos para o grau de oxidação dos óleos (Servili *et al.*, 2009; Brenes *et al.*, 1999).



**Figura 10.** Estrutura química dos principais ácidos fenólicos observados nos óleos vegetais (adaptado de Laguerre *et al.*, 2007).

Neste contexto, assim com os tocóis, os ácidos fenólicos atuam, preferencialmente, como antioxidantes primários nos óleos vegetais. Contudo, os ácidos fenólicos também podem atuar como antioxidantes secundários, evitando a decomposição de LOOH por meio da ação quelante a metais de transição (Tsao, 2010; Robbins, 2003). A ação antioxidante dos ácidos fenólicos é fortemente influenciada pelo número e pela posição das OH no anel aromático, sendo que a proximidade com o grupamento COOH dificulta a doação dos átomos de H para os ROO<sup>•</sup>. Desta forma, os ácidos hidroxicinâmicos tendem a apresentar uma maior atividade antioxidante do que os ácidos hidroxibenzoicos (Rice-Evans *et al.*, 1996).

No entanto, embora se demonstre que a presença de ácidos fenólicos pode aumentar a estabilidade oxidativa dos óleos, ainda não é completamente entendido o papel de cada composto para a prevenção da oxidação lipídica nesta matriz, especialmente devido a grande variedade de ácidos fenólicos que podem existir nos óleos (Khadem & Marles, 2010).

Neste sentido, é bem descrito na literatura a importância do teor de compostos fenólicos totais para minimizar o grau de oxidação em azeite de oliva (Del Carlo *et al.*, 2004; Gómez-Alonso *et al.*, 2006; Psomiadou & Tsimidou, 2002; Velasco & Dobarganes, 2002; Blakes *et al.*, 2002; Ninfali *et al.*, 2001). Além disso, Baldioli *et al.* (1996) observaram que o  $\alpha$ -tocoferol aumentou a atividade antioxidante do 3,4-hidroxifeniletanol em azeite de oliva oxidado a 120 °C, sugerindo um efeito sinérgico entre os tocoferóis e os compostos fenólicos. Todavia, ainda é recente o interesse em investigar a associação entre o teor de compostos fenólicos e a oxidação lipídica em outros tipos de óleos vegetais, inclusive em óleos refinados cujo teor de compostos fenólicos é reduzido (Prado *et al.*, 2013; Torres *et al.*, 2011; Andjelkovic *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Siger *et al.*, 2008).

Atualmente, sugere-se que a atividade antioxidante dos compostos dependa de diversos fatores físico-químicos, como por exemplo, as interações dos antioxidantes entre si e com outros componentes do meio, tais como os ácidos graxos. Além disso, a interação dos compostos antioxidantes com as diferentes interfaces (ar-óleo e/ou água-óleo) presentes nos óleos também podem influenciar em sua atividade (Laguerre *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2011; Chayasit *et al.*, 2008a; Chaiyasit *et al.*, 2008b; Wu *et al.*, 2004). Portanto, o estudo de um composto isoladamente pode levar a resultados limitados. Por isso, existe um crescente interesse por métodos capazes de avaliar de forma integrada a ação de compostos antioxidantes presentes nos óleos vegetais contra as reações de oxidação, tais como os ensaios de capacidade antioxidante total (CAT).

#### **4. Capacidade antioxidante total em óleos vegetais**

O termo capacidade antioxidante total refere-se à ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes nos alimentos contra diferentes espécies reativas (Somogyi *et al.*, 2007). Desta forma, a determinação da CAT em alimentos representa uma abordagem

analítica que tem se tornado muito utilizada, pois trata de ensaios capazes de expressar a ação integrada da composição química de certa matriz contra os efeitos nocivos dos radicais livres (Frankel & Finley, 2008). Além disso, as interações físico-químicas de um dado composto antioxidante com outros componentes da matriz são consideradas (Wu *et al.*, 2004). Portanto, a CAT dos óleos vegetais, possivelmente, sintetiza de forma completa a ação dos antioxidantes e o seu potencial benefício para a estabilidade oxidativa dessa matriz.

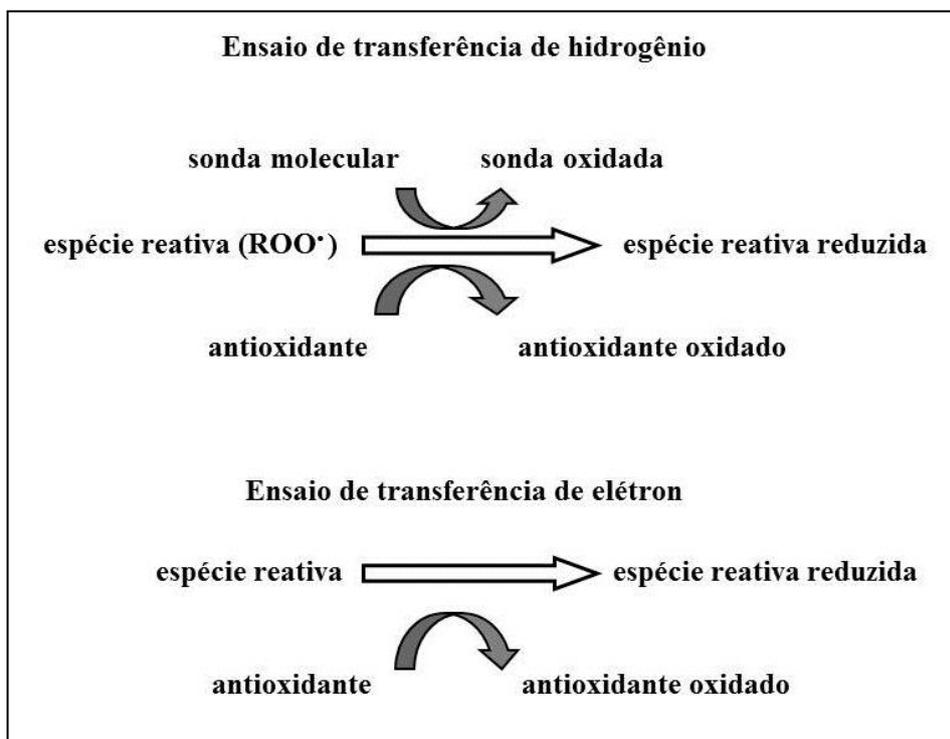
Neste contexto, é crescente o número de investigações a respeito da CAT dos óleos vegetais, porém a determinação da CAT em óleos ainda é considerada um desafio analítico, pois a maioria dos métodos foi desenvolvida para a análise de compostos hidrofílicos em amostras aquosas ou hidrofílicas. Desta forma, ainda não há consenso a respeito da melhor maneira de adaptar os ensaios disponíveis para a determinação da CAT em óleos vegetais (Castelo-Branco & Torres, 2011).

De uma forma geral, os ensaios analíticos utilizados para a determinação da CAT são baseados em dois mecanismos de reação (Figura 11): transferência de átomo de hidrogênio (HAT; do inglês *Hydrogen Atom Transfer*) e transferência de um elétron (SET; do inglês *Single Electron Transfer*). Para ambos os mecanismos de reação o objetivo é determinar o efeito protetor da amostra contra os radicais livres, porém diferenciam-se quanto ao radical iniciador, à cinética da reação e às reações laterais (Magalhães *et al.*, 2008; Hung *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005).

Os métodos baseados no mecanismo de HAT correspondem à capacidade dos antioxidantes em bloquear a ação dos  $\text{ROO}^\bullet$  através da doação de H. Esses ensaios são compostos por um gerador sintético de radicais, responsável pela manutenção do fluxo constante de  $\text{ROO}^\bullet$ , pelos antioxidantes (da amostra ou do padrão) e por uma sonda molecular (substrato oxidável), que quando oxidada pela espécie reativa apresenta sinal mensurável

(absorbância UV-Vis ou fluorescência). Desta forma, o antioxidante inibe, por competição, a oxidação do substrato pela espécie reativa de oxigênio. Conseqüentemente ocorrerá uma mudança no sinal medido e a capacidade antioxidante da amostra pode ser quantificada.

Por outro lado, os métodos baseados no mecanismo de SET envolvem apenas dois componentes: os antioxidantes e o agente oxidante, que também será a sonda molecular, responsável pelo sinal mensurável da reação (absorbância UV-Vis). A sonda oxidante abstrai um elétron do antioxidante, causando uma mudança na sua própria absorbância, permitindo o acompanhamento da reação e a determinação da capacidade antioxidante da amostra.



**Figura 11.** Esquema simplificado dos mecanismos envolvidos na determinação da capacidade antioxidante total por diferentes ensaios (Adaptados de Magalhães *et al.*, 2008).

Muitos ensaios já foram desenvolvidos para determinar a CAT de alimentos, contudo Prior *et al.* (2005) sugeriram que apenas os ensaios de ORAC (do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity*), baseado no mecanismo de HAT; e o de TEAC (do inglês; *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity*) baseado nos mecanismos de HAT e SET são passíveis de determinar a atividade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos em um mesmo meio de reação, tornando-se bons candidatos para a determinação da CAT em óleos vegetais.

O ensaio de ORAC é o método mais indicado para avaliar a capacidade protetora de amostras de alimentos contra os ROO<sup>•</sup>. Huang *et al.* (2002) introduziram e validaram o uso da β-ciclodextrina aleatoriamente metilada como meio para a dispersão dos antioxidantes lipofílicos na solução aquosa do ensaio da ORAC. Na sequência, Miraliakbari & Shahidi (2008c) utilizaram a β-ciclodextrina aleatoriamente metilada no ensaio de ORAC para determinar a CAT de diferentes tipos de óleos de nozes. No entanto, parece que esta adaptação de protocolo ainda é pouco utilizada tendo em vista o pequeno número de estudos que a utilizam.

Por outro lado, o ensaio da TEAC tem sido mais utilizado para a determinação da CAT em óleos vegetais. Pellegrini *et al.* (2003) avaliaram a CAT de óleos de soja, milho, canola e oliva por meio de três ensaios, TEAC, FRAP (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*) e TRAP (do inglês *Total Radical-trapping Antioxidant Potential*) e observaram que apenas o ensaio de TEAC foi compatível com o solvente que dissolveu as amostras de óleos vegetais (*n*-hexano). Desta forma, pode-se sugerir que o ensaio de TEAC possibilita uma determinação mais completa da capacidade antioxidante de óleos, pois é compatível com o uso de solvente suficientemente apolar para dissolver amostras lipídicas.

Previamente em nosso laboratório, determinou-se a CAT de óleos de soja, milho, girassol e canola por meio do ensaio de TEAC cujos valores apresentaram coeficiente de

variação abaixo de 8%, indicando um adequado uso deste ensaio para a determinação da CAT dos óleos vegetais (Castelo-Branco & Torres, 2012). Portanto, é possível que a determinação da CAT por meio do ensaio de TEAC contribua para ampliar o conhecimento sobre a estabilidade oxidativa dos óleos e de seus determinantes químicos, bem como, pode contribuir para o desenvolvimento de novas tecnologias industriais efetivas no controle de qualidade integral dos óleos vegetais. Entretanto, ainda são escassos os estudos que abordam os efeitos da ação integrada dos compostos presentes nos óleos na prevenção da oxidação lipídica, especialmente investigando o potencial uso dos ensaios de CAT como indicadores de qualidade oxidativa dos óleos.

#### **5. Estatística multivariada: uma abordagem analítica para acessar a relação entre a estabilidade oxidativa e a CAT dos óleos vegetais.**

A análise estatística multivariada consiste em um conjunto de métodos que, simultaneamente, analisa múltiplas medidas em relação a cada indivíduo ou objeto investigado. Desta forma, a aplicação de técnicas estatísticas multivariadas possibilita a avaliação detalhada das associações entre duas ou mais variáveis independentes (variáveis preditoras) sobre uma ou mais variáveis dependentes (variáveis de resposta), resultando em uma maior compreensão dos dados (Mutihac & Mutihac, 2008).

A análise estatística multivariada tem sido amplamente utilizada em pesquisas nas áreas de ciências biológicas e comportamentais. No entanto, o interesse pela aplicação destes métodos multivariados expandiu-se a outras áreas tais como, as áreas de educação, engenharia, física e química (Ranher, 2002). Entretanto, ainda existem poucos estudos na área de Ciência de Alimentos utilizando essa abordagem. Neste contexto, a estatística multivariada parece ser uma ferramenta útil para aumentar o conhecimento sobre o

comportamento de matrizes alimentares complexas, tais como os óleos vegetais, simplificando a interpretação da relação entre a estabilidade oxidativa e a CAT dos óleos vegetais.

Os numerosos métodos de estatística multivariada existentes consideram as correlações naturais entre as múltiplas influências de um comportamento de forma separada de seus efeitos, evitando a multicolinearidade entre as variáveis e resultando em uma resposta com um maior grau de confiabilidade. Desta forma, os métodos de estatística multivariada possibilitam a redução de um grande número de variáveis a um pequeno grupo de variáveis de relevância estatística, simplificando a interpretação de dados.

A partir deste novo conjunto de dados é possível identificar padrões de comportamento, por exemplo, após a aplicação da Análise de Componentes Principais (PCA), ou verificar a relação de dependência entre as variáveis assim como prever uma ou mais variáveis por meio do uso de análises Regressão Linear Múltipla, Modelo Linear Generalizado, Correlações Canônicas, entre outros (Anderson & Black, 1998). Deste modo, essa abordagem estatística permite avaliar conjuntamente o papel do comportamento da composição química e dos produtos da oxidação lipídica para a estabilidade oxidativa e para a CAT, gerando uma informação mais completa sobre a qualidade global dos óleos vegetais.

Portanto, um estudo amplo, investigando os diferentes mecanismos da oxidação lipídica e os seus produtos, em diferentes óleos, associado à investigação da CAT e seus determinantes por meio de uma abordagem multivariada tem grande potencial para contribuir com conhecimentos sobre a estabilidade oxidativa dos óleos, bem como, para inovações na aplicação da CAT como potencial indicador da qualidade integral de óleos comestíveis.

## **Objetivos**

## **Objetivo Geral**

Avaliar as transformações químicas e a estabilidade oxidativa de diferentes óleos vegetais, em diferentes condições de oxidação acelerada, a fim de investigar as suas relações com a capacidade antioxidante total dos óleos por meio da aplicação de estatística multivariada.

## **Objetivos Específicos**

- Investigar a influência da composição inicial dos óleos vegetais em ácidos graxos, tocóis e compostos fenólicos totais para a sua estabilidade oxidativa e sua capacidade antioxidante total;
- Avaliar as transformações na composição em ácidos graxos, tocoferóis e compostos fenólicos totais durante diferentes condições de oxidação acelerada, investigando suas relações com a estabilidade oxidativa e a capacidade antioxidante total dos óleos;
- Investigar a relação entre a estabilidade oxidativa e a capacidade antioxidante total dos óleos vegetais a fim de avaliar o potencial uso do ensaio de TEAC como indicador global da qualidade de óleos vegetais.

No presente trabalho, os objetivos específicos resultaram em três estudos diferenciados que serão apresentados, a seguir, na forma de capítulos.

## **Capítulo 1**

*Influência da composição inicial em ácidos graxos, tocóis e compostos fenólicos totais para a estabilidade oxidativa e para a capacidade antioxidante total de óleos vegetais*

## 1. Introdução

Atualmente, existe uma extensa literatura que demonstra a associação entre os ácidos graxos, os tocóis e os compostos fenólicos com os diferentes ensaios de CAT e indicadores de estabilidade oxidativa (Marmesat *et al.*, 2012; Zajdenweg *et al.*, 2011; Farhoosh *et al.*, 2009b; Miraliakbari & Shahidi, 2008b; Miraliakbari & Shahidi, 2008c; Tuberoso *et al.*, 2007; Sánchez *et al.*, 2007; Cheung *et al.*, 2007; Kamal-Eldin, 2006; Pellegrini *et al.*, 2003; Ninfali *et al.*, 2002; Ninfali *et al.*, 2001). No entanto, a contribuição da composição química para a CAT e a estabilidade oxidativa depende de diversos fatores físico-químicos, especialmente das interações sinérgicas e/ou antagônicas entre os compostos presentes nos óleos vegetais (Shahidi & Zong, 2010; Choe & Min, 2006; Frankel, 1996). Por sua vez, a maioria dos estudos que investiga as associações entre a CAT, a estabilidade oxidativa e a composição química dos óleos utilizam análises de estatística univariada, como a correlação de *Pearson*, as quais não eliminam os efeitos das associações indiretas entre as variáveis (Flores *et al.*, 1998).

Neste contexto, existem diferentes métodos estatísticos multivariados recomendados para avaliar as associações entre uma variável dependente e diversas variáveis independentes, identificando os determinantes para cada variável a ser estudada, tais como as análises de Regressão Linear Múltipla (RLM) e de Modelo Linear Generalizado (GLM). Além disso, estes métodos também possibilitam a predição das variáveis dependentes através da discriminação dos seus principais determinantes (Mutihac & Mutihac, 2008).

Aparício *et al.* (1999) e Savage *et al.* (1999), por meio de modelos estatísticos multivariados, identificaram os principais determinantes da estabilidade oxidativa de diferentes tipos de óleos. Da mesma forma, Del Carlo *et al.* (2004) e Castelo-Branco & Torres (2012) identificaram os principais determinantes a CAT dos óleos vegetais.

Aparício *et al.* (1999), por meio de modelos ajustados por RLM, observaram um efeito sinérgico entre os compostos fenólicos totais e a razão 18:1n-9/18:2n-6, o qual contribuiu com 78% da variabilidade da estabilidade oxidativa do azeite de oliva, enquanto os tocoferóis totais contribuíram com apenas 9% da variabilidade. Por outro lado, Savage *et al.* (1999), após aplicação de GLM, observaram que os principais determinantes para a estabilidade oxidativa de óleos de noz americana foram os ácidos graxos 18:1n-9, 18:2n-6 e o 20:1n-9 (ácido gadoleico).

Em relação à CAT, Del Carlo *et al.* (2004) não observaram contribuição significativa de nenhum composto fenólico presente no azeite de oliva, enquanto Castelo-Branco & Torres (2012), após o ajuste e a validação de modelos por GLM, observaram que o tipo de óleo, o  $\gamma$ - e o  $\delta$ -tocoferol contribuíram com a maior variabilidade da CAT de óleos refinados de soja, milho, girassol e canola. Neste estudo, o  $\gamma$ -tocoferol foi o principal determinante químico da CAT dos óleos. No entanto, a possível contribuição dos compostos fenólicos para a CAT dos óleos vegetais não foi investigada.

Portanto, ainda são bastante controversos os resultados quanto aos principais determinantes químicos da CAT e da estabilidade oxidativa dos óleos vegetais, especialmente quando diferentes tipos de óleos são analisados. Desta forma, torna-se relevante o seu estudo, especialmente aliado à análise estatística multivariada.

## 2. Objetivos

### Geral

Investigar a influência da composição química em ácidos graxos, tocóis e compostos fenólicos totais para a estabilidade oxidativa e a capacidade antioxidante total de diferentes tipos de óleos vegetais, identificando os seus principais determinantes por meio da aplicação de estatística multivariada.

### Específicos

- Determinar a composição química inicial em ácidos graxos, tocóis e compostos fenólicos totais em óleos vegetais refinados de soja, milho, girassol e canola e em óleos de nozes prensados a frio de castanha-do-Brasil, noz-pecã, avelã, amêndoa doce e macadâmia;
- Avaliar a qualidade inicial dos óleos por meio dos índices de peróxido e de acidez;
- Determinar a estabilidade oxidativa e a capacidade antioxidante total dos óleos por meio do método de *Rancimat* e do ensaio de TEAC, respectivamente;
- Investigar os determinantes químicos da estabilidade oxidativa e da capacidade antioxidante total dos óleos por meio da aplicação da análise de Modelo Linear Generalizado

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Reagentes e Padrões**

Os padrões de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ - tocoferóis, o padrão dos ésteres metílicos de ácidos graxos (37 FAME mix), o 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico (Trolox) e o 2,2'-azino-bis-(3-etil-benzoatizolina)-6-sulfônico (ABTS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Todos os solventes utilizados foram de grau cromatográfico (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil).

#### **3.2 Aliquotagem e armazenamento das amostras**

Amostras de óleos vegetais refinados de soja, milho, girassol e canola foram obtidas no comércio do Rio de Janeiro, enquanto as amostras de óleos de nozes prensados a frio (amêndoa doce, avelã, castanha-do-Brasil, macadâmia e noz-pecã) foram obtidas em loja especializada na cidade de São Paulo. Para cada tipo de óleo vegetal refinado foram selecionadas três marcas diferentes, consideradas as principais marcas comercializadas, tendo em vista a sua disponibilidade de venda nos principais mercados da cidade. Apenas uma marca foi selecionada para os óleos de nozes prensados a frio devido à pequena oferta destes óleos no mercado brasileiro. Conforme descrito no rótulo, algumas marcas selecionadas de óleos refinados continham antioxidantes sintéticos adicionados em sua composição (Tabela 1).

Para todos os óleos, três embalagens de mesmo lote para cada marca e tipo de óleo foram adquiridas e homogeneizadas (AOCS, 1984). Alíquotas representativas foram armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  em frascos de polipropileno, previamente lavados em soluções de potassa-alcoólica e de ácido nítrico e envoltos por papel alumínio. Todos os lotes selecionados apresentaram uma diferença máxima de três meses entre a data de fabricação e a data da compra o produto.

**Tabela 1.** Tipo de antioxidante sintético adicionado nos óleos vegetais refinados investigados.

Tipo de óleo	Marca comercial	Antioxidante adicionado <sup>1</sup>	
		TBHQ <sup>2</sup>	Ácido cítrico
Soja	A	-	-
	B	+	+
	C	+	+
Milho	A	-	-
	B	-	+
	C	-	+
Girassol	A	-	-
	B	-	+
	C	-	+
Canola	A	-	-
	B	-	+
	C	-	-

<sup>1</sup> Informação obtida no rótulo do produto.<sup>2</sup> Terc-butil-hidroquinona.

### 3.3 Indicadores de qualidade inicial

O índice de acidez (IA) foi determinado por meio de titulação ácido-básica conforme normas da AOCS (2004; método Ca 5-40) e os resultados foram expressos como mg de KOH/g de amostra. O índice de peróxido (IP) foi determinado pelo método clássico de titulação iodométrica conforme as normas da AOCS (2004, método cd 8-53) e os resultados foram expressos em número de miliequivalentes (meq) de O<sub>2</sub>/ kg de óleo. Todas as análises foram realizadas em triplicatas.

### 3.4 Determinação da composição química

#### 3.4.1 Ácidos graxos

A composição de ácidos graxos foi determinada por cromatografia gasosa dos ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) obtidos após transesterificação direta das amostras (Lepage & Roy, 1986). Um microlitro de EMAG foi injetado em cromatógrafo a gás GC-14B

(Shimadzu, Japão), operado no modo split, com razão de divisão de 1:30 e separados através de uma coluna Omegawax-320 (30 m × 0,32 mm d.i., 0,25 µm de espessura de filme; Supelco, Co., EUA). A temperatura da coluna foi programada da seguinte forma: 160°C, constante por 2 min, seguido de gradiente de 2,5°C/min até 190°C, constante por 5 min, seguida de novo gradiente de temperatura de 3,5°C/min até 220°C, permanecendo constante por 15 min. O injetor e o detector de ionização em chama (FID) foram operados nas temperaturas de 260°C e 280°C, respectivamente. O gás He foi utilizado como gás de arraste (30 mL/min).

A identificação dos picos de ácidos graxos nas amostras foi determinada por comparação de seu tempo de retenção com o padrão comercial (37-FAME mix). A quantificação foi realizada por normalização interna após correção das áreas dos picos por seus respectivos fatores de correção teóricos de Ackman (Wolf *et al.*, 1995) e o conteúdo de ácidos graxos nas amostras foi expresso em g /100 g de ácidos graxos totais. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### 3.4.2 Tocoferóis e tocotrienóis

As concentrações de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferóis foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de fase normal com detecção por fluorescência (290 nm /exc - 330 nm /em) conforme descrito por Tan & Brzuskiwicz, (1989). As análises cromatográficas foram conduzidas em cromatógrafo líquido CBM-20A (Shimadzu, Japão) equipado com uma bomba LC-20AT (Shimadzu, Japão) e um detector de fluorescência RF-10AXL (Shimadzu, Japão).

Para todas as análises, as amostras foram previamente dissolvidas em *n*-hexano, centrifugadas (3000 rpm /5 min) e filtradas através de filtro de teflon (0,45 µm; Gimeno *et al.*, 2000). As soluções de padrões ou amostras foram injetadas através de válvula de injeção

Rheodyne com alça volumétrica de 20  $\mu\text{L}$  e eluídas de coluna de fase normal de sílica (ZORBAX Rx-Sil, Agilent Technologies, EUA) com fase móvel isocrática binária de *n*-hexano-2 isopropanol (99:1, v/v) com fluxo de 1,0 mL /min. Padrões comerciais de  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -tocoferóis foram utilizados para identificação e quantificação dos tocoferóis detectados nas amostras. A quantificação dos tocoferóis das amostras foi realizada por padronização externa de acordo com a área dos picos da curva de calibração dos padrões comerciais de tocoferóis e após correção apropriada das respostas pelo coeficiente de extinção específico em etanol ( $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ ) dos tocoferóis:  $\alpha$  (75,8);  $\beta$  (89,4);  $\gamma$  (91,4);  $\delta$  (87,3; Franke *et al.*, 2007). As curvas de calibração foram lineares para todas as formas de tocoferóis ( $R > 0,98$ ) e sua concentração variou de 0,5 a 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os resultados foram expressos em mg /100g de óleo.

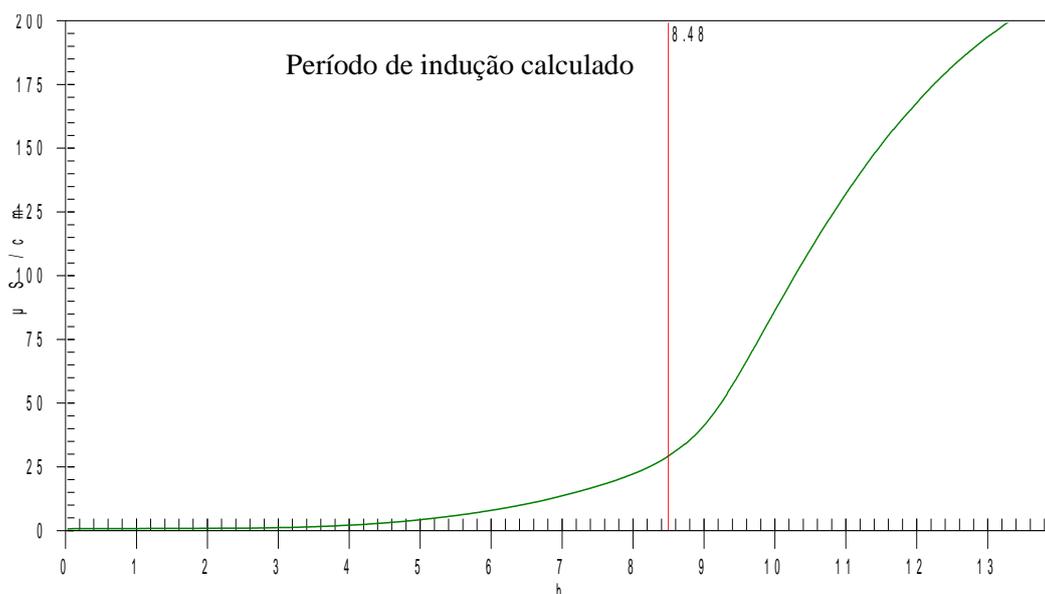
Devido à dificuldade de obtenção de padrões comerciais de tocotrienóis, a identificação tentativa desses compostos foi realizada como o auxílio da espectrometria de massas (CLAE-EM), em cromatógrafo LC-10ADvp (Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massa LC-MS2010 (Shimadzu, Japão) equipado com fonte de íons APCI. A identificação dos picos de tocoferóis e tocotrienóis das amostras foi realizada por meio da comparação com o tempo de retenção e com suas respectivas razões massa/carga ( $m/z$ ):  $\alpha$ -tocoferol ( $M+1\ m/z\ 431$ ),  $\beta$ - e  $\gamma$ -tocoferol ( $M+1\ m/z\ 417$ ),  $\delta$ -tocoferol ( $M+1\ m/z\ 403$ );  $\alpha$ -tocotrienol ( $M+1\ m/z\ 425$ ),  $\beta$ - e  $\gamma$ -tocotrienol ( $M+1\ m/z\ 411$ ) e  $\delta$ -tocotrienol ( $M+1\ m/z\ 397$ ; Hao *et al.*, 2005). Uma amostra de óleo de palma foi utilizada como referência devido a sua composição em tocotrienóis (Han & May, 2012; Schroeder *et al.*, 2006). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3.4.3 Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado conforme Singleton *et al.* (1999) após a obtenção do extrato metanólico dos óleos vegetais adaptado de Gutfinger (1981). O extrato metanólico dos óleos foi obtido a partir da extração de 2 g de óleo com solução aquosa de metanol 80% (v/v). As alíquotas foram vigorosamente agitadas (10 min) e centrifugadas (3000 rpm / 5 min). A fração metanólica foi retirada e todo o procedimento de extração foi repetido mais 2 e 3 vezes para os óleos refinados e prensados a frio, respectivamente, conforme previamente definido em trabalhos realizados em nosso laboratório (Rezende, 2013). Os extratos metanólicos obtidos de cada óleo foram utilizados para a determinação espectrofotométrica (765 nm) dos compostos fenólicos totais pelo método de *Folin-Ciocalteu*. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG)/100 g de óleo. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### **3.5 Determinação da estabilidade oxidativa**

A estabilidade oxidativa dos óleos foi avaliada por meio do equipamento de *Rancimat* (Metrohm 743) que mede o grau de oxidação lipídica dos óleos considerando o aumento da condutividade elétrica da água. As amostras de óleos vegetais (3 g) foram aquecidas a 110°C com vazão de ar de 20 L/h. Os produtos voláteis formados durante o processo de oxidação, principalmente os ácidos orgânicos, foram coletados em tubos contendo água destilada e o aumento da condutividade da água foi medido constantemente pelo equipamento. O tempo necessário para uma alteração brusca na condutividade da água foi calculado pelo *software Metrohm 743*, correspondendo ao período de indução, em horas (Figura 1). Todas as análises foram realizadas em duplicata no Laboratório de Processamento de Matérias Primas Vegetais (Escola de Química/UFRJ), coordenado pela Professora Suely Pereira de Freitas.

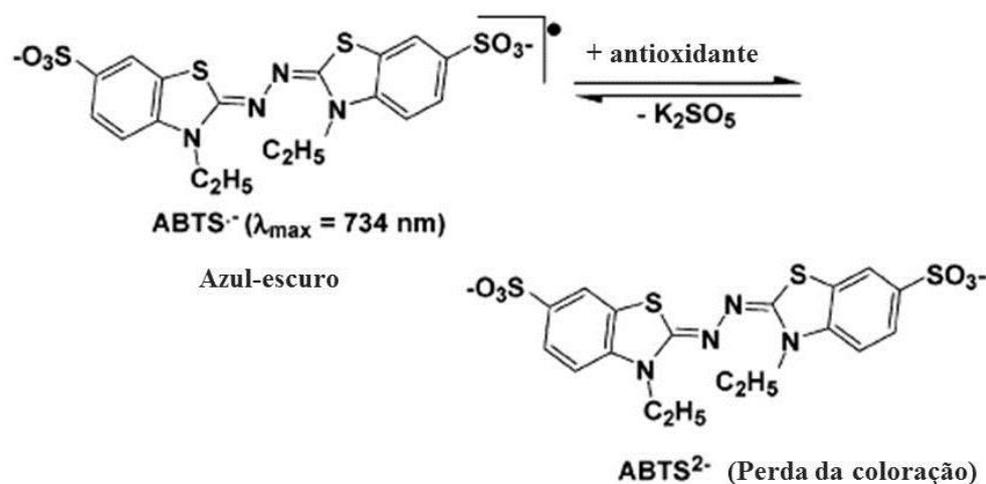


**Figura 1.** Definição do período de indução pelo software Metrohm 743 para uma amostra de óleo vegetal investigada.

### 3.6 Determinação da capacidade antioxidante total

A CAT das amostras foi determinada pelo ensaio de TEAC conforme Castelo-Branco & Torres (2012). O ensaio de TEAC baseia-se na capacidade dos compostos antioxidantes da amostra em inibir o radical pré-formado  $ABTS^{\bullet+}$  através da doação de um átomo de H ou da abstração de elétrons (Figura 2).

O  $ABTS^{\bullet+}$ , cromóforo azul-escuro com absorvância máxima em 734 nm, foi formado a partir da reação entre a solução estoque de ABTS em água (7 mmol/L) com persulfato de potássio (2,45 mmol/L; concentração final). A mistura foi deixada no escuro e em temperatura ambiente por 12-16 horas antes do uso, a fim de que a completa oxidação do ABTS ocorresse. Para a realização do ensaio, 1 mL do  $ABTS^{\bullet+}$ , adequadamente dissolvido em etanol, reagiu com 10  $\mu$ L da solução de amostra ou de padrão. A reação cinética foi monitorada a 734 nm por 4 minutos e acompanhada em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Japão).



**Figura 2.** Esquema da reação entre o radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  e um antioxidante durante o ensaio de TEAC (Huang *et al.*, 2005).

A quantificação da CAT das amostras foi realizada através de comparação com o Trolox em concentrações variando de 0,02 a 0,75 mM. As amostras bem como suas respectivas curvas de calibração foram diluídas em *n*-hexano. Os resultados foram calculados considerando a contribuição total da atividade antioxidante durante o tempo da reação, através da área abaixo da curva (AUC) e expressos como mmoles de equivalente de trolox/ kg de amostra (mmol TE/ kg), Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 3.7 Análises Estatísticas

Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Os coeficientes padronizados de curtose e de assimetria foram utilizados como critérios estatísticos para a identificação da distribuição amostral. Variáveis com valores dos coeficientes entre -2,0 e + 2,0 foram consideradas com distribuição normal, possibilitando o emprego de testes estatísticos paramétricos. Quando necessário, a distribuição das variáveis foi transformada utilizando-se a equação  $x = \log x$ .

Análise de variância (ANOVA) *one-way* seguida do pós-teste de Tukey foi empregada para investigar a influência da marca e do tipo de óleo nas variáveis investigadas. As técnicas de estatística multivariada utilizadas para avaliar as associações entre as variáveis foram: Análise de Componentes Principais (PCA) e o Modelo Linear Generalizado (GLM). O PCA é o principal método de estatística multivariada utilizado para identificar padrões de comportamento entre as amostras a fim de minimizar o número de variáveis investigadas, auxiliando na seleção das variáveis preditoras para o GLM. O GLM foi empregado para investigar quantitativamente a influência da composição química para a estabilidade oxidativa e a CAT dos óleos. A inclusão das variáveis no modelo foi realizada por seleção tipo *stepwise* onde os preditores (variáveis independentes) são incluídos no modelo de acordo com o seu valor de F (tabela de distribuição de F) até a obtenção do melhor modelo ajustado. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico *Statgraphics v. 12.2* (Manugistics, EUA).

#### **4. Resultados e discussão**

##### *4.1 Qualidade inicial dos óleos vegetais*

Uma boa qualidade inicial dos óleos vegetais reflete adequadas condições de processamento, incluindo o processo de extração, refino e o de armazenamento dos óleos (Farhoosh *et al.*, 2009a). Existem diferentes indicadores de qualidade utilizados para averiguar a qualidade inicial dos óleos vegetais após estes processamentos tecnológicos (Frankel, 2005). Dentre eles, o IP, que se refere ao grau de oxidação dos óleos, juntamente com o IA, que determina o grau de rancidez hidrolítica, são os índices mais utilizados tendo em vista a sua obrigatoriedade pelas normas de Padrão de Identidade e Qualidade dos óleos vegetais (ANVISA; RDC 270/2005; Codex-Stan 210, 2009).

Conforme a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o *Codex Alimentarius* existem limites máximos preconizados para cada um destes índices, diferenciando-se de acordo com o processo tecnológico de obtenção dos óleos vegetais. Desta forma, os valores máximos aceitáveis de IP e de IA para os óleos extraídos por solvente e submetidos ao refinamento são de 10 meq O<sub>2</sub>/kg e 0,6 mg KOH/g, respectivamente. No caso dos óleos prensados a frio, os limites são maiores, sendo aceitáveis valores até 15 meq O<sub>2</sub>/kg e 4 mg KOH/ g para o IP e IA, respectivamente.

Neste contexto, todos os óleos investigados apresentaram-se abaixo dos limites máximos preconizados pela legislação para ambos os indicadores de qualidade (Tabela 2). Contudo, houve diferença significativa entre os tipos de óleo, assim como entre as diferentes marcas para um mesmo tipo de óleo refinado, especialmente para o IP. Desta forma, embora abaixo dos limites recomendados, os óleos não apresentaram a mesma qualidade inicial, sugerindo diferenças nas condições de extração, de refino e de armazenamento entre os óleos investigados.

Em relação aos óleos refinados, o óleo de canola apresentou o maior valor de IP enquanto o óleo de soja apresentou os menor valor, permanecendo abaixo do limite mais rigoroso sugerido pela *American Oil Chemists Society* (AOCS, 2004) de 1 meq O<sub>2</sub>/kg para óleos frescos. Entre os óleos de nozes prensados a frio, o óleo de amêndoa doce apresentou o maior valor de IP, enquanto óleo de castanha-do-Brasil apresentou o menor valor deste grupo.

Em contrapartida, houve diferença significativa apenas entre os óleos de nozes prensados a frio para o IA. Possivelmente, este fato está relacionado com as diferenças nos fatores que aceleram a formação de ácidos graxos livres nas nozes, tais como: o teor de umidade durante o armazenamento e a atividade enzimática das lipases de cada semente (Hernandez, 2005). É provável que durante processo de refino estas diferenças sejam

minimizadas tendo em vista que a etapa de desodorização deve remover a quase totalidade dos ácidos graxos livres dos óleos vegetais, independente do tipo de óleo (Farhoosh *et al.*, 2009a).

Todavia, embora exista diferença quanto à qualidade inicial, todos os óleos vegetais investigados foram classificados como “óleos frescos” uma vez que estiveram em conformidade com o Padrão de Identidade e Qualidade dos óleos.

**Tabela 2.** Qualidade inicial dos óleos vegetais refinados e prensados a frio quanto aos índices de peróxido e de acidez.

Tipo de óleo	Índice de peróxido (meq O <sub>2</sub> /kg)	Índice de acidez (mg KOH/g)
<i>Óleo vegetal refinado</i>		
Soja	0,38 ± 0,08 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,12 <sup>a,#</sup>
Milho	0,84 ± 0,13 <sup>a,c,#</sup>	0,34 ± 0,05 <sup>a,#</sup>
Girassol	1,14 ± 0,10 <sup>b,c,#</sup>	0,26 ± 0,04 <sup>a</sup>
Canola	1,51 ± 0,16 <sup>b,#</sup>	0,41 ± 0,11 <sup>a,#</sup>
<i>Óleo vegetal prensado a frio</i>		
Castanha-do-Brasil	2,86 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,40 ± 0,01 <sup>a</sup>
Noz-pecã	5,04 ± 0,23 <sup>b</sup>	2,10 ± 0,01 <sup>b</sup>
Avelã	8,33 ± 0,37 <sup>c</sup>	3,26 ± 0,01 <sup>c</sup>
Amêndoa doce	12,8 ± 0,15 <sup>d</sup>	0,51 ± 0,01 <sup>a</sup>
Macadâmia	7,15 ± 0,08 <sup>c</sup>	3,39 ± 0,08 <sup>c</sup>

Valores expressos com média ± desvio padrão de três marcas diferentes para o mesmo tipo de óleo refinado, e de uma marca para cada tipo de óleo de nozes prensado a frio. Letras sobrescritas diferentes em uma mesma coluna para o mesmo grupo (refinados ou prensados a frio) indicam diferenças significativas entre os tipos de óleos. # indica diferença significativa entre as marcas do mesmo tipo de óleo refinado. ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey (p < 0,05).

#### 4.2 Composição inicial dos óleos vegetais quanto ao conteúdo de ácidos graxos

A composição típica em ácidos graxos dos óleos vegetais refinados e dos óleos de nozes prensados a frio está apresentada nas Tabelas 3 e 4, respectivamente. Todos os resultados estiveram de acordo com o *Codex Alimentarius Standard* (Codex-Stan 210, 2009) para os óleos refinados. Da mesma forma, os resultados para os óleos de nozes prensados a frio estiveram conforme estudos prévios (Prado *et al.*, 2013; Moayedi *et al.*, 2011; Robbins *et al.*, 2011; Miraliakbari & Shahidi, 2008a; Alasalvar *et al.*, 2006; Venkatachalam & Sathe, 2006). Houve diferença significativa no conteúdo de alguns ácidos graxos entre as diferentes marcas de um mesmo tipo de óleo refinado, provavelmente, devido à variação na biossíntese de ácidos graxos influenciada pelo tipo de solo, temperatura, grau de maturidade da semente e pelas diferentes práticas agrícolas (Lanna *et al.*, 2005).

Os principais ácidos graxos ( $> 1$  g/ 100 g de ácidos graxos) identificados em todas as amostras foram: o ácido palmítico (16:0), o ácido esteárico (18:0), o 18:1 $n$ -9 e o 18:2 $n$ -6. Os óleos de soja e de canola também apresentaram o conteúdo de 18:3 $n$ -3 acima de 1% assim como o óleo de macadâmia apresentou os conteúdos de ácido araquídico (20:0), ácido palmitoleico (16:1 $n$ -9) e ácido gadoleico (20:1 $n$ -9). Dentre estes ácidos graxos, sabe-se que o 18:1 $n$ -9, o 18:2 $n$ -6 e o 18:3 $n$ -3 influenciam marcadamente a bioatividade e a estabilidade oxidativa dos óleos vegetais (Roman *et al.*, 2013; Marmesat *et al.*, 2012; Dubois *et al.*, 2007; Kamal-Eldin, 2006).

No presente estudo, o 18:2 $n$ -6 foi o ácido graxo majoritário nos óleos de girassol, soja e milho, contribuindo para o maior conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) nestes óleos. Da mesma forma, os óleos de canola e de soja destacaram-se por apresentar os maiores conteúdos de 18:3 $n$ -3, respectivamente. Por outro lado, o 18:1 $n$ -9 foi o ácido graxo majoritário nos óleos de canola e de nozes, contribuindo para o maior percentual de ácido

**Tabela 3.** Composição em ácidos graxos (g/ 100 g de ácidos graxos) dos óleos vegetais refinados de soja, milho, girassol e canola.

	Óleo de Soja		Óleo de Milho		Óleo de Girassol		Óleo de Canola	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
<i>Saturados</i>								
16:0	11,2 <sup>a</sup>	0,19	11,9 <sup>a</sup>	0,82	6,04 <sup>b</sup>	0,32 <sup>#</sup>	4,98 <sup>c</sup>	0,22
18:0	3,11 <sup>a,c</sup>	0,38 <sup>#</sup>	2,23 <sup>b</sup>	0,03	3,35 <sup>a</sup>	0,16 <sup>#</sup>	2,59 <sup>c</sup>	0,15 <sup>#</sup>
20:0	0,30 <sup>a</sup>	0,02	0,49 <sup>b</sup>	0,01	0,24 <sup>c</sup>	0,02	0,69 <sup>d</sup>	0,03
22:0	0,72 <sup>a</sup>	0,47 <sup>#</sup>	0,34 <sup>a</sup>	0,11 <sup>#</sup>	0,86 <sup>a</sup>	0,23 <sup>#</sup>	0,54 <sup>a</sup>	0,04
24:0	0,21 <sup>a</sup>	0,14 <sup>#</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,01 <sup>#</sup>	0,30 <sup>a</sup>	0,15 <sup>#</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,02
Total	15,9 <sup>a</sup>	0,83 <sup>#</sup>	15,0 <sup>a</sup>	0,30	10,7 <sup>b</sup>	0,62	8,76 <sup>c</sup>	0,04 <sup>#</sup>
<i>Monoinsaturados</i>								
16:1n-9	0,09 <sup>a</sup>	0,01	0,13 <sup>a</sup>	0,01	0,10 <sup>a</sup>	0,01 <sup>#</sup>	0,25 <sup>b</sup>	0,04 <sup>#</sup>
18:1n-9	24,7 <sup>a</sup>	1,26 <sup>#</sup>	34,6 <sup>b</sup>	1,30	30,3 <sup>a,b</sup>	3,22 <sup>#</sup>	61,9 <sup>c</sup>	2,46 <sup>#</sup>
20:1n-9	0,28 <sup>a</sup>	0,03	0,32 <sup>a</sup>	0,05 <sup>#</sup>	0,20 <sup>a</sup>	0,03	1,03 <sup>b</sup>	0,05 <sup>#</sup>
22:1n-9	ND	–	ND	–	ND	–	0,07 <sup>a</sup>	0,02 <sup>#</sup>
24:1n-9	ND	–	ND	–	ND	–	0,08 <sup>a</sup>	0,01
Total	26,4 <sup>a</sup>	1,47	35,5 <sup>b</sup>	0,42	30,7 <sup>c</sup>	3,22 <sup>#</sup>	63,7 <sup>d</sup>	3,23 <sup>#</sup>
<i>Poli-insaturados</i>								
18:2n-6	52,1 <sup>a</sup>	0,85 <sup>#</sup>	47,3 <sup>b</sup>	0,96 <sup>#</sup>	57,7 <sup>a</sup>	2,88 <sup>#</sup>	20,1 <sup>c</sup>	3,97 <sup>#</sup>
18:3n-3	5,41 <sup>a</sup>	0,62 <sup>#</sup>	0,66 <sup>b</sup>	0,16 <sup>#</sup>	0,34 <sup>b</sup>	0,28 <sup>#</sup>	7,25 <sup>c</sup>	0,92 <sup>#</sup>
20:5n-3	ND	–	ND	–	ND	–	0,20 <sup>a</sup>	0,05 <sup>#</sup>
Total	57,7 <sup>a</sup>	1,66 <sup>#</sup>	48,9 <sup>b</sup>	0,87 <sup>#</sup>	57,9 <sup>a</sup>	0,28 <sup>#</sup>	27,5 <sup>c</sup>	3,13 <sup>#</sup>
18:2n-6/18:3n-3	9,70 <sup>a</sup>	0,90 <sup>#</sup>	57,6 <sup>b</sup>	11,7 <sup>#</sup>	266,6 <sup>c</sup>	178,5 <sup>#</sup>	2,85 <sup>d</sup>	0,97 <sup>#</sup>
AGPI/AGS <sup>*</sup>	3,64 <sup>a</sup>	0,25	3,16 <sup>a</sup>	0,11	5,40 <sup>b</sup>	0,24	3,13 <sup>a</sup>	0,26

Resultados apresentados com média ± desvio padrão de três marcas para cada tipo de óleo vegetal. Letras sobrescritas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre os tipos de óleos. Símbolo sobrescrito (#) nos valores de desvio padrão indica diferença significativa entre as marcas de um mesmo tipo de óleo. ND = não detectado.\* AGPI/AGS = poli-insaturados/saturados. ANOVA *one-way* seguida do pós- teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.** Composição em ácidos graxos (g/ 100g de ácidos graxos) dos óleos de nozes prensados a frio.

	Óleo de Castanha-do-Brasil		Óleo de Noz-pecã		Óleo de Avelã		Óleo de Amêndoa Doce		Óleo de Macadâmia	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
<i>Saturados</i>										
16:0	15,2 <sup>a</sup>	0,13	6,01 <sup>b</sup>	0,03	6,61 <sup>b</sup>	0,34	6,58 <sup>b</sup>	0,03	8,48 <sup>c</sup>	0,05
18:0	12,3 <sup>a</sup>	0,48	2,40 <sup>b</sup>	0,01	1,84 <sup>c</sup>	0,04	1,72 <sup>c</sup>	0,01	3,76 <sup>d</sup>	0,06
20:0	0,28 <sup>a</sup>	0,01	0,12 <sup>b</sup>	0,02	0,10 <sup>b</sup>	0,01	0,07 <sup>b</sup>	0,01	<sup>1.1.1</sup> 2,76 <sup>c</sup>	0,01
22:0	0,17 <sup>a</sup>	0,00	0,28 <sup>b</sup>	0,01	0,22 <sup>b</sup>	0,08	ND	-	0,96 <sup>b</sup>	0,13
24:0	0,05 <sup>a</sup>	0,01	ND	-	ND	-	ND	-	0,32 <sup>b</sup>	0,02
Total	28,3 <sup>a</sup>	0,33	8,80 <sup>b</sup>	0,07	8,63 <sup>b</sup>	0,21	8,49 <sup>b</sup>	0,03	15,3 <sup>c</sup>	1,75
<i>Monoinsaturados</i>										
16:1n-9	0,34 <sup>a</sup>	0,01	0,07 <sup>b</sup>	0,01	0,27 <sup>c</sup>	0,02	0,36 <sup>d</sup>	0,03	18,7 <sup>e</sup>	0,08
18:1n-9	39,5 <sup>a</sup>	0,06	72,2 <sup>b</sup>	0,05	79,4 <sup>b</sup>	0,28	64,6 <sup>c</sup>	0,05	59,7 <sup>d</sup>	0,86
20:1n-9	0,07 <sup>a</sup>	0,02	0,30 <sup>b</sup>	0,01	0,18 <sup>c</sup>	0,02	0,09 <sup>a</sup>	0,00	2,33 <sup>d</sup>	0,07
22:1n-9	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	0,48	0,08
Total	39,9 <sup>a</sup>	0,06	72,6 <sup>b</sup>	0,06	80,0 <sup>c</sup>	0,26	65,2 <sup>d</sup>	0,08	81,1 <sup>e</sup>	0,86
<i>Poli-insaturados</i>										
18:2n-6	31,6 <sup>a</sup>	0,36	18,0 <sup>b</sup>	0,01	11,3 <sup>c</sup>	0,04	26,3 <sup>d</sup>	0,03	1,59 <sup>e</sup>	0,01
18:3n-3	0,06 <sup>a</sup>	0,01	0,68 <sup>b</sup>	0,01	0,08 <sup>a</sup>	0,00	ND	-	0,14 <sup>c</sup>	0,01
20:5n-3	ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	0,36	0,02
Total	31,6 <sup>a</sup>	0,41	18,7 <sup>b</sup>	0,01	11,3 <sup>c</sup>	0,05	26,3 <sup>d</sup>	0,05	1,96 <sup>e</sup>	0,20
18:2n-6/18:3n-3	526,7 <sup>a</sup>	11,1	26,5 <sup>b</sup>	0,14	141,3 <sup>c</sup>	11,9	-	-	11,1 <sup>d</sup>	0,72
AGPI/AGS*	1,28 <sup>a</sup>	0,02	2,11 <sup>b</sup>	0,02	1,31 <sup>a</sup>	0,05	3,10 <sup>c</sup>	0,04	0,13 <sup>d</sup>	0,02

Resultados apresentados com média ± desvio padrão de triplicatas. Letras sobrescritas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa entre os tipos de óleos. ND = não detectado. \* AGPI/AGS = poli-insaturados/saturados. ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

graxos monoinsaturados (AGMI) nestes óleos.

Neste contexto, os óleos de avelã e de noz-pecã destacaram-se devido aos maiores conteúdos de 18:1n-9. No entanto, foi o óleo de macadâmia que apresentou o maior percentual de AGMI, especialmente devido às elevadas concentrações do 16:1n-9, peculiar a este óleo (Wall, 2010). Além disso, os óleos de canola, avelã, noz-pecã e amêndoa doce apresentaram a menor contribuição dos ácidos graxos saturados (AGS) comparados aos demais óleos.

A influência da qualidade da gordura consumida na dieta sobre o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares já é fato bem estabelecido (Czernichow *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2001). Reporta-se que dietas com quantidades restritas em AGS, combinada com quantidades relativamente elevadas de AGMI reduzem a LDL em plasma humano, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares (Karupaiyah *et al.*, 2005). Portanto, observa-se que os óleos de canola e de nozes podem melhorar qualitativamente o conteúdo lipídico da dieta humana. No entanto, vale destacar que o óleo de castanha-do-Brasil também apresentou o maior percentual de AGS entre os óleos investigados (Tabela 4).

Além disso, demonstra-se que um consumo equilibrado de ácidos graxos da série  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3, incluindo o 18:2n-6 e 18:3n-3, também contribui para minimizar o risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares e outras doenças crônicas, tendo em vista que são substratos para a síntese de potentes mediadores lipídicos que influenciam na regulação do sistema inflamatório, os eicosanoides. Sabe-se que os eicosanoides provenientes do 18:2n-6, quando presentes em quantidades elevadas, podem contribuir para a formação de trombos e placas de ateroma além de aumentar as reações inflamatórias e alérgicas. Entretanto, aqueles provenientes do 18:3n-3 apresentam propriedades inflamatórias que se relacionam com a

redução da prevalência de desordens imunológicas e inflamatórias (Lopez-Huertas, 2010; Simopoulos, 2006).

Deste modo, diferentes autores e órgãos de saúde têm estabelecido variadas recomendações quanto à razão entre os ácidos graxos da família  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3 que variam desde 2:1 até 10:1 (Martin *et al.*, 2006). Neste contexto, apenas os óleos de canola e o de soja apresentaram-se dentro dos limites recomendados. Os óleos de castanha-do-Brasil, girassol e avelã apresentaram as piores razões, consecutivamente (Tabelas 3 e 4). Portanto, o óleo de canola apresentou a melhor composição nutricional considerando o seu baixo conteúdo de AGS, o alto conteúdo de AGMI e a sua adequada proporção de 18:2n-6/18:3n-3.

Do ponto de vista tecnológico, a adequada proporção entre os ácidos graxos também pode influenciar na estabilidade oxidativa dos óleos vegetais. A razão AGPI/AGS prevê a tendência à oxidação dos óleos vegetais sendo que os valores elevados desta relação correspondem a óleos de menor estabilidade oxidativa (Kochhar & Henry, 2009; Farhoosh *et al.*, 2008). Portanto, considerando a razão AGPI/AGS dos óleos investigados no presente estudo, é possível que os óleos refinados de soja, milho, girassol e canola apresentem uma maior tendência à oxidação do que os óleos de nozes prensados a frio. Neste contexto, os óleos de macadâmia e de girassol apresentem a menor e a maior suscetibilidade à oxidação, respectivamente. No entanto, a razão AGPI/SAT pode prever a estabilidade oxidativa dos óleos de forma incompleta uma vez que esta também é influenciada pelos compostos antioxidantes presentes nessa matriz alimentar.

#### 4.3 Composição inicial quanto ao teor de tocoferóis e tocotrienóis

As quatro formas homólogas de tocoferóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) e uma forma de tocotrienol ( $\beta/\gamma$ ) foram identificadas nos óleos vegetais investigados (Tabelas 5). A composição em

tocóis dos óleos refinados esteve de acordo com o *Codex Alimentarius Standard* (Codex-Stan 210, 2009). No entanto, a composição dos óleos de nozes prensados a frio mostrou-se bastante controversa em relação aos resultados descritos na literatura (Wall, 2010; Miraliakbari & Shahidi, 2008; Chunhieng *et al.*, 2008; Crews *et al.*, 2005). Houve diferença significativa entre as marcas de um mesmo tipo de óleo vegetal refinado provavelmente, devido às diferenças nas práticas agrícolas das sementes (Rani *et al.*, 2007; Lavedrini *et al.*, 1997).

O  $\alpha$ - e o  $\gamma$ -tocoferol foram os tocois majoritários em todos os óleos. Os óleos de soja e de milho apresentaram o maior conteúdo de  $\gamma$ -tocoferol que contribuiu cerca de 70% do teor total de tocois para ambos os óleos. Em contrapartida, o óleo de girassol apresentou o maior conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol que contribuiu cerca de 96,0 % do teor total de tocois. O  $\beta$ - e o  $\delta$ -tocoferol foram os tocoferóis minoritários em todos os óleos, exceto para o óleo de soja, cujo teor de  $\delta$ -tocoferol foi o segundo mais abundante.

Para todas as formas de tocoferóis, os óleos de nozes prensados a frio apresentaram concentrações significativamente menores quando comparados aos óleos vegetais refinados. Desta forma, os óleos de soja e de milho, seguido pelo óleo de girassol apresentaram os maiores conteúdos de tocoferóis totais, enquanto o óleo de macadâmia apresentou o menor conteúdo.

Dentre os óleos de nozes, os óleos de amêndoa doce e o de avelã apresentaram o maior conteúdo de  $\alpha$ -tocoferol, enquanto os óleos de noz-pecã e castanha-do-Brasil apresentaram o maior conteúdo de  $\gamma$ -tocoferol. O óleo de macadâmia destacou-se por apresentar em sua constituição apenas o  $\alpha$ -tocoferol, em quantidades muito pequenas (< 1 mg /100 g de óleo). Entretanto, os resultados observados no presente estudo são quantitativamente diferentes

**Tabela 5.** Composição em tocoferóis (mg/100 g) dos óleos vegetais refinados e dos óleos de nozes prensados a frio.

	$\alpha$ -tocoferol		$\beta$ -tocoferol		$\gamma$ -tocoferol		$\delta$ -tocoferol		Tocoferóis Totais	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
<i>Óleos vegetais refinados</i>										
Soja	12,9 <sup>a</sup>	1,17	1,44 <sup>a</sup>	0,15	121,9 <sup>a</sup>	9,47	37,4 <sup>a</sup>	3,86	173,69 <sup>a</sup>	13,8
Milho	38,7 <sup>b</sup>	6,86 <sup>#</sup>	0,45 <sup>b</sup>	0,08 <sup>#</sup>	96,6 <sup>a</sup>	16,8 <sup>#</sup>	1,63 <sup>b</sup>	0,37 <sup>#</sup>	137,4 <sup>a</sup>	23,3 <sup>#</sup>
Girassol	104,0 <sup>c</sup>	9,49	1,94 <sup>a</sup>	0,33 <sup>#</sup>	1,80 <sup>b,c</sup>	1,36 <sup>#</sup>	0,40 <sup>b</sup>	0,36 <sup>#</sup>	108,1 <sup>b</sup>	9,80
Canola	44,3 <sup>b</sup>	5,75 <sup>#</sup>	0,13 <sup>b</sup>	0,07 <sup>#</sup>	50,9 <sup>c</sup>	3,02	0,94 <sup>b</sup>	1,09 <sup>#</sup>	96,3 <sup>c</sup>	6,60
<i>Óleos vegetais prensados a frio</i>										
Castanha-do-Brasil	1,89 <sup>e</sup>	0,06	0,08 <sup>d</sup>	0,00	21,0 <sup>d</sup>	0,75	0,20 <sup>c</sup>	0,01	23,2 <sup>d</sup>	0,97
Noz-pecã	0,14 <sup>f</sup>	0,04	0,19 <sup>b</sup>	0,01	28,4 <sup>d</sup>	0,68	0,22 <sup>c</sup>	0,03	29,0 <sup>d</sup>	0,46
Avelã	40,7 <sup>b</sup>	4,65	0,68 <sup>c</sup>	0,05	0,56 <sup>e</sup>	0,05	0,05 <sup>d</sup>	0,01	41,4 <sup>c</sup>	5,10
Amêndoa doce	64,2 <sup>d</sup>	1,26	0,19 <sup>b</sup>	0,00	1,70 <sup>b</sup>	0,07	0,05 <sup>d</sup>	0,01	66,1 <sup>f</sup>	1,04
Macadâmia	0,80 <sup>g</sup>	0,05	ND	-	ND	-	ND	-	0,80 <sup>g</sup>	0,05

Resultados apresentados com média  $\pm$  desvio padrão de três marcas para cada tipo de óleo vegetal refinado e de uma marca para os óleos de nozes prensados a frio. Letras sobrescritas diferentes em uma mesma coluna indicam diferença significativa entre os tipos de óleos. Símbolo sobrescrito (#) nos valores de desvio padrão indica diferença significativa entre as marcas de um mesmo tipo de óleo refinado. ND = não detectado. ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

daqueles apresentados por outros autores, que em sua maioria, referem-se à composição em tocóis de óleos de nozes extraídos por solventes.

Neste contexto, Miraliakbari & Shahidi (2008a), após extração com diferentes solventes (hexano e clorofórmio/metanol), relataram quantidades maiores de tocoferóis individuais para os óleos de noz-pecã ( $\alpha$ - 1,55 e  $\gamma$ - 67,6 mg /100 g), avelã ( $\gamma$ - 11,6 mg /100 g) e castanha-do-Brasil ( $\delta$ -1,82 mg /100 g). Da mesma forma, Alasalvar *et al.* (2006), após extração do óleo de avelã com éter de petróleo, observaram concentrações de  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferol aproximadamente 10 vezes maiores do que as do presente estudo (8,33 e 0,53 mg /100 g, respectivamente).

A extração dos óleos por solvente geralmente consiste em uma operação de percolação no qual o solvente entra em contato com a parte lipídica das nozes, grãos ou sementes gerando um alto rendimento de extração quando comparado à prensagem mecânica. Após a extração por solvente, menos de 1% de óleo permanece no resíduo sólido (farelo) enquanto até 25% de óleo permanecem após a prensagem a frio, possivelmente com tocoferóis retidos neste resíduo (Wang & Weller, 2006; Hernandez, 2005). Desta forma, justificam-se os menores teores de tocoferóis nos óleos de nozes prensados a frio. No entanto, vale salientar que os óleos obtidos por extração com solvente devem ser submetidos ao processo de refino para tornarem-se comestíveis, gerando perdas de aproximadamente 90% no conteúdo de tocoferóis, reduzindo a qualidade nutricional dos óleos refinados quando comparados aos prensados a frio (Desai *et al.*, 1988).

De fato, quando Prado *et al.* (2013) e Crews *et al.* (2005) investigaram a composição em tocóis de óleo de noz-pecã e de avelã, extraídos por meio de prensagem mecânica, valores consistentes com os nossos foram observados para todos os homólogos de tocoferóis. Ainda são poucos os estudos que investigam a composição química de óleos de nozes obtidos por

meio de prensagem mecânica, tornando difícil a comparação direta dos resultados. Desta forma, os resultados obtidos no presente trabalho são importantes para ampliar o conhecimento sobre a composição destes óleos que, atualmente, apresentam um grande apelo funcional e gastronômico, tendo em vista a possível manutenção das propriedades nutricionais e sensoriais devido à ausência do processo de refino.

A forma  $\beta/\gamma$ -tocotrienol foi identificada nos óleos de milho e de soja. Não foi possível diferenciar as formas  $\beta$ - ou  $\gamma$ -tocotrienol, pois ambas apresentam a mesma razão carga/massa, parâmetro utilizado para identificar as formas de tocotrienóis por CLAE-EM. Contudo, conforme comparação com o óleo de palma, rico em  $\gamma$ -tocotrienol, sugere-se que o pico cromatográfico identificado corresponda a este tocol.

De uma forma geral, os óleos vegetais são considerados a principal fonte de tocoferóis da alimentação humana (Hunter & Cahoom, 2007). O  $\alpha$ -tocoferol é a principal forma estudada devido as suas maiores concentrações no plasma humano e, conseqüentemente, a sua maior bioatividade como vitamina E. Em estudos longitudinais, o alto consumo de  $\alpha$ -tocoferol associou-se com o menor risco de doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, hipertensão e doença de Alzheimer (Gao *et al.*, 2006; Saldeen & Saldeen, 2005). Neste contexto, o óleo de girassol analisado no presente estudo destacou-se como uma importante fonte de  $\alpha$ -tocoferol. Em um estudo que investigou a composição em tocois de 79 fontes alimentares habitualmente consumidas nos Havaí, verificou-se que 28 g de óleo de girassol (30 mL) são suficientes para atingir a recomendação diária de  $\alpha$ -tocoferol para adultos (15 mg de equivalentes de  $\alpha$ -tocoferol /dia; Franke *et al.*, 2007).

No entanto, relata-se que apesar das baixas concentrações plasmáticas, outras formas de tocoferóis também são capazes de exercer atividades antioxidantes e biológicas em humanos. Por exemplo, tem-se demonstrando que o  $\gamma$ -tocoferol é mais potente do que o  $\alpha$ -

tocoferol em inibir a agregação plaquetária e em reduzir a oxidação da LDL (Jiang *et al.*, 2001). Além disso, relata-se que o  $\gamma$ - e  $\delta$ - tocoferol são superiores ao  $\alpha$ -tocoferol em inibir a transformação neoplásica de certos tipos celulares (Sen *et al.*, 2006). Portanto, os óleos vegetais, especialmente os óleos de soja, milho e girassol, são importantes fontes dietéticas das diferentes formas de tocoferóis, contribuindo para um consumo balanceado de vitamina E.

Além dos efeitos para a saúde humana, os tocoferóis são importantes do ponto de vista industrial e tecnológico, pois são potentes antioxidantes capazes de minimizar as consequências negativas da oxidação lipídica (Shahidi & Zong, 2010a; Chayasit *et al.*, 2007).

Entretanto, mesmo com uma vasta pesquisa em relação à atividade antioxidante dos tocoferóis nos óleos vegetais, muitas controvérsias ainda existem. Constata-se que a ação antioxidante dos tocois varia de acordo com as suas concentrações, com o sistema lipídico estudado, com a temperatura e a disponibilidade de oxigênio do meio. Contudo, parece consenso de que o  $\alpha$ -tocoferol, em baixas concentrações, apresenta melhor atividade antioxidante do que o  $\gamma$ -tocoferol, porém, em altas concentrações, o  $\gamma$ -tocoferol apresenta a melhor atividade antioxidante (Seppanen *et al.*, 2010).

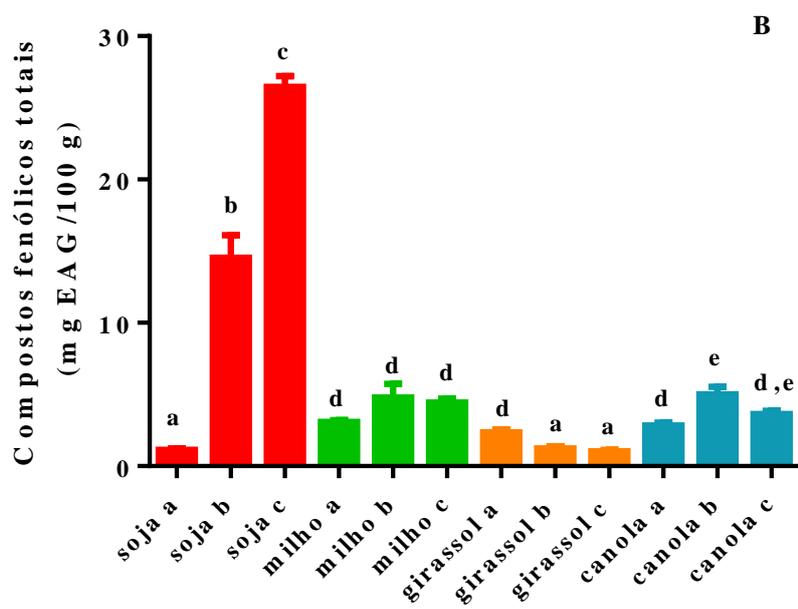
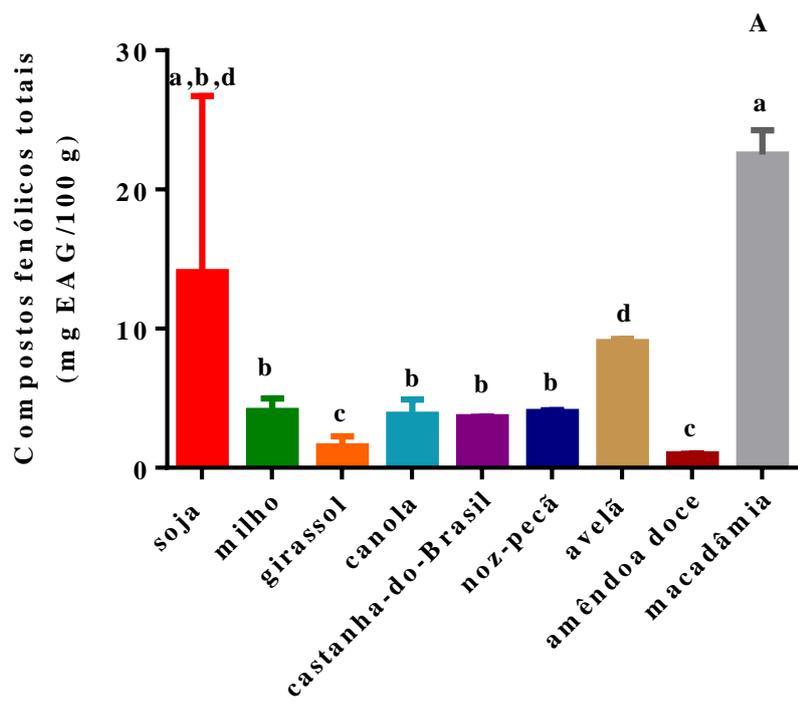
Adicionalmente, os tocoferóis estão presentes naturalmente nos óleos vegetais como uma mistura. Huang *et al.* (1995) avaliaram o efeito da adição de diferentes concentrações (250 a 3000 ppm) de uma mistura de tocois, com proporção de massa similar ( $\alpha$ : $\gamma$ : $\delta$ = 13:64:21 p/p/p) à encontrada naturalmente em óleos de soja, na estabilidade oxidativa de óleo de milho (isento de tocoferóis) oxidado a 60°C. Esses autores observaram um efeito antioxidante da mistura nas concentrações entre 250 a 500 ppm e um efeito pró-oxidante em concentrações acima de 1000 ppm. Entretanto, informações na literatura sobre o efeito sinérgico e/ou antagônico dos tocoferóis como uma mistura, considerando as peculiaridades da composição de cada óleo vegetal ainda são insuficientes para estabelecer essa relação.

#### 4.4 Teor de compostos fenólicos totais

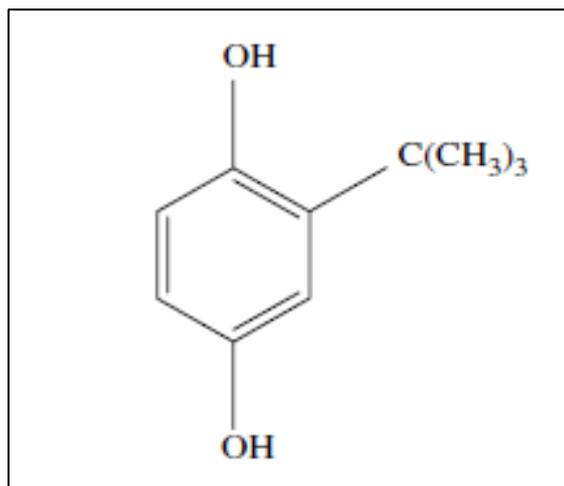
Os teores de compostos fenólicos totais dos óleos investigados estão apresentados na Figura 3. O óleo de macadâmia apresentou o maior teor de fenólicos totais, enquanto os óleos de amêndoa doce e de girassol apresentaram os menores teores. Não houve diferença significativa entre os óleos de macadâmia e de soja que por sua vez não apresentou diferença significativa entre os óleos de milho, canola, castanha-do-Brasil, noz-pecã e avelã. Este fato deve-se à ampla variação entre as marcas comerciais do óleo de soja (mín = 1,13 e máx = 26,5 mg EAG/100 g).

De acordo com os rótulos comerciais, duas amostras de óleo de soja (B e C) apresentaram a adição dos antioxidantes sintéticos TBHQ e ácido cítrico em concentrações não informadas. O TBHQ é um antioxidante sintético, pertencente à classe dos compostos fenólicos (Figura 4), usualmente adicionado nos óleos vegetais para prevenir e/ou inibir a PL em concentrações que podem variar de 100 a 200 µg /g de óleo (ANVISA, Portaria n° 540/97).

Desta forma, possivelmente os maiores teores de compostos fenólicos totais nas marcas B e C do óleo de soja correspondam, em parte, às quantidades adicionadas de TBHQ. Essa hipótese será confirmada futuramente por meio da determinação de antioxidantes sintéticos por CLAE-UV (Saad *et al.*, 2007). Por sua vez, a marca A do óleo de soja, isoladamente, apresentou teores de compostos fenólicos no mesmo grau de grandeza do que os demais óleos refinados (Figura 3).



**Figura 3.** Teor de compostos fenólicos totais nos diferentes tipos de óleos vegetais (A) e nas diferentes marcas comerciais dos óleos refinados (B). Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa entre os tipos de óleos e marcas comerciais. ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



**Figura 4.** Estrutura química do antioxidante sintético terc-butilhidroquinona (Saad *et al.*, 2007)

Todos os óleos vegetais investigados apresentaram teores bastante reduzidos de compostos fenólicos totais quando comparados ao azeite de oliva extra virgem (> 100,0 mg EAG/ 100 g de óleo), reconhecido nutricionalmente pela alta concentração destes compostos em sua matriz (Sánchez *et al.*, 2007; Dimitrios, 2006).

Farshoosh *et al.* (2008) e Valavanidis *et al.* (2004) também observaram valores reduzidos de compostos fenólicos totais em óleos refinados de soja (4,5 - 8 mg EAG/100g), girassol (3-4,5 mg EAG/100g), milho (0,1 - 3,0 mg EAG/ 100g) e canola (4,8 mg EAG/100g). Possivelmente os teores reduzidos destes compostos nos óleos refinados deva-se ao fato de que ao processo de refino remove mais de 80% dos compostos fenólicos dos óleos (Szydłowska-Czerniak *et al.*, 2008a; García *et al.*, 2006). Vale ressaltar que a adição de TBHQ nos óleos ocorre após a finalização do processo de refino, preservando este composto fenólico.

Em contrapartida, o teor reduzido de compostos fenólicos totais nos óleos de nozes prensados a frio não era esperado devido a dois fatores: o elevado conteúdo de compostos

fenólicos na maioria das nozes investigadas (La Rosa *et al.*, 2011; Blomhoff *et al.*, 2006) e a ausência do processo de refino destes óleos (Siger *et al.*, 2008).

Entretanto, alguns autores tem relatado que a maior concentração de fenólicos das nozes encontra-se na película protetora da amêndoa (Prado *et al.*, 2013; La Rosa *et al.*, 2011; Blomhoff *et al.*, 2006) que pode ser removida das mesmas previamente à extração dos óleos, diminuindo a concentração de compostos fenólicos transferida para o produto final (Zajdenweg *et al.*, 2011). Adicionalmente, a redução de compostos fenólicos também pode ocorrer devido ao processo de torra, aplicado industrialmente nas amêndoas, para facilitar a extração do óleo por prensagem mecânica (Durmaz & Gökmen, 2010). Além disso, as estruturas polares dos compostos fenólicos apresentam solubilidade reduzida no óleo. Possivelmente, quantidades razoáveis destes compostos devem permanecer no resíduo sólido obtido após a prensagem a frio (Quinn & Tang, 1996).

Neste contexto, Miraliakbari & Shahidi (2008c) observaram teores de compostos fenólicos totais mais elevados em óleos de nozes extraídos por solvente, especialmente pela mistura binária de clorofórmio-metanol, a saber: óleos de noz-pecã (71,1 mg EAG/100 g), de castanha-do-Brasil (38,1 mg EAG/ 100 g), de amêndoa doce (16,8 mg EAG/100 g) e de avelã (33,8 mg EAG/100 g). Contudo, estes autores não investigaram o teor de compostos fenólicos totais em óleo de macadâmia.

Os principais compostos fenólicos encontrados nos óleos vegetais são os ácidos fenólicos cujo perfil é bastante variado entre os diferentes tipos de óleos vegetais (Siger *et al.*, 2008; Tuberoso *et al.*, 2007; Quinn & Tang, 1996). Quinn & Tang (1996) identificaram os ácidos 2,6 di-hidroxibenzoico e o 3,5 di-metoxi-4-hidroxicinâmico em óleo de macadâmia. Os óleos de soja, milho, girassol e canola apresentam em sua constituição os ácidos *p*-hidroxibenzoico, cafeico, *p*-coumarico e ferúlico. O óleo de canola também se destaca pelos

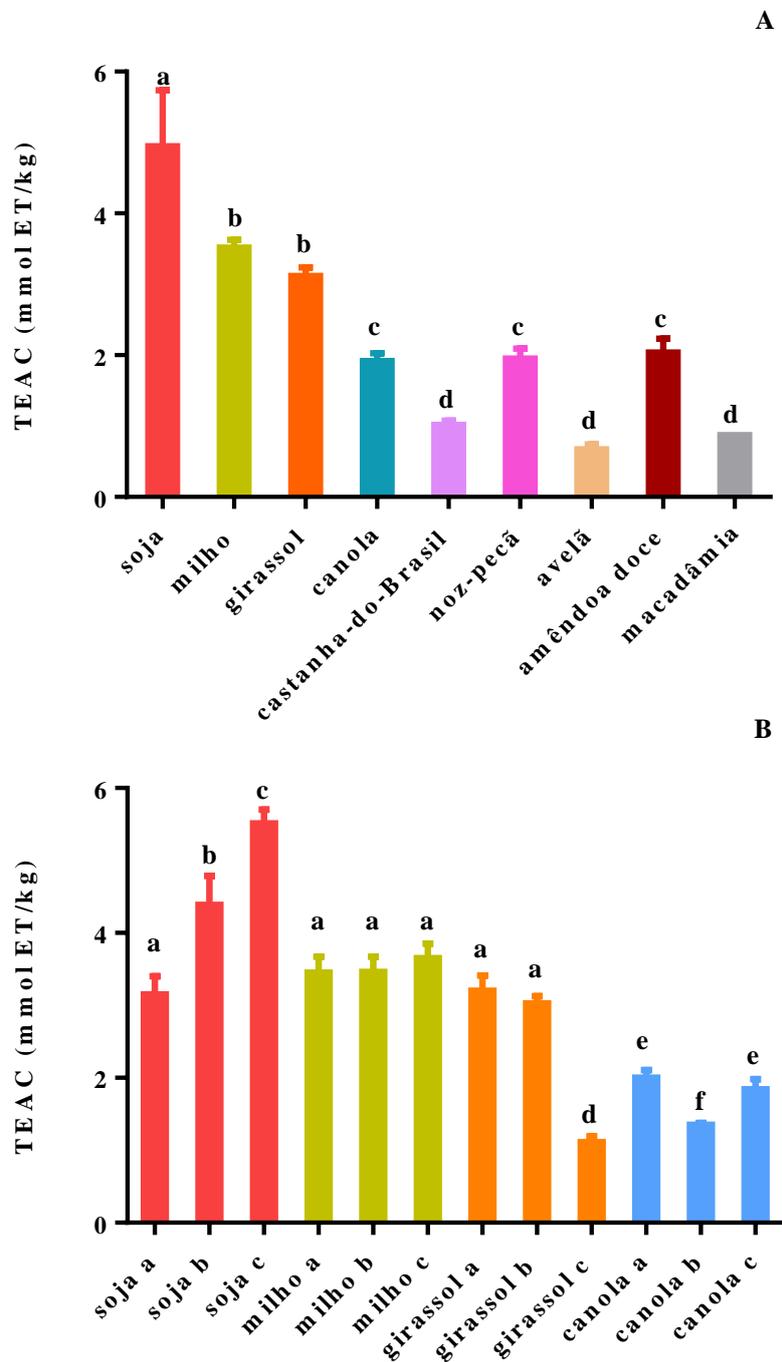
elevados teores de ácido sinapínico (Siger *et al.*, 2008) e o óleo de girassol pelos teores de ácido clorogênico e cafeico (Choe & Min, 2006). Portanto, os teores de compostos fenólicos totais observados no presente estudo servirão de base para a seleção de amostras que terão o seu perfil de compostos fenólicos identificados por CLAE-UV futuramente (Siger *et al.*, 2008).

#### 4.5 Capacidade antioxidante total dos óleos vegetais

A CAT dos óleos vegetais, determinada pelo ensaio de TEAC, variou entre 0,67 a 3,35 mmol ET/ kg, sendo que o óleo de soja apresentou os maiores valores, enquanto os óleos de avelã, macadâmia e castanha-do-Brasil apresentaram os menores valores (Figura 5). Com exceção do óleo de canola, os demais óleos refinados apresentaram maior CAT do que os óleos de nozes prensados a frio. As marcas B e C do óleo de soja, que contém TBHQ em sua constituição, apresentaram valores significativamente maiores do que a marca A, sem adição de antioxidantes sintéticos. Desta forma, o TBHQ pode influenciar, em parte, a CAT destas amostras.

A comparação quantitativa da CAT dos óleos vegetais é limitada tendo em vista o uso de variados ensaios, os quais se diferenciam quanto ao solvente usado, pontos-finais da reação e maneiras de expressar os resultados. Entretanto, em trabalho prévio realizado em nosso laboratório, avaliou-se a CAT de óleos vegetais refinados de soja, de milho, de girassol e de canola por meio do ensaio de TEAC, utilizando as mesmas condições de análise do presente estudo, e resultados similares foram observados, a saber: óleo de soja ( $6,50 \pm 0,50$ ) > óleo de girassol ( $3,93 \pm 1,50$ ) = óleo de milho ( $3,81 \pm 0,74$ ) = óleo de canola ( $3,82 \pm 1,36$ ; Castelo-Branco & Torres, 2012). Qualitativamente, o mesmo ranqueamento das amostras de óleos vegetais refinados foi observado em estudos que utilizaram o ensaio de TEAC em condições

diferenciadas (Pellegrini *et al.*, 2003) e outros ensaios de CAT (Valavanidis *et al.*, 2004; Espín *et al.*, 2000).



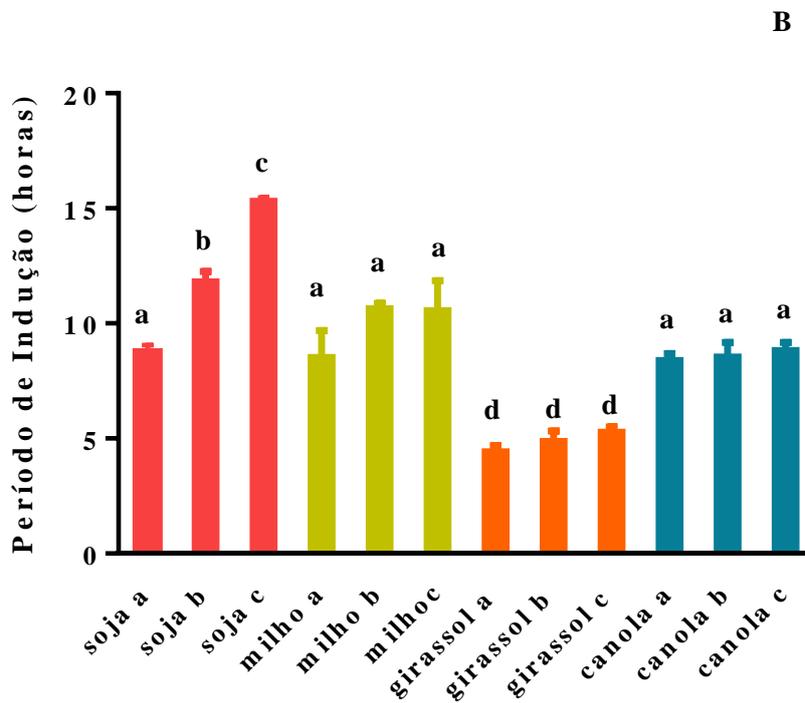
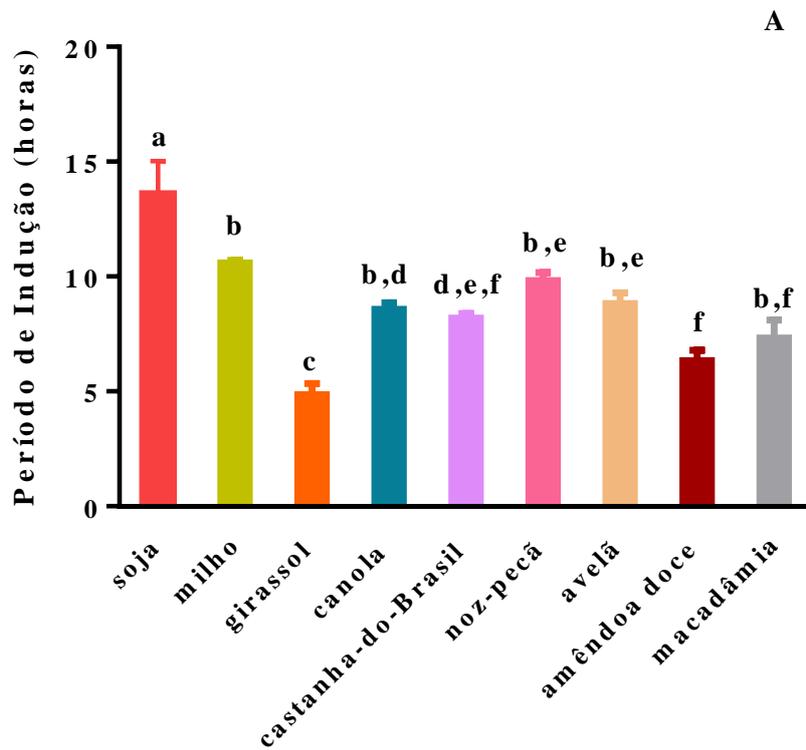
**Figura 5.** Capacidade antioxidante total dos diferentes tipos de óleos vegetais (A) e das diferentes marcas comerciais dos óleos refinados (B) determinada por meio do ensaio de TEAC. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa entre os tipos de óleos e marcas comerciais. ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Quanto aos óleos de nozes, Miraliakbari & Shahidi (2008 c) determinaram a CAT dos óleos de avelã, amêndoa doce, castanha-do-Brasil e noz-pecã extraídos com solvente por meio de três ensaios diferenciados, TEAC, DPPH e ORAC. Esses autores observaram que independente do solvente de extração do óleo e do ensaio utilizado, o óleo de noz-pecã apresentou os maiores valores de CAT, consistente com os resultados do presente estudo cujos óleos de noz-pecã e amêndoa doce apresentaram a maior CAT entre os óleos de nozes prensados a frio.

#### *4.6 Estabilidade oxidativa dos óleos vegetais*

Diferentes métodos de oxidação acelerada em altas temperaturas são utilizados para estimar a estabilidade oxidativa dos óleos. Dentre os métodos existentes, o método de *Rancimat* destaca-se devido a sua praticidade e à alta reprodutibilidade, sendo considerado um método oficial para a determinação da estabilidade oxidativa dos óleos pela Associação Americana de Óleos e Gorduras (Arranz *et al.*, 2008; AOCS, 2004).

De acordo com o período de indução determinado por este método, os óleos de soja e de milho apresentaram a maior estabilidade oxidativa, enquanto os óleos de girassol e de amêndoa doce apresentaram a menor estabilidade oxidativa (Figura 6). Além disso, mais uma vez, as marcas de óleo de soja B e C (com TBHQ) foram significativamente diferentes da marca A (sem TBHQ), sugerindo a contribuição do TBHQ para aumentar a resistência dos óleos à oxidação lipídica.



**Figura 6.** Estabilidade oxidativa de diferentes tipos de óleos vegetais (A) e de marcas de óleos refinados (B) determinada pelo Método de *Rancimat*. Letras diferentes sobre as barras indicam diferença significativa entre os tipos e marcas de óleos comerciais. ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Estudos que avaliaram a estabilidade oxidativa dos óleos utilizando as mesmas condições de análise do presente estudo observaram resultados quantitativos semelhantes aos nossos resultados, exceto para as marcas de óleo de soja adicionadas de TBHQ (Farhoosh, 2007; Anwar *et al.*, 2003; Läubi & Bruttel, 1986 ). Similarmente, Kochhar & Henry (2009) e Arranz *et al.* (2008), utilizando temperatura de 100°C, também observaram baixa estabilidade oxidativa para o óleo de amêndoa doce quando comparado a outros óleos de nozes, incluindo os óleos de avelã e de macadâmia.

Farhoosh *et al.* (2008) investigaram a estabilidade oxidativa dos óleos refinados de soja, milho, girassol, canola e oliva pelo método de *Rancimat* utilizando as temperaturas de 100, 110, 120 e 130°C com vazão de ar de 15 L/h e a seguinte ordem quanto ao período de indução foi observada: óleo de soja > girassol > canola > milho > oliva, contradizendo o ranqueamento de amostras do presente estudo. Entretanto, todas as amostras analisadas por estes autores continham antioxidantes sintéticos em sua composição em diferentes concentrações, fato que pode ter contribuído para alterar a estabilidade oxidativa dos óleos vegetais, como possivelmente ocorreu nas amostras de óleo de soja marcas B e C (Figura 6).

De uma forma geral, todos os óleos devem apresentar uma boa estabilidade oxidativa para a manutenção das suas propriedades nutricionais e sensoriais, assim como dos seus produtos derivados. No entanto, ainda não existe um limite máximo de período de indução, determinado pelo método de *Rancimat*, que corresponda a um óleo de boa qualidade. Todavia, quando se compara os resultados obtidos no presente estudo com outros que utilizaram as mesmas condições de análise, observa-se que os óleos investigados, especialmente os óleos refinados de soja e milho, apresentaram uma alta estabilidade oxidativa. Neste contexto, demonstra-se que o azeite de oliva (12,9 h) e o óleo de amendoim (7,25 h) apresentam uma estabilidade similar aos óleos investigados no presente estudo (Läubi

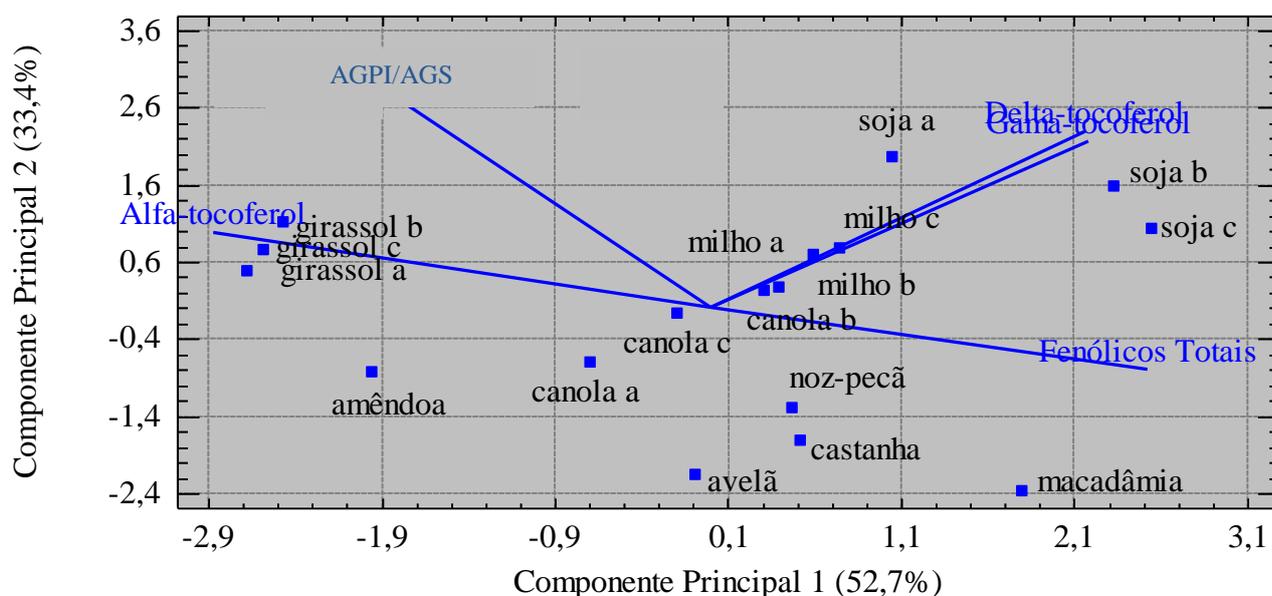
& Bruttel, 1986), enquanto outros óleos apresentam uma menor estabilidade oxidativa, tais como os óleos de linhaça (1,57 h), papoula (5,56 h) e cártamo (2,87 h; Bozan & Temelli, 2008) ou os óleos não convencionais de urtiga (5,57 h) e cânhamo (1,32 h; Uluata & Özdemir, 2012).

#### *4.7 Principais determinantes químicos da capacidade antioxidante total e estabilidade oxidativa dos óleos vegetais*

Os óleos vegetais são uma matriz complexa cujos constituintes químicos podem interagir de forma sinérgica e/ou antagônica influenciando de forma variada a CAT e a estabilidade oxidativa dos óleos. Neste contexto, a análise multivariada de dados é uma ferramenta útil para observar interações entre tais variáveis. Um dos métodos mais utilizados inicialmente é o PCA que diminui as variáveis iniciais a um reduzido número de componentes principais a fim de obter-se uma visão global sobre a variação das amostras, identificando padrões de comportamento. Além disso, os componentes principais são ortogonais, descrevendo uma variação independente entre as variáveis, possibilitando a verificação de colinearidades entre as mesmas, colaborando com a seleção de um número reduzido de preditores potencialmente aplicáveis ao método de GLM (Mutihac & Mutihac, 2008; Kamal-Eldin & Andersson, 1997).

Desta forma, no presente estudo, o PCA foi aplicado aos dados relacionados ao conteúdo dos principais ácidos graxos oxidáveis, dos tocoferóis e dos compostos fenólicos totais num total de 17 amostras. Inicialmente, dois componentes principais foram extraídos das médias dos dados que explicaram 86,1% da variação total das amostras (PCA1= 52,7% e PCA2=33,4 %, Figura 7). Quatro grupos distintos de amostras foram formados, a saber: grupo 1 (óleos de milho, soja marca A e canola marca B); grupo 2 (óleos de noz-pecã, macadâmia, castanha-do-Brasil e avelã); grupo 3 (óleos de canola marcas A e C, e amêndoa doce); grupo

4: (óleo de girassol), sendo que as marcas B e C de óleo de soja estão claramente separadas destes grupos. De acordo com os grupamentos formados, observa-se pouca semelhança entre amostras de um mesmo tipo ou grupo de óleo.

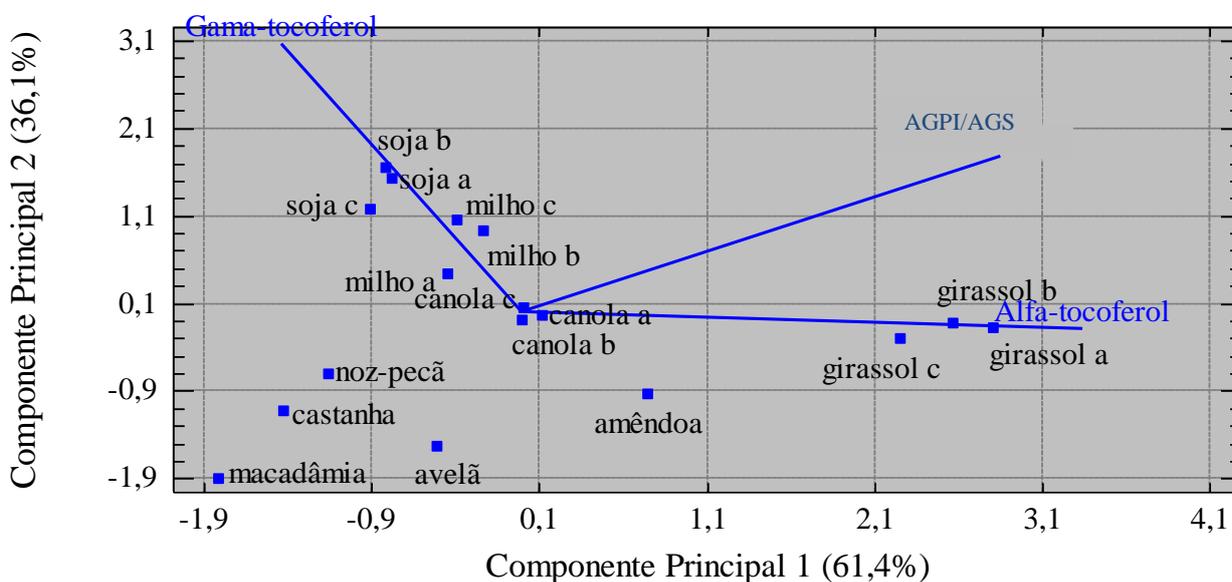


**Figura 7.** Distribuição das amostras e variáveis após a análise de componentes principais em 17 amostras de óleos vegetais incluindo as variáveis: compostos fenólicos totais,  $\alpha$ -,  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferol e AGPI/AGS.

Portanto, embora o conjunto de variáveis selecionadas explique a maior parte da variação das amostras, não se verificou um padrão de comportamento entre as mesmas. Além disso, houve uma colinearidade entre as variáveis  $\gamma$ - e  $\delta$ -tocoferol. Desta forma, um segundo PCA foi realizado, excluindo-se as variáveis, *compostos fenólicos totais* e  *$\delta$ -tocoferol* do conjunto de dados devido as suas menores amplitudes entre as amostras quando comparado com as demais variáveis.

De fato, o segundo PCA explicou melhor a variação das amostras. Foi possível extrair dois componentes principais que explicaram 97,6% da variação total das amostras (PCA1 = 61,4% e PCA2 = 36,1%; Figura 8). Além disso, observou-se que as amostras agruparam-se de

uma forma mais similar, permitindo a identificação de um padrão de comportamento. Sendo assim, três grupos de amostras foram formados onde os óleos de mesmo tipo e suas marcas permaneceram juntos, a saber: grupo 1 (óleos de soja, milho e canola); grupo 2 (óleo de girassol) e grupo 3 (óleos de nozes, exceto o óleo de amêndoa doce). Adicionalmente, observa-se que o padrão de comportamento dos óleos de girassol e amêndoa doce é diferenciado dos outros óleos refinados e de nozes, respectivamente.



**Figura 8.** Distribuição das amostras e variáveis após Análise de Componentes Principais em 17 amostras de óleos vegetais incluindo as variáveis:  $\alpha$ -,  $\gamma$ -tocoferol e AGPI/AGS

Portanto, a partir do PCA que explicou a maior variação das amostras selecionaram-se as variáveis *AGPI/AGS*,  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol para inclusão nos modelos de GLM para a CAT e para a estabilidade oxidativa dos óleos vegetais. Por conseguinte, a análise de GLM foi realizada com as variáveis independentes,  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol, e a razão *AGPI/AGS* e a variável categórica *tipo de óleo*. A *CAT* e o *período de indução*, referente à estabilidade oxidativa dos óleos, foram as variáveis dependentes dos modelos. Entretanto, com este conjunto de variáveis ajustou-se um modelo significativo para a CAT dos óleos, sendo necessária a

inclusão da variável dos *compostos fenólicos totais* para o ajuste de um modelo adequado para a estabilidade oxidativa dos óleos.

Desta forma, ambos os modelos apresentaram valores de  $R^2$  ajustado  $> 0,93$  e valores de  $p < 0,001$  (ANOVA). Além disso, todas as variáveis independentes dos modelos apresentaram  $p < 0,05$ . Observou-se que o tipo de óleo, o  $\alpha$ - e o  $\gamma$ -tocoferol explicaram 93,6% da variabilidade da CAT enquanto o tipo de óleo, o  $\gamma$ -tocoferol e o teor de compostos fenólicos totais explicaram 96,3% da variabilidade da estabilidade oxidativa dos óleos (Tabela 6).

Matematicamente, o  $\beta$ -coeficiente, a contribuição relativa média (“peso da variável”) e o valor de  $p$  das variáveis independentes no GLM indicam a importância relativa de cada variável química como determinante das variáveis dependentes na equação. No caso do modelo ajustado para a CAT, observa-se que o tipo de óleo e o  $\gamma$ -tocoferol contribuíram fortemente para a CAT dos óleos, tendo em vista o seus valores reduzidos de  $p$  quando comparados ao  $\alpha$ -tocoferol. Embora o  $\alpha$ -tocoferol tenha apresentado uma contribuição relativa média maior, o seu valor de  $p$  ( $< 0,05$ ) foi mais elevado, sugerindo uma contribuição mais fraca para a variabilidade da CAT. Vale ressaltar, que ao contrário do esperado, o  $\gamma$ -tocoferol apresentou uma contribuição negativa para a CAT dos óleos vegetais.

Embora muitos estudos sugiram que, de forma isolada, o  $\gamma$ -tocoferol é melhor antioxidante do que o  $\alpha$ -tocoferol (Seppanen *et al.*, 2012), outros relatam que quando o  $\alpha$ - e o  $\gamma$ -tocoferol estão presentes em uma mistura, a ação antioxidante do  $\gamma$ -tocoferol é influenciada pelas concentrações do  $\alpha$ -tocoferol. Wagner *et al.* (2000) observaram que o  $\gamma$ -tocoferol quando adicionado (10-100 mg/ 100g) isoladamente no azeite de oliva oxidado a 110°C foi capaz de aumentar a estabilidade oxidativa deste óleo proporcionalmente a sua concentração.

**Tabela 6.** Principais determinantes químicos para a capacidade antioxidante total e para a estabilidade oxidativa dos óleos vegetais refinados e prensados a frio obtidos por Modelo Linear Generalizado.

Variável dependente	Determinantes químicos	<i>P</i> valor	Peso da variável <sup>1</sup>	Modelo <sup>2</sup>
<i>CAT</i>	Tipo de óleo	0,0006	-	$(-4,03 \times k_1) - (3,14 \times k_2) - (0,80 \times k_3) + (1,52 \times k_4) - (7,40 \times k_5) + (0,77 \times k_6) + (3,04 \times k_7) + (2,86 \times k_8) - (0,03 \times \gamma\text{-tocoferol}) + (0,09 \times \alpha\text{-tocoferol})$
	$\alpha$ -tocoferol	0,0161	3,74	
	$\gamma$ -tocoferol	0,0000	1,52	
R <sup>2</sup> ajustado = 93,6%				
<i>P</i> da ANOVA para o modelo < 0,001				
<i>PI</i>	Tipo de óleo	0,0251	-	$(5,99 \times k_1) + (3,21 \times k_2) - (1,40 \times k_3) + (2,03 \times k_4) + (3,68 \times k_5) - (0,40 \times k_6) - (6,35 \times k_7) + (2,44 \times k_8) + (0,13 \times \gamma\text{-tocoferol}) + (5,44 \times \text{fenólicos totais})$
	$\gamma$ -tocoferol	0,0021	6,77	
	Fenólicos totais	0,0070	36,0	
R <sup>2</sup> ajustado = 96,3%				
<i>P</i> da ANOVA para o modelo < 0,001				

<sup>1</sup>Peso da variável (contribuição relativa média) = coeficiente  $\times$  média da variável. <sup>2</sup> Óleo de soja:  $k_1 = k_2 = k_3 = k_4 = k_5 = k_6 = k_7 = k_8 = -1$ ; óleo de milho:  $k_1 = k_2 = k_3 = k_4 = k_5 = k_6 = k_8 = 0$  e  $k_7 = 1$ ; óleo de girassol:  $k_1 = k_2 = k_3 = k_4 = k_6 = k_7 = k_8 = 0$  e  $k_5 = 1$ ; óleo de canola:  $k_1 = k_2 = k_4 = k_5 = k_6 = k_7 = k_8 = 0$  e  $k_3 = 1$ ; óleo de amêndoa doce:  $k_2 = k_3 = k_4 = k_5 = k_6 = k_7 = k_8 = 0$  e  $k_1 = 1$ ; óleo de avelã:  $k_1 = k_3 = k_4 = k_5 = k_6 = k_7 = k_8 = 0$  e  $k_2 = 1$ ; óleo de castanha-do-Brasil:  $k_1 = k_2 = k_3 = k_5 = k_6 = k_7 = k_8 = 0$  e  $k_4 = 1$ ; óleo de noz-pecã:  $k_1 = k_2 = k_3 = k_4 = k_5 = k_6 = k_7 = 0$  e  $k_8 = 1$ . CAT: Capacidade antioxidante total; PI: Período de indução.

No entanto, quando adicionado juntamente como o  $\alpha$ -tocoferol, em uma proporção de 1:1 (10 a 100 mg /100g) não houve aumento na estabilidade oxidativa do azeite de oliva.

Huang *et al.* (1995) também observaram um comportamento similar do  $\alpha$ - e do  $\gamma$ -tocoferol quando presentes em uma mistura (1:1 v/v), durante oxidação do óleo de milho a 60°C, sendo que a atividade antioxidante ou pró-oxidante da mistura dependeu das concentrações de  $\alpha$ -tocoferol.

Desta forma, optou-se por retirar do modelo de GLM as amostras de girassol e amêndoa doce, as quais apresentaram a maior diferença entre as concentrações de  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol, assim como foram aquelas que apresentaram o comportamento mais diferenciado dos seus respectivos grupos de óleos, conforme o segundo PCA.

Por conseguinte, ajustou-se um novo modelo onde apenas o tipo de óleo ( $p = 0,003$ ) e o  $\gamma$ -tocoferol ( $p = 0,0007$ ;  $\beta$ -coeficiente = 0,04; contribuição relativa média = 2,64) explicaram a maior variabilidade da CAT dos óleos ( $R^2$  ajustado = 0,90 e  $p$  da ANOVA  $<0,0001$ ). Além disso, de acordo com as variáveis matemáticas do modelo, o tipo de óleo tornou-se menos influente para a variabilidade da CAT, enquanto o  $\gamma$ -tocoferol passou a apresentar uma forte contribuição positiva para a variabilidade da CAT dos óleos. Portanto, o  $\gamma$ -tocoferol é um importante determinante químico da CAT dos óleos, contudo parece que o seu papel como determinante depende das suas concentrações assim como das concentrações de  $\alpha$ -tocoferol nos óleos vegetais.

Castelo-Branco & Torres (2012) observaram que o tipo de óleo, o  $\gamma$ - e o  $\delta$ -tocoferol foram os principais determinantes da CAT em óleos vegetais refinados de soja, milho, girassol e canola após ajustes de modelos pela aplicação de GLM. No entanto, o  $\gamma$ -tocoferol contribuiu mais fortemente para a variabilidade da CAT do que os demais preditores, sendo

considerado o principal determinante da CAT para esses óleos, concordando com os resultados do presente estudo.

Da mesma forma, o  $\gamma$ -tocoferol foi um importante determinante para a estabilidade oxidativa dos óleos, juntamente com o teor de compostos fenólicos totais e o tipo de óleo (Tabela 6). De acordo com o valor de  $p$ , o  $\beta$ -coeficiente e a contribuição média da variável, os compostos fenólicos foram os principais determinantes da estabilidade oxidativa dos óleos. Ao contrário do esperado, a razão AGPI/AGS, associada à tendência oxidativa dos óleos, não foi um determinante da estabilidade oxidativa, sugerindo maior importância dos compostos antioxidantes, para a qualidade final dos óleos vegetais.

Através da análise do primeiro PCA observou-se que as amostras ricas em compostos fenólicos, devido à adição de TBHQ, agrupavam-se separadamente das demais, sugerindo um comportamento diferenciado destas amostras. Alguns autores já demonstraram que a adição de TBHQ aumentou a estabilidade oxidativa dos óleos vegetais de forma mais efetiva do que outros antioxidantes, tais como o ácido cítrico (Azeredo *et al.*, 2004), os tocoferóis e os compostos fenólicos presentes no extrato de alecrim (Merril *et al.*, 2008).

Desta forma, com o intuito de conhecer a contribuição dos compostos fenólicos presentes naturalmente nos óleos vegetais para a estabilidade oxidativa, as amostras adicionadas de TBHQ foram excluídas do modelo. Contudo, no novo modelo, os compostos fenólicos, o tipo de óleo e o  $\gamma$ -tocoferol continuaram explicando significativamente a maior parte da variabilidade da estabilidade oxidativa dos óleos ( $R^2$  ajustado = 96,9%  $p$  ANOVA  $<0,0001$ ). Portanto, embora presentes em teores relativamente baixos, os compostos fenólicos naturalmente presentes nos óleos vegetais contribuem para aumentar a estabilidade oxidativa dos óleos.

Neste contexto, observa-se que os determinantes químicos da CAT e da estabilidade oxidativa foram diferentes, exceto pelo  $\gamma$ -tocoferol cuja contribuição foi fortemente significativa em ambos os modelos. É bem reconhecido na literatura que a atividade antioxidante dos compostos é sensível às condições do meio de reação (Shahidi & Zong, 2010). Desta forma, é provável que as diferenças entre os protocolos experimentais do método de *Rancimat* e do ensaio de TEAC influenciaram na ação dos antioxidantes presentes nos óleos, tais como as diferenças de temperatura, de polaridade do meio reacional e do radical utilizado ou formado durante as reações oxidativas de cada método.

Similarmente, a ação dos antioxidantes em inibir as reações de oxidação difere devido as suas propriedades químicas, assim como a sua localização física nos óleos vegetais (Chayasit *et al.*, 2008b; Frankel, 1996). Conforme citado por Frankel (1996), Porter *et al.* (1989) propuseram a teoria conhecida como “*Paradoxo Polar*” que apoia um comportamento paradoxal dos antioxidantes em diferentes meios, sendo que antioxidantes polares são mais eficazes em meio apolares, enquanto antioxidantes apolares são mais eficazes em meios polares. Neste contexto, no caso de um óleo bruto, os antioxidantes apolares, tais como o  $\alpha$ -tocoferol, ficariam dissolvidos no óleo, enquanto os compostos polares, tais como os compostos fenólicos, teriam maior afinidade pela interface ar/óleo, possível sítio da reação de oxidação lipídica nos óleos. Portanto, apresentariam maior atividade antioxidante.

Chayasit *et al.* (2008a) também sugerem que a localização dos antioxidantes nos óleos contribua para que a sua atividade antioxidante seja variada em diferentes condições do meio. Conforme estes autores, os óleos vegetais contêm diversos compostos de superfície-ativa, geralmente anfipáticos, tais como mono e diacilgliceróis, os fosfolípídeos e os ácidos graxos livres, que na presença de pequenas quantidades de água agregam-se em estruturas coloidais, como as micelas reversas.

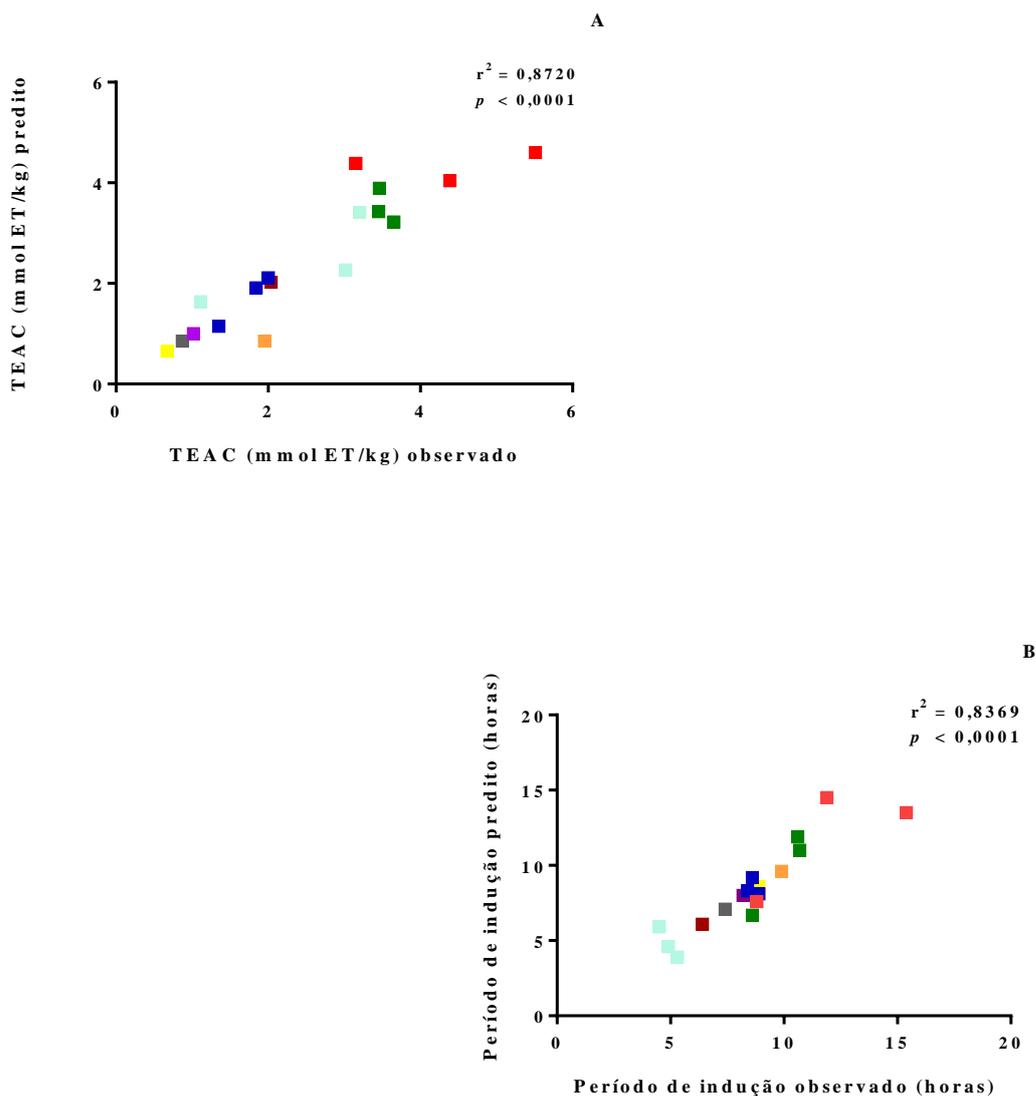
As micelas reversas são estruturas globulares formadas pela agregação dos compostos anfipáticos no qual a parte polar da molécula fica voltada para o centro da micela, no meio aquoso, e a cadeia alifática fica em contato com o meio lipídico (Chayasit *et al.*, 2007). Acredita-se que a oxidação dos óleos ocorra principalmente nestes agregados de moléculas, sugerindo-se que os compostos polares sejam antioxidantes mais eficientes nos óleos devido a sua maior interação com a interface água/óleo das micelas reversas. No entanto, a influência da localização dos antioxidantes nos óleos vegetais ainda não está totalmente esclarecida e continua sendo alvo de diferentes estudos (Laguerre *et al.*, 2013; Bakir *et al.*, 2013; Zhong & Shahidi, 2012; Chen *et al.*, 2011; Shahidi & Zhong, 2011). Entretanto, no presente estudo, independente do meio de reação, o  $\gamma$ -tocoferol pareceu ser essencial para a qualidade dos óleos vegetais tendo em vista a sua importante contribuição para a CAT e a estabilidade oxidativa dos óleos.

Por fim, os determinantes químicos identificados em ambos os modelos, incluindo os modelos onde houve exclusão de variáveis, foram capazes de estimar a CAT e a estabilidade oxidativa dos óleos de forma adequada considerando a forte correlação entre os valores experimentais e os preditos pelos modelos para ambos os parâmetros (Figura 9)

## **5. Conclusão**

Os óleos vegetais refinados apresentaram composição bastante diferenciada em relação aos óleos de nozes prensados a frio, destacando-se pelo maior conteúdo de tocoferóis, especialmente. No entanto, os resultados do presente estudo foram importantes para ampliar o conhecimento sobre a composição química dos óleos de nozes prensados a frio, tendo em vista a limitação destes resultados na literatura. Além disso, o óleo de soja, um dos mais consumido mundialmente, apresentou a maior CAT e estabilidade oxidativa entre os óleos investigados, aspectos que podem contribuir para valorizar este tipo de óleo.

Além disso, a aplicação de análise multivariada permitiu estimar a CAT e a estabilidade oxidativa dos óleos de forma adequada por meio dos principais determinantes identificados, entre os quais se destacou o  $\gamma$ -tocoferol cuja contribuição foi bastante relevante para ambos os parâmetros, demonstrando a sua importância para a qualidade global dos óleos vegetais.



**Figura 9.** Estimativa da capacidade antioxidante total (A) e estabilidade oxidativa (B) por meio dos modelos ajustados por Modelo Linear Generalizado. ■ soja; ■ milho; ■ girassol; ■ canola; ■ castanha-do-Brasil; ■ noz-pecã; ■ avelã; ■ amêndoa doce; ■ macadâmia.

## ***Capítulo 2***

*Transformações químicas durante oxidação acelerada de óleos vegetais e sua relação com a estabilidade oxidativa e a capacidade antioxidante total*

## 1. Introdução

As alterações causadas nos óleos vegetais como consequência da oxidação lipídica diminuem a aceitação dos óleos e de seus derivados pelos consumidores devido ao desenvolvimento do *off-flavor* característico de ranço e de produtos potencialmente tóxicos para a saúde humana (Chen *et al.*, 2011; Shahidi & Zhong, 2010). Desta forma, o monitoramento do grau de oxidação dos óleos é essencial para assegurar um produto final de qualidade e seguro para o consumo humano.

Neste contexto, a estabilidade oxidativa dos óleos, que se refere à resistência dos mesmos à oxidação, é um importante parâmetro para a avaliação da qualidade e para a escolha da melhor aplicação tecnológica de cada tipo de óleo (Choe & Min, 2006). Existem diferentes métodos para determinar a estabilidade oxidativa dos óleos que monitoram a formação dos produtos primários ou secundários da oxidação lipídica a fim de determinar a vida de prateleira dos óleos. No entanto, acompanhar estas alterações em condições reais de armazenamento é muito demorado, pois as transformações químicas são muito lentas. Desta forma, utilizam-se condições aceleradas de oxidação, tais como, exposição a temperaturas elevadas e à luz, para avaliar a estabilidade oxidativa dos óleos em um curto espaço de tempo (Frankel, 2005).

Quanto aos testes de oxidação acelerada, existe extensa literatura investigando o comportamento de formação e degradação dos produtos da oxidação lipídica e da composição em ácidos graxos e compostos antioxidantes. Diferentes sistemas lipídicos foram investigados nestes trabalhos, por exemplo, triacilgliceróis e óleos purificados (isentos de antioxidantes; Kim & Choe, 2012; Dolde & Wang, 2011; Erkan *et al.*, 2009; Warner & Moser, 2009; Nagala-Kalucka *et al.*, 2005; Gómez-Alonso *et al.*, 2004; Isnardy *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 1995), assim como diferentes tipos de óleos vegetais (Marmesat *et al.*, 2012; Silvagni *et al.*,

2010; Wang *et al.*, 2010; Rukmini & Raharjo, 2010; Bruscatto *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008; Tabee *et al.*, 2008; Hoshina *et al.*, 2004; Psomiadou & Tsimidou, 2002; Barrera-Arellano *et al.*, 2002). Porém, ainda são limitadas as informações sobre a influência das transformações químicas, especialmente dos antioxidantes, para a formação dos produtos da oxidação, conseqüentemente, para a estabilidade oxidativa dos óleos (Elisia *et al.*, 2013). Além disso, pouco se sabe sobre o comportamento da CAT na oxidação acelerada e a sua relação com a estabilidade dos óleos (Cheung *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Valavanidis *et al.*, 2004).

Neste contexto, o uso da estatística multivariada pode contribuir para a melhor compreensão das transformações químicas dos óleos vegetais, durante a oxidação acelerada, e das associações entre a composição dos óleos e a sua qualidade final. A Análise de Correlações Canônicas permite observar as relações multidimensionais lineares existentes entre dois grupos de variáveis, tornando-se uma ferramenta estatística útil para avaliar a interação conjunta da degradação dos ácidos graxos, tocoferóis e compostos fenólicos para a formação e/ou degradação dos produtos primários e secundários da oxidação, bem como para as transformações da CAT durante a oxidação acelerada dos óleos (Mai & Ness, 1999).

Portanto, o monitoramento da estabilidade oxidativa de diferentes óleos vegetais em variados testes de oxidação acelerada pode colaborar para ampliar o entendimento sobre a influência das transformações da composição química para o grau de oxidação e para a CAT dos óleos vegetais, especialmente se aliada ao uso de estatística multivariada.

## 2. Objetivos

### Geral

Monitorar a estabilidade oxidativa dos óleos em testes de oxidação acelerada a fim de avaliar a influência das transformações na composição química em ácidos graxos, tocoferóis e compostos fenólicos totais para a formação e degradação dos produtos da oxidação lipídica, bem como para a CAT dos óleos, por meio da aplicação de estatística multivariada.

### Específicos

- Determinar a estabilidade oxidativa dos óleos vegetais refinados de soja, milho, girassol e canola, a 65°C e a 180°C, monitorando a formação dos produtos primários e secundários por meio do índice de peróxido, do teor de dienos conjugados e do índice de *p*-anisidina;
- Determinar a estabilidade oxidativa dos óleos de nozes prensados a frio de castanha-do-Brasil, noz-pecã, avelã, amêndoa doce e macadâmia a 65°C e na exposição à luz, monitorando a formação dos produtos primários e secundários por meio do índice de peróxido, do teor de dienos conjugados e do índice de *p*-anisidina;
- Avaliar o comportamento de degradação dos ácidos graxos, tocóis e do teor de compostos fenólicos totais nos diferentes tipos de óleos, nas condições de oxidação acelerada investigadas;
- Investigar as relações entre as transformações da composição química, a formação e a degradação dos produtos da oxidação lipídica e a CAT durante os testes de oxidação acelerada por meio de Correlações Canônicas.

### **3. Material e Métodos**

#### **3.1 Aliquotagem e armazenamento das amostras**

As amostras de óleos utilizadas no Capítulo 2 foram as mesmas do Capítulo 1, portanto as etapas de aliquotagem e armazenamento das amostras seguiram os mesmos procedimentos descritos Capítulo 1, item 3.2.

#### **3.2 Testes de oxidação acelerada**

Dois testes de oxidação acelerada foram utilizados para cada tipo de óleo, a saber: oxidação acelerada a 65°C (teste de Estufa de Schaal) e a 180°C para os óleos vegetais refinados, e teste de Estufa de Schaal e de foto-oxidação para os óleos de nozes prensados a frio. O teste de estufa de Schaal foi utilizado devido a sua fácil comparação com as condições de armazenamento em temperatura ambiente (Iqbal & Bhangar, 2007). O teste de oxidação a 180°C foi escolhido devido a sua fácil comparação com o processo de fritura, frequentemente aplicado a óleos vegetais refinados. O teste de foto-oxidação foi escolhido para avaliar apenas a estabilidade dos óleos prensados a frio uma vez que o processo de refino elimina as clorofilas e os carotenoides, pigmentos que agem como foto-sensibilizadores acelerando esse mecanismo de oxidação (Choe & Min, 2006).

Para todos os testes de oxidação acelerada manteve-se constante a razão entre o volume de óleo e a superfície de contato com o oxigênio, sendo oxidados 200 mL de cada tipo de óleo em becher de 250 mL, previamente lavados em solução aquosa de ácido nítrico (4:1, v/v) para a remoção de metais de transição. Os testes de Estufa de Schaal e de foto-oxidação foram realizados conforme descrito AOCS, 2004 (método Cg 5-97 e Cg 6-01, respectivamente) e o teste a 180°C, conforme Hoshina *et al.* (2004).

No teste de Estufa de Schaal, as amostras foram armazenadas em estufa estabilizada a  $65 \pm 5^\circ\text{C}$ , no escuro, durante 30 dias. Alíquotas foram removidas em 5, 10, 20 e 30 dias para a

realização das análises. No teste de foto-oxidação as amostras foram armazenadas em estufa espelhada, estabilizada a  $30 \pm 3^\circ\text{C}$  e equipada com lâmpada fluorescente circular (1800 lux) suspensa 10 cm acima das amostras, durante 7 dias. Alíquotas foram removidas em 1, 3, 5 e 7 dias para as análises. No teste de oxidação a  $180^\circ\text{C}$ , as amostras foram armazenadas em estufa estabilizada a  $180 \pm 5^\circ\text{C}$ , no escuro, durante 3 horas. Alíquotas foram removidas em 0,5, 1, 2 e 3hs para as análises. Em todos os testes de oxidação, foi utilizado um becher para cada ponto de remoção e a mesma alíquota de óleo fresco (tempo 0) foi utilizada como controle.

### 3.3 Monitoramento da estabilidade oxidativa

A estabilidade oxidativa dos óleos foi acompanhada pela formação dos produtos primários (LOOH) e dos produtos secundários (produtos carbonílicos) da oxidação lipídica. Os produtos primários foram monitorados por meio do índice de peróxido (IP, Capítulo 1, item 3.3) e do teor de dienos conjugados (DC) que foi determinado espectrofotometricamente a 232 nm (AOAC, 1984). Os produtos secundários foram determinados por meio do índice de *p*-anisidina (IpA; AOCS, 2004; método cd 18-90), no qual o reagente de *p*-anisidina forma um complexo de cor amarela com os compostos carbonílicos oriundos da decomposição dos LOOH, especialmente os aldeídos insaturados. O IpA foi determinado espectrofotometricamente (350 nm) após reação da solução da amostra com o reagente de *p*-anisidina e calculados de acordo com a Equação (1):

$$\text{IpA} = 25 \times (1,2 \text{ Aa} - \text{Ab}) / \text{m} \quad (1)$$

Onde:

Aa = absorbância da solução da amostra depois da reação com o reagente de *p*-anisidina

Ab = absorbância da solução da amostra antes da reação com o reagente de *p*-anisidina

m = massa da amostra (g)

### **3.4 Determinação da composição em ácidos graxos, tocoferóis, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante total**

A composição em ácidos graxos, tocoferóis, compostos fenólicos totais e a CAT durante os testes de oxidação acelerada foi determinada conforme descrito no Capítulo 1 (Itens 3.4.1, 3.4.2, 3.4.3 e 3.4.6, respectivamente). Entretanto, diferentemente do método adotado no Capítulo 1, neste capítulo utilizou-se a padronização interna com o padrão de ácido heptadecanoico (17:0) para quantificação dos ácidos graxos. Os resultados foram expressos em g/kg de óleo. Além disso, o conteúdo de ácidos graxos foi determinado apenas em dois pontos de oxidação, no início e no fim do processo (0,5 e 3 h a 180°C; 10 e 30 dias a 65°C e 3 e 7 dias à foto-oxidação). Por outro lado, o teor de compostos fenólicos totais foi determinado apenas no último ponto de oxidação para cada teste (3h a 180°C; 30 dias a 65°C e 7 dias à foto-oxidação).

### **3.5 Análises estatísticas**

Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão, sendo que a distribuição dos dados foi observada conforme descrito no Capítulo 1 (Item 3.7). A ANOVA *two-way* seguida do pós-teste de Tukey foi empregada para investigar a influência do tipo de óleo, da marca e do tempo de oxidação nas variáveis investigadas. ANOVA *one-way* seguida do pós-teste de Tukey foi utilizada para comparar a influência do tipo de óleo para o grau de formação ( $\Delta$  = valor máximo da variável – valor no tempo 0) e de degradação ( $\Delta$  = valor máximo da variável – valor mínimo) da composição química, dos produtos de oxidação e da CAT. Correlação Parcial de dados foi utilizada para verificar a linearidade e eliminar o efeito de colinearidade entre as variáveis a fim de selecioná-las para a aplicação na análise de Correlação Canônica. Na análise de Correlação Canônica foram correlacionados dois grupos de variáveis: grupo 1 (variáveis correspondentes ao  $\Delta$  de degradação da composição dos

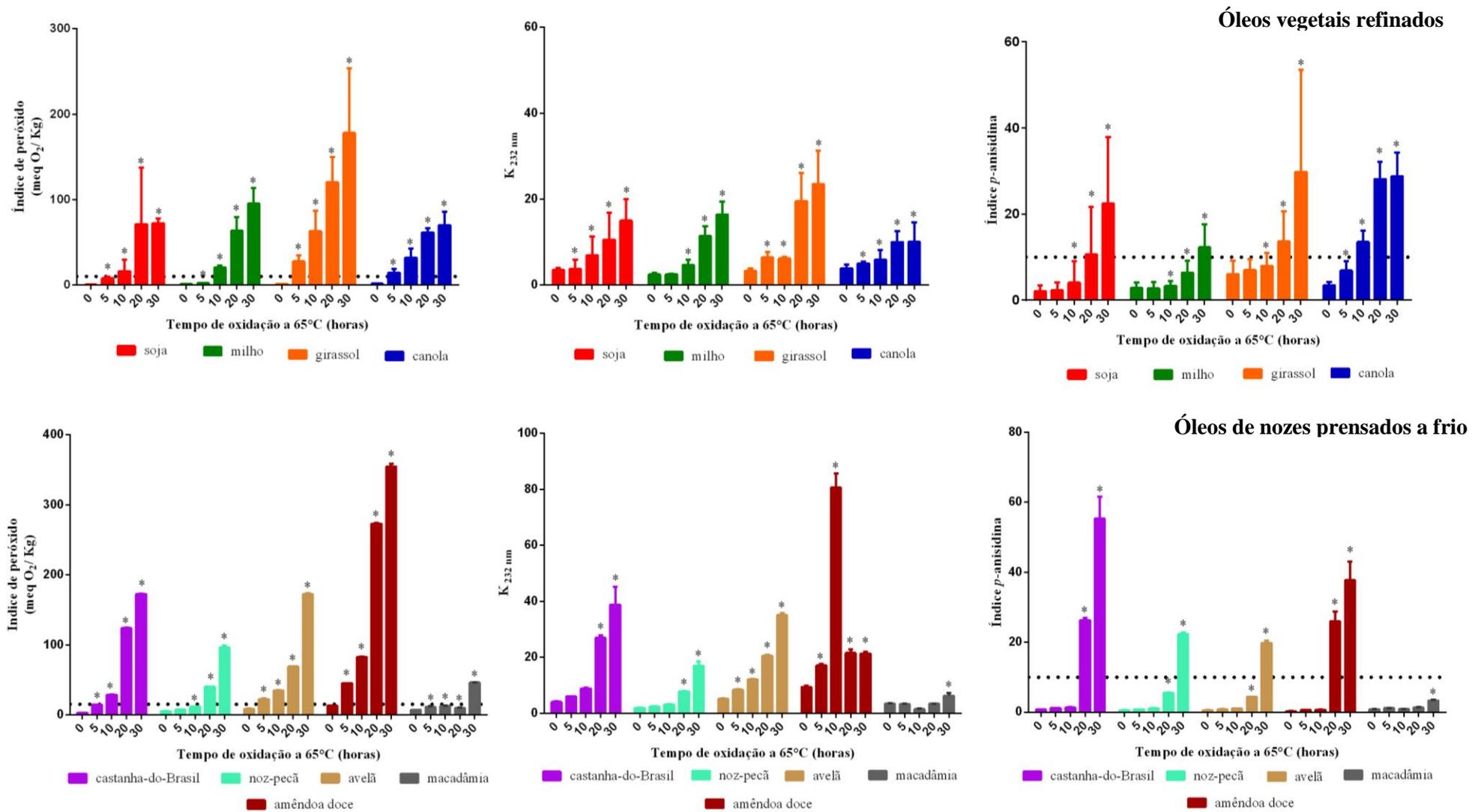
óleos) e grupo 2 (variáveis correspondentes ao  $\Delta$  de formação dos produtos da oxidação e da CAT), onde obteve-se a máxima combinação linear entre eles. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico *Statgraphics* v. 12.2 (Manugistics, EUA).

#### 4. Resultados e discussão

##### *4.1 Estabilidade oxidativa dos óleos vegetais refinados e prensados a frio no teste de Estufa de Schaal (65°C)*

A formação dos produtos primários e secundários dos óleos vegetais refinados e prensados a frio aumentou para todos os óleos durante o teste de oxidação acelerada em Estufa de Schaal a 65°C que corresponde ao mecanismo de auto-oxidação nos óleos vegetais (Figura 1). Todos os óleos refinados apresentaram um aumento linear na formação dos produtos primários e secundário da oxidação lipídica em função do tempo ( $r > 0,70$ ;  $p > 0,0001$ ). Em contrapartida, os óleos de nozes prensados a frio apresentaram um aumento linear ( $r > 0,90$ ;  $p = 0,0001$ ) para a formação dos produtos primários, enquanto a formação dos produtos secundários permaneceu inalterada nos estágios iniciais da oxidação.

A formação de LOOH, determinada pelo IP, aumentou significativamente a partir do intervalo entre 0-5 dias e apresentou duas fases distintas: a primeira, onde a taxa de formação foi relativamente pequena (0-10 dias); e a segunda, onde a taxa de formação foi maior e mais intensa (10-30 dias), sugerindo um período de indução no início da oxidação dos óleos a 65°C. No entanto, os óleos de noz-pecã e de macadâmia destacaram-se por apresentar um aumento significativo mais tardio na formação de LOOH, demonstrando um período de indução mais prolongado. Entretanto, com exceção destes dois óleos, os óleos de nozes apresentaram uma taxa de formação de LOOH mais acelerada do que os óleos refinados com base na inclinação das curvas de LOOH vs tempo.



**Figura 1.** Formação dos produtos de oxidação em óleos refinados e de nozes prensados a frio oxidados em Estufa de Schaal. Resultados apresentados como média  $\pm$  DP de três marcas para o mesmo tipo de óleo refinado e de uma marca para os óleos de nozes. ANOVA *two-way* seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A linha pontilhada paralela ao eixo x (.....) indica os limites aceitáveis para cada indicador. \* indica diferença significativa em relação ao óleo fresco (controle, ponto 0).

A formação de DC durante a oxidação apresentou a mesma tendência daquela observada para o IP, aumentado a partir do intervalo entre 0-5 dias para a maioria dos óleos. Outros autores também observaram esta semelhança em diferentes tipos de óleos durante a oxidação acelerada a 60°C (Kim *et al.*, 2008; Miraliakbari & Shahidi, 2008b; Gómez-Alonso *et al.*, 2004). Desta forma, confirma-se que os LOOH são bons indicadores do grau de oxidação inicial das amostras durante o mecanismo de auto-oxidação. Novamente, os óleos de noz-pecã e de macadâmia apresentaram uma formação mais lenta dos DC. Por outro lado, o óleo de amêndoa doce foi o único que apresentou degradação destes produtos nos estágios finais da oxidação, sugerindo menor estabilidade dos DC neste óleo.

Em todos os pontos de oxidação, os óleos de amêndoa doce e de girassol apresentaram os maiores valores de IP e DC. Em contrapartida, o óleo de macadâmia apresentou os menores valores. Adicionalmente, os óleos de amêndoa doce ( $\Delta_{IP} = 341,7$  e  $\Delta_{DC} = 71,3$ ) e de girassol ( $\Delta_{IP} = 172,0$  e  $\Delta_{DC} = 20,3$ ) apresentaram a maior formação de LOOH, enquanto o óleo de macadâmia ( $\Delta_{IP} = 38,9$  e  $\Delta_{DC} = 2,88$ ) apresentou a menor formação.

A presença de LOOH nos estágios iniciais da oxidação lipídica ainda não influencia negativamente para a qualidade dos óleos vegetais, contudo com a progressão da oxidação, estas estruturas tendem a se decompor em compostos secundários, que além de alterarem as características sensoriais dos óleos, também podem ocasionar efeitos adversos à saúde, tais como o 4-hidroperoxi-2-nonenal (HNE) e o 4-hidroxi-*trans*-2-nonenal (HPNE; Zárte *et al.*, 2009; Han & Csallany, 2009; Sutherland *et al.*, 2007). Desta forma, o adequado controle da formação de LOOH nos óleos, especialmente nos óleos de amêndoa doce e de girassol, é fundamental para a manutenção da qualidade nutricional destes óleos.

Outra forma de monitorar o grau de degradação dos óleos vegetais é pelo *IpA* que mensura os produtos secundários formados a partir da decomposição dos LOOH. O *IpA*

relaciona-se com os produtos carbonílicos de alto e baixo peso molecular, especialmente com os aldeídos, responsáveis pela formação do *off-flavor* nos óleos oxidados (Erkan *et al.*, 2009; Chayasit *et al.*, 2007). De acordo com Zajdenweg *et al.*, 2011, o *I<sub>pA</sub>* apresentam um forte correlação com avaliação sensorial dos óleos.

Nos óleos investigados, a formação de produtos secundários aumentou significativamente entre 5-10 dias e 10-20 dias para os óleos refinados e para os óleos de nozes, respectivamente. Portanto, embora exista uma rápida formação de LOOH nos óleos de nozes, parece que a estabilidade destas estruturas é maior nestes óleos do que nos óleos refinados.

A decomposição de LOOH ocorre devido às altas temperaturas e à presença de metais de transição, tais como íons de ferro e cobre presentes nos óleos após o processamento (Shahidi & Zong, 2009; Chayasit *et al.*, 2007). Portanto, agentes quelantes, tais como os fosfolípídeos, são capazes de retardar a decomposição dos LOOH a produtos secundários (Doert *et al.*, 2012). Usualmente, os fosfolípídeos são removidos durante o processo de refino dos óleos (Farhoosh *et al.*, 2009a). Deste modo, é possível que estas estruturas estejam presentes em maiores quantidades nos óleos de nozes prensados a frio do que nos demais óleos refinados, retardando a decomposição dos LOOH a produtos secundários.

No entanto, apesar do aumento mais tardio dos produtos secundários nos óleos de nozes, a quantidade de formação destes produtos nestes óleos foi significativamente maior do que nos óleos refinados, especialmente no caso dos óleos de castanha-do-Brasil ( $\Delta_{I_{pA}} = 54,6$ ) e de amêndoa doce ( $\Delta_{I_{pA}} = 37,5$ ). O óleo de macadâmia foi um exceção, tendo em vista a sua menor formação de produtos secundários ( $\Delta_{I_{pA}} = 2,88$ ) entre todos os óleos investigados. Considerando apenas os óleos refinados, a seguinte ordem foi observada: canola ( $\Delta_{I_{pA}} = 23,6$ ) > soja ( $\Delta_{I_{pA}} = 20,4$ ) > girassol ( $\Delta_{I_{pA}} = 20,4$ ) > milho ( $\Delta_{I_{pA}} = 9,38$ ). Atualmente, os óleos de

nozes são muito utilizados em preparações culinárias de alta gastronomia devido aos seus *flavors* peculiares. Portanto, a elevada formação dos produtos secundários nos óleos de nozes pode causar um importante impacto na aplicação destes óleos como óleos tipo *gourmet*.

Todos os óleos oxidados a 65°C atingiram os limites máximos preconizados para óleos de boa qualidade quanto ao IP (10 e 15 meq O<sub>2</sub>/kg, refinados e prensados a frio) e ao IpA (10) entre 0-5 dias e 10-20 dias, respectivamente, exceto os óleos de milho, noz-pecã e macadâmia que atingiram mais tardiamente estes valores (Figura 1). Desta forma, com exceção destes últimos óleos, todos os outros óleos apresentaram um provável ponto crítico de oxidação (aquele onde existe uma brusca aceleração da oxidação com alterações sensoriais; Choe & Min, 2006) entre 10-30 dias.

O teste de Estufa de Schaal tem sido um dos métodos mais utilizados para determinar a estabilidade oxidativa dos óleos, tendo em vista que utiliza temperaturas (60-80°C) que apresentam o mecanismo de reação oxidativa similar àquele que ocorre em condições de temperatura ambiente. Desta forma, os resultados observados após o teste de Estufa de Schaal tendem a apresentar uma boa associação com a vida de prateleira dos óleos vegetais (Frankel, 1993). Portanto, considerando a formação dos produtos primários e secundários dos óleos vegetais durante o teste de Estufa de Schaal, possivelmente, os óleos de amêndoa doce e de girassol serão os mais instáveis em condições reais de armazenamento, enquanto os óleos de macadâmia e noz-pecã serão os mais estáveis.

#### *4.2 Estabilidade oxidativa dos óleos vegetais refinados a 180°C*

Todos os óleos apresentaram um aumento significativo na formação dos produtos primários e secundários da oxidação lipídica durante a oxidação 180°C (Figura 2). O IP aumentou entre 0 – 0,5 h para todos os óleos, porém não houve diferença significativa na quantidade de formação de LOOH entre eles. No entanto, enquanto os óleos de soja e de

milho apresentaram um mínimo aumento após este intervalo, os óleos de girassol e de canola apresentaram uma redução significativa ( $p < 0,0001$ ), demonstrando que a decomposição dos LOOH foi maior do que a sua formação no intervalo entre 0,5 - 3 h. A alta decomposição dos LOOH durante a oxidação dos óleos vegetais corresponde a um elevado grau de oxidação dos óleos (Choe & Min, 2006). Portanto, demonstra-se que os óleos de girassol e de canola, após 3 h de oxidação a 180°C, alcançaram estágios mais avançados de oxidação do que os óleos de soja e de milho, possivelmente, apresentando maiores perdas na sua qualidade nutricional e sensorial.

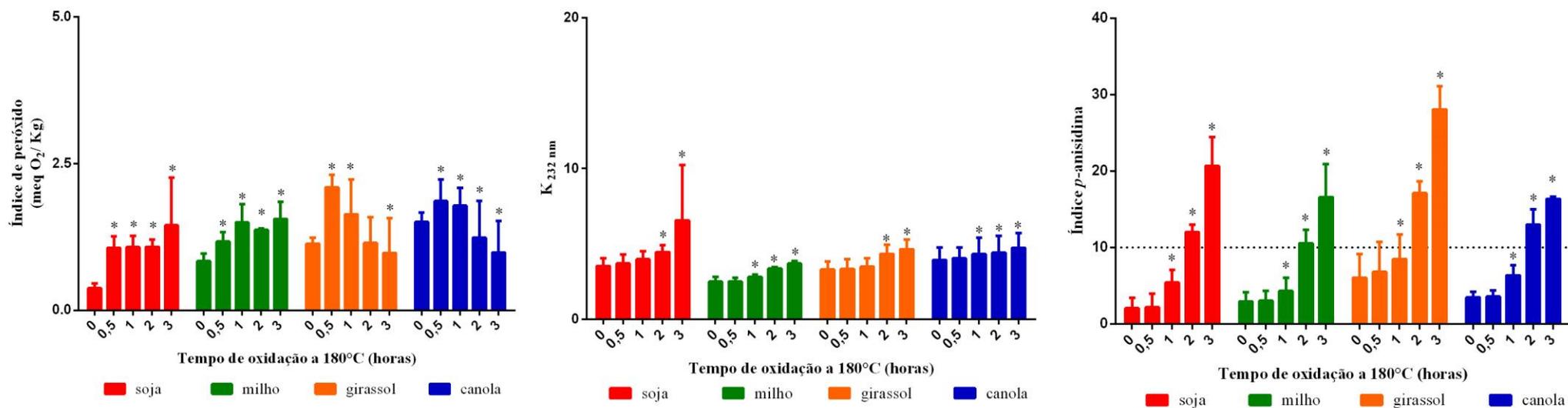
Adicionalmente, nenhum óleo atingiu os limites máximos preconizados pela legislação para o IP, não ultrapassando os valores de 2,5 meq O<sub>2</sub>/kg. De fato, durante a oxidação em temperaturas elevadas (>100°C), a formação de LOOH é pequena devido à baixa solubilidade de oxigênio no meio. Desta forma, os radicais L<sup>\*</sup> formados na etapa de iniciação tendem a polimerizarem-se ao invés de formar LOOH (Frankel, 2005), contribuindo para a redução do IP em óleos altamente oxidados. Neste contexto, o IP não é um bom indicador de qualidade para óleos submetidos à oxidação em altas temperaturas, fato também observado no presente estudo. De forma semelhante, a formação de DC também foi reduzida em todos os óleos, acompanhando o comportamento do IP e demonstrando a pequena contribuição dos produtos primários para a termo-oxidação.

Em contrapartida, apesar da pequena formação de LOOH, os produtos secundários aumentaram exponencialmente em relação ao tempo para todos os óleos ( $r > 0,90$  e  $p > 0,0001$ ) a partir do intervalo entre 0,5 – 1 h. Silvagni *et al.* (2010) propõem uma nova rota para a oxidação lipídica de óleos em temperaturas elevadas (> 100°C) onde os produtos secundários, especialmente os aldeídos voláteis, são formados de forma independente à decomposição dos LOOH. Nesta nova rota, sugere-se que os compostos carbonílicos são

gerados a partir da clivagem do radical  $LO^{\bullet}$  formado durante a etapa de propagação da oxidação, promovendo a formação de produtos secundários, sem a formação de LOOH. Desta forma, é possível justificar, em parte, a alta formação de produtos secundários nos óleos oxidados a  $180^{\circ}C$  apesar do reduzido teor de LOOH.

A quantidade de formação de produtos secundários não apresentou diferença significativa entre os óleos, mas o óleo de girassol apresentou o maior valor de  $I_pA$  em todos os pontos de oxidação. Desta forma, todos os óleos atingiram o valor máximo de  $I_pA$  recomendado para óleos de boa qualidade no intervalo entre 1-2 h. Porém, o óleo de girassol alcançou este valor mais rapidamente, sugerindo uma alteração sensorial mais veloz para este óleo.

Os óleos de girassol, milho e especialmente o de soja são frequentemente utilizados no preparo dos alimentos em processos de fritura. A fritura é um método de cocção que possibilita a formação de um aroma único nos alimentos, no entanto, ocasiona uma elevada degradação térmica dos óleos vegetais devido, principalmente, as altas temperaturas utilizadas. Ainda não existe nenhuma norma brasileira específica sobre o momento ideal para o descarte destes óleos. Alguns países da Europa, tais como a Espanha, recomendam que os óleos de fritura sejam descartados quando atingirem 25% de compostos polares, produtos terciários da oxidação lipídica, tais como os compostos de polimerização (Dana & Saguy, 2001). De acordo com Jorge *et al.* (2005) esse limite é alcançado em 4,5 h para o óleo de girassol e em 6,5 h para os óleos de soja e de milho submetidos ao processo de fritura de batatas a  $180^{\circ}C$ .



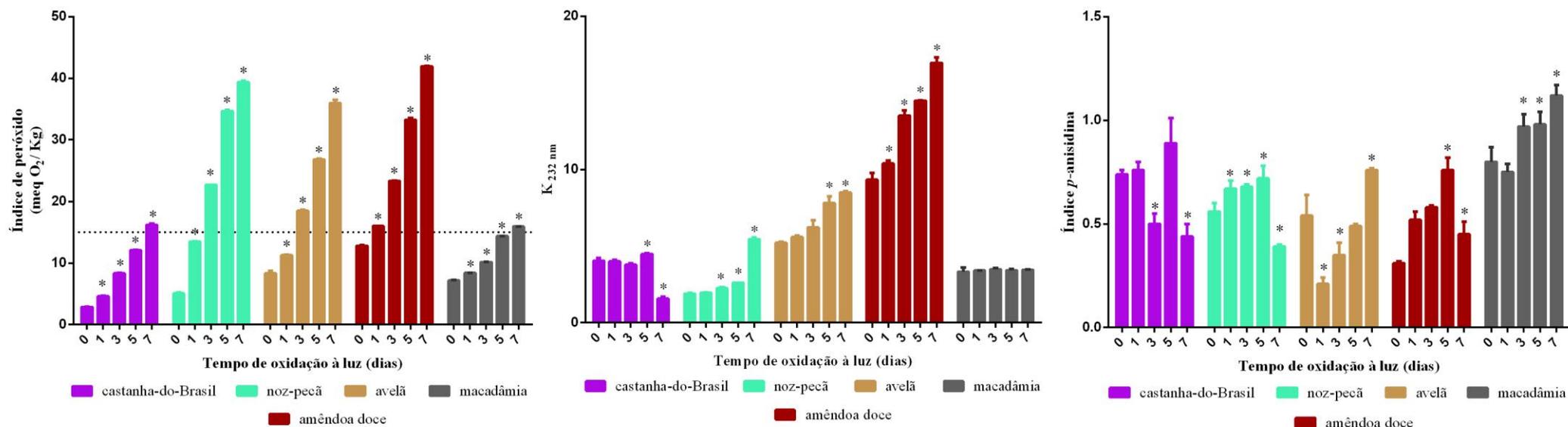
**Figura 2.** Comportamento dos produtos de oxidação a 180° dos óleos vegetais refinados de soja, milho, girassol e canola. Resultados apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de três marcas para o mesmo tipo de óleo. ANOVA *two-way* seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A linha pontilhada paralela ao eixo x (.....) indica os limites aceitáveis para cada indicador. \* indica diferença significativa em relação ao óleo fresco (controle, ponto 0).

Em contrapartida, considerando a formação de produtos primários e secundários dos óleos vegetais refinados investigados no presente estudo, observa-se que o ponto crítico de oxidação para todos os óleos encontrou-se entre 0,5 - 2 h, sugerindo uma rápida perda da qualidade nutricional e sensorial destes óleos. Desta forma, é possível que em um processo de fritura de alimentos, que também envolve outras reações químicas além da oxidação lipídica, os óleos apresentem alterações sensoriais e nutricionais antes de 6 horas.

Portanto, demonstra-se que todos os óleos apresentaram baixa estabilidade oxidativa a 180°C. No entanto, o óleo de girassol foi o mais instável tendo em vista sua rápida degradação de LOOH e os seus valores mais elevados de  $IpA$  ao longo de toda a oxidação, não devendo ser recomendado para processos tecnológicos que envolvam altas temperaturas como a fritura de alimentos. É provável que o uso dos óleos de soja e de milho seja a melhor opção para esse tipo de aplicação.

#### *4.3 Estabilidade oxidativa dos óleos de nozes prensados a frio durante a foto-oxidação*

Todos os óleos apresentaram um aumento na formação de produtos primários ao longo do teste de foto-oxidação, porém a formação de produtos secundários foi relativamente pequena e não seguiu o padrão de comportamento esperado (Figura 3). O IP aumentou linearmente em relação ao tempo para todos os óleos de nozes ( $r > 0,97$  e  $p < 0,001$ ) a partir do intervalo entre 0 - 1 dia. Adicionalmente, os óleos de noz-pecã e de amêndoa doce apresentaram a formação de LOOH mais acelerada com base na inclinação das curvas de LOOH vs tempo.



**Figura 3.** Formação dos produtos de oxidação durante o teste de foto-oxidação (30°C) em óleos de nozes prensados a frio. Resultados como média ± desvio de triplicatas. ANOVA *two-way* seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A linha pontilhada paralela ao eixo x (.....) indica os limites aceitáveis para cada indicador. \* indica diferença significativa em relação ao óleo fresco (controle, ponto 0).

Da mesma forma, os óleos noz-pecã e de amêndoa doce exibiram a maior formação de LOOH cuja ordem decrescente de formação foi a seguinte: óleo de noz-pecã ( $\Delta = 34,3$ ) > amêndoa doce ( $\Delta = 29,1$ ) > avelã ( $\Delta = 27,6$ ) > castanha-do-Brasil ( $\Delta = 13,3$ ) > macadâmia ( $\Delta = 8,79$ ). Conseqüentemente, os óleos de noz-pecã e de amêndoa doce atingiram mais rapidamente o valor máximo de IP (15 meq O<sub>2</sub>/kg) recomendado pela legislação (Figura 3)

Conforme o esperado, foi nítida a ausência de um período de indução nos estágios iniciais da foto-oxidação dos óleos de nozes. Na via inicial de foto-oxidação, o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> interage diretamente com as duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, formando LOOH sem a presença de ROO<sup>•</sup>. Desta forma, é crescente a formação dos produtos primários da oxidação lipídica desde os estágios iniciais da foto-oxidação, causando o não aparecimento de um período de indução (Shahidi & Zong, 2009; Choe & Min, 2006).

Novamente, o comportamento de formação dos DC apresentou a mesma tendência observada para o IP, sugerindo que este indicador também determina adequadamente o grau de oxidação inicial dos óleos durante a foto-oxidação. Por outro lado, parece que a via de foto-oxidação não resultou em produtos secundários sensíveis ao reagente de *p*-anisidina, pois os valores foram relativamente baixos, apesar da elevada formação de LOOH.

Os LOOH decompõem-se em uma complexa mistura de produtos voláteis, não voláteis e poliméricos. No entanto, os fatores que influenciam na formação de cada produto ainda não são completamente conhecidos (Kamal-Eldin *et al.*, 2003). É descrito na literatura que os LOOH formados durante a foto-oxidação participam de reações de ciclização, formando um mistura de LOOH epidióxidos que por sua vez não interagem com o reagente de *p*-anisidina (Frankel, 2005). Portanto, sugere-se que o IpA não seja um indicador adequado para investigar o grau de oxidação dos óleos durante a foto-oxidação.

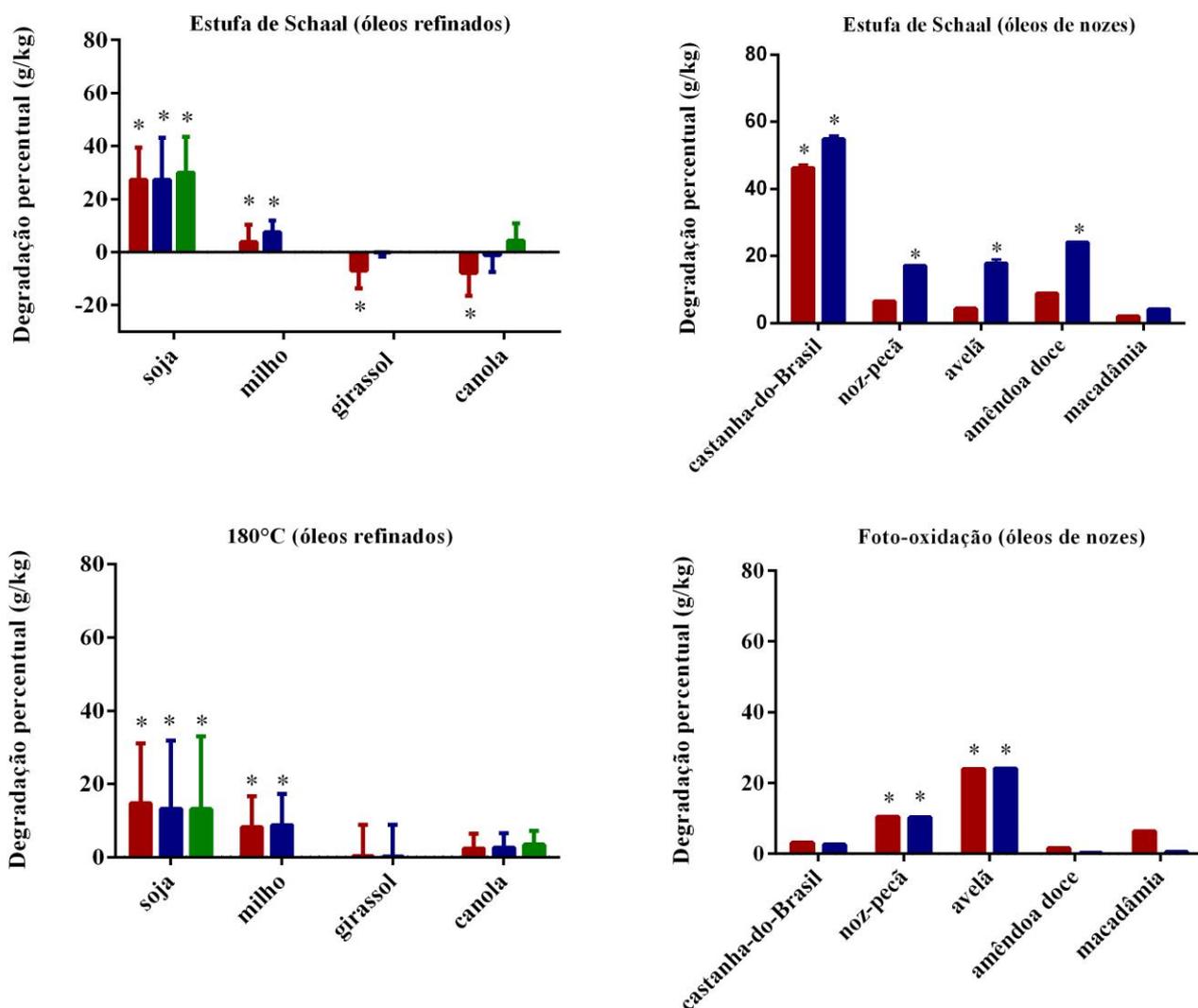
Desta forma, considerando apenas a formação dos produtos primários, observou-se que os óleos de noz-pecã e de amêndoa doce foram os mais instáveis, enquanto os óleos de macadâmia e de castanha-do-Brasil foram os mais estáveis durante o teste de foto-oxidação. Interessantemente, o óleo de noz-pecã, o mais estável durante o teste de Estufa de Schaal, foi um dos mais instáveis durante a foto-oxidação.

Os carotenoides, especialmente o  $\beta$ -caroteno, são os principais antioxidantes a prevenir a reação de foto-oxidação nos óleos vegetais devido a sua capacidade de bloquear a ação de  $^1\text{O}_2$  (Chayasit *et al.*, 2007). Deste modo, é possível que o óleo de noz-pecã apresente quantidades reduzidas de  $\beta$ -caroteno quando comparado aos demais óleos de nozes, fato que pode contribuir para a menor estabilidade deste óleo na presença da luz, porém este constituinte não foi investigado no presente estudo.

#### *4.4 Comportamento da composição química durante os testes de oxidação acelerada*

##### *4.4.1 Ácidos graxos*

O comportamento de degradação dos principais ácidos graxos oxidáveis foi investigado no presente estudo, contudo avaliou-se o comportamento do 18:3 $n$ -3 apenas para os óleos cujo conteúdo foi maior do que 1g/100 g. Neste sentido, o 18:1 $n$ -9, o 18:2 $n$ -6 e o 18:3 $n$ -3 degradaram-se significativamente ao longo dos três testes de oxidação acelerada para a maioria dos óleos vegetais. Contudo, os óleos de girassol, de canola e de macadâmia não apresentaram perda significativa para nenhum ácido graxo oxidável ao longo das condições de oxidação acelerada (Figura 4).



**Figura 4.** Degradação dos principais ácidos graxos oxidáveis nos óleos vegetais refinados de soja, milho, girassol e canola e nos óleos de nozes prensados a frio. Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão de três marcas para os óleos refinados e de uma marca para os óleos de nozes. ANOVA *two-way* seguida do pós-teste de Tukey ( $<0,05$ ). \* indica diferença significativa em relação ao óleo fresco (controle, ponto 0). ■ 18:1n-9; ■ 18:2n-6; ■ 18:3n-3.

Durante o teste de Estufa de Schaal, os óleos de castanha-do-Brasil e de soja apresentaram a maior degradação do 18:1*n*-9, 18:2*n*-6 e 18:3*n*-3 (no caso do óleo de soja). Por outro lado, os óleos de noz-pecã, de avelã e de amêndoa doce apresentaram redução apenas no conteúdo de 18:2*n*-6. Ao contrário do esperado, os óleos de girassol e de canola apresentaram uma aumento no conteúdo de 18:1*n*-9 ao final da oxidação a 65°C. É possível que produtos de oxidação, tais como os epóxidos, coeluem com o 18:1*n*-9, prejudicando a quantificação deste ácido graxo (Shantha, 1992). Desta forma, estes resultados não foram utilizados para as análises estatísticas posteriores.

Observou-se que 18:2*n*-6 foi o ácido graxo mais suscetível à degradação durante o teste de Estufa de Schaal para os óleos de nozes prensados a frio, enquanto a taxa de degradação entre o 18:1*n*-9 e 18:2*n*-6 não apresentou diferença significativa para os óleos refinados de soja e de milho. Da mesma forma, não houve diferença significativa entre a taxa de degradação do 18:3*n*-3 e os demais ácidos graxos no óleo de soja.

A taxa de oxidação relativa entre os ácidos graxos aumenta de acordo com o número de insaturações na estrutura dos mesmos, sendo bem estabelecido que os AGPI (18:3*n*-3 e 18:2*n*-6) oxidam mais rapidamente do que os AGMI (18:1*n*-9). No entanto, além do grau de instauração dos ácidos graxos, a posição dos mesmos no esqueleto de glicerol dos triacilgliceróis também afeta na sua oxidação em baixas temperaturas (60°C; Kamal-Eldin, 2006).

Demonstra-se que a proximidade do 18:2*n*-6 e 18:3*n*-3 na estrutura do triacilglicerol, facilita que o ROO<sup>•</sup>, formado a partir da oxidação de um destes ácidos graxos, abstraia elétrons do outro ácido graxo insaturado com maior facilidade, contribuindo para a maior degradação do 18:2*n*-6 e 18:3*n*-3. Contudo, quando existe um ácido graxo saturado entre o 18:2*n*-6 e 18:3*n*-3, a propagação da reação em cadeia torna-se mais difícil, diminuindo a

importância do grau de instauração para a degradação dos ácidos graxos (Hoshina *et al.*, 2004). Portanto, é possível que a posição dos ácidos graxos nos triacilgliceróis tenha influenciado a taxa de degradação destas estruturas nos óleos de soja e de milho a 65°C.

Similarmente, parece que o grau de insaturações dos ácidos graxos também não foi o único fator a influenciar a degradação destes compostos durante os testes de oxidação a 180°C e de foto-oxidação, tendo em vista que não houve diferença significativa entre as taxas de oxidação do 18:1 $n$ -9 e do 18:2 $n$ -6, no mesmo tipo de óleo e em ambos os testes de oxidação. Este fato também foi observado em relação ao 18:3 $n$ -3 no óleo de soja oxidado a 180°C.

Sabe-se que a cada 10°C de aumento de temperatura, a velocidade das reações químicas tende a duplicar ou triplicar, indicando um maior efeito da temperatura elevada para a taxa de oxidação dos ácidos graxos do que o grau de instauração entre eles. Além disso, a velocidade de oxidação dos ácidos graxos pelo  $^1\text{O}_2$  é extremamente mais rápida do que a do  $^3\text{O}_2$ , logo, sugere-se que o tipo de ácido graxo insaturado tem pouco efeito para a via de foto-oxidação (Kamal-Eldin, 2006; Choe & Min, 2006).

Portanto, observa-se que a degradação dos ácidos graxos nos óleos vegetais pode relacionar-se com o tipo de via inicial da oxidação, com o grau de insaturações dos ácidos graxos, assim como com a posição destes na estrutura do triacilglicerol. Neste contexto, os óleos de soja, milho, avelã e noz-pecã foram os mais suscetíveis à redução da sua qualidade nutricional ao longo das diferentes condições de oxidação acelerada.

#### 4.4.2 Tocoferóis

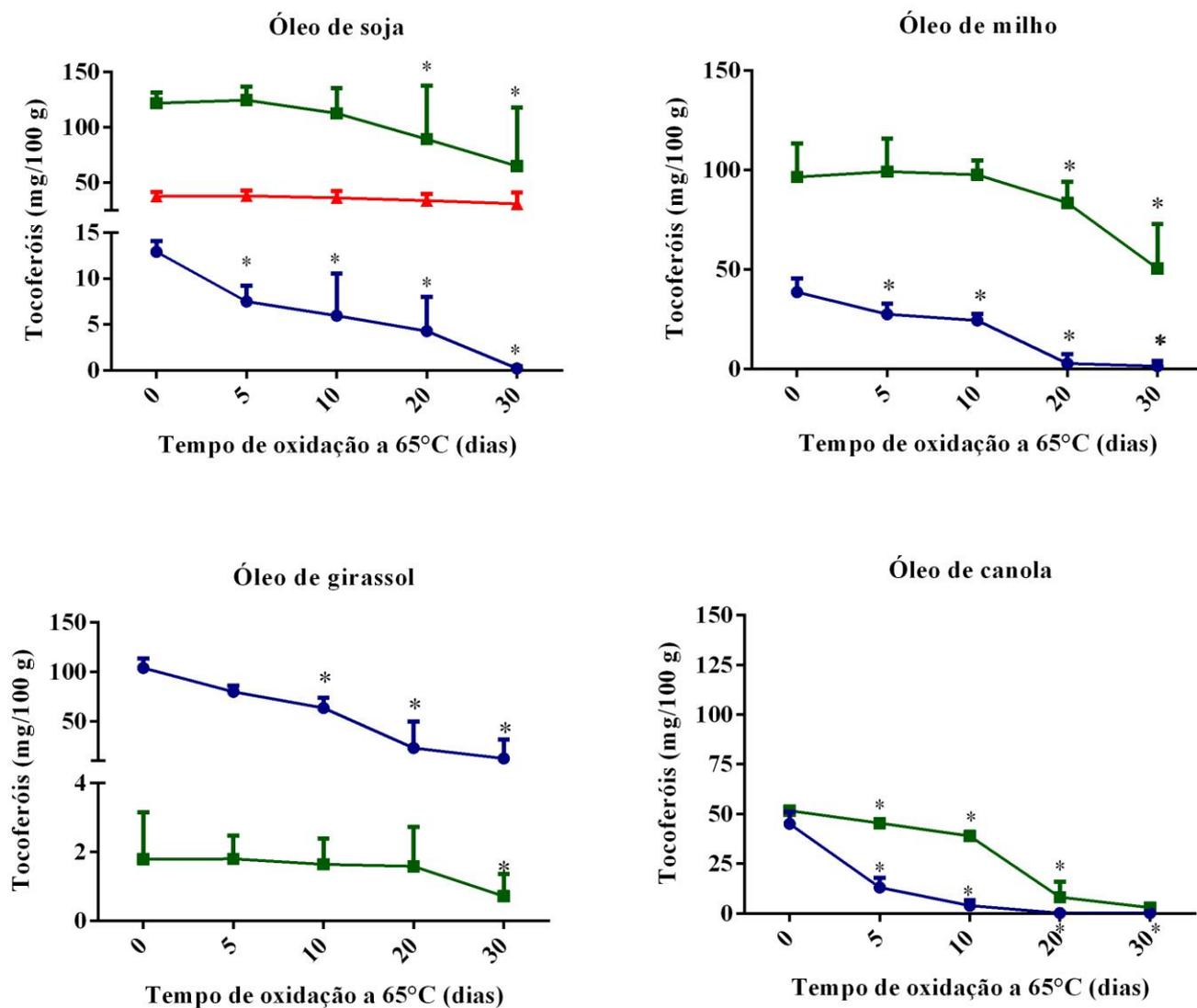
O  $\alpha$ - e o  $\gamma$ -tocoferol degradaram-se ao longo de todas as condições de oxidação, sendo que  $\alpha$ -tocoferol foi mais instável em todos os óleos vegetais que continham ambos os tocóis em sua constituição. Por outro lado, o  $\delta$ -tocoferol, presente em teores relevantes apenas no

óleo de soja, manteve-se inalterado em todos os testes de oxidação acelerada nos quais este óleo foi submetido.

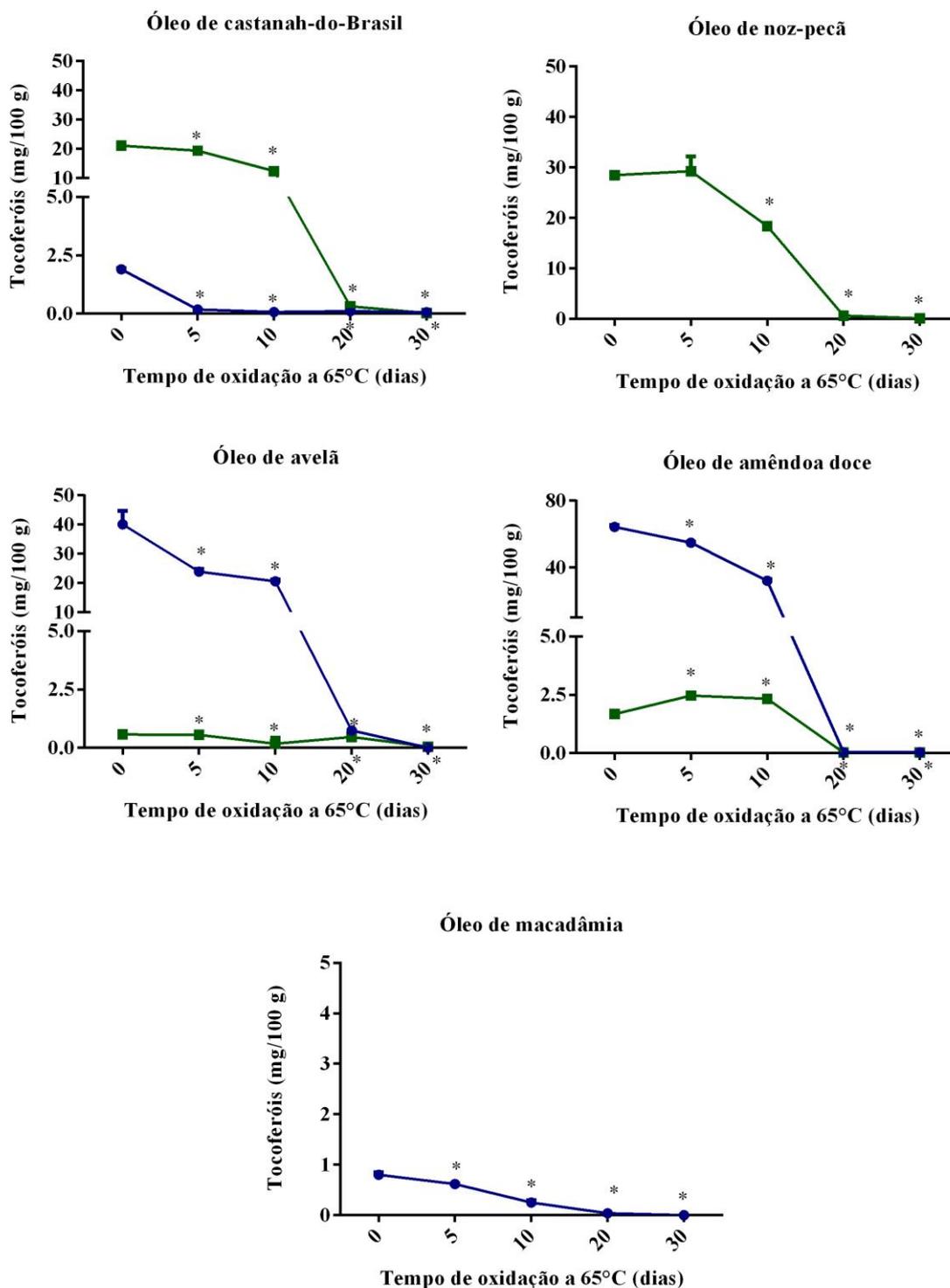
Durante o teste de Estufa de Schaal, a degradação do  $\alpha$ -tocoferol iniciou-se nos estágios iniciais de oxidação (0 - 5 dias) para todos os óleos vegetais oxidados nesta condição, exceto para o óleo de girassol, onde foi mais estável. Contudo, ao final de 30 dias de oxidação, todos os óleos apresentaram uma redução > 94% em relação aos teores iniciais deste tocol (Figura 5 e 6).

Em contrapartida, o comportamento de degradação do  $\gamma$ -tocoferol foi diferente entre os tipos de óleos, sendo mais instável nos óleos de nozes e de canola. Neste contexto, os óleos de nozes e de canola apresentaram uma redução significativa nos teores de  $\gamma$ -tocoferol a partir do intervalo entre 0 - 5 dias, atingido perdas > 90 % após 20 dias de oxidação. Contudo, os óleos de soja, de milho e de girassol apresentaram redução significativa no conteúdo de  $\gamma$ -tocoferol apenas entre 10 - 30 dias, onde mais de 40% deste tocol permaneceu nos óleos ao final do período de oxidação (Figura 5 e 6). Portanto, é provável que estes óleos apresentem algum constituinte capaz de inibir a degradação do  $\gamma$ -tocoferol durante a oxidação.

Paralelamente, observou-se que em todos os óleos, o  $\gamma$ -tocoferol apresentou uma fase estacionária (fase *lag*), seguida de uma perda acelerada que ocorreu somente após a perda acelerada do  $\alpha$ -tocoferol nos estágios iniciais da oxidação. Deste modo, sugere-se que exista um mecanismo de proteção e ou regeneração entre o  $\alpha$ - e o  $\gamma$ -tocoferol. De fato, no óleo de noz-pecã, cuja contribuição inicial do  $\alpha$ -tocoferol foi menor do que 1%, o  $\gamma$ -tocoferol degradou-se intensamente no intervalo entre 5 - 20 dias.



**Figura 5.** Degradação dos tocoferóis durante teste de Estufa de Schaal em óleos refinados de soja, milho, girassol e canola. Resultados apresentados como média e desvio padrão de três marcas para cada tipo de óleo. ANOVA *two-way* seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \* indica diferença significativa do óleo fresco (controle; tempo 0). ●:  $\alpha$ -tocoferol; ■:  $\gamma$ -tocoferol; ▲:  $\delta$ -tocoferol.

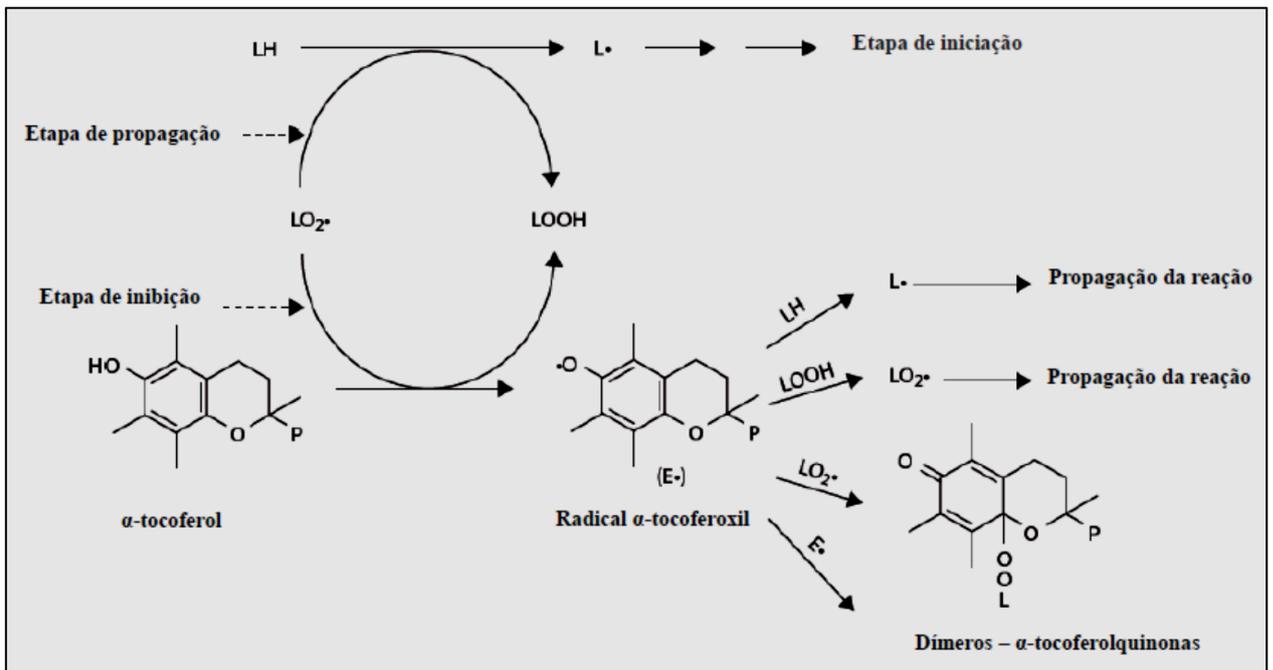


**Figura 6.** Degradação dos tocoferóis durante teste de Estufa de Schaal em óleos de nozes prensados a frio. Resultados apresentados como média e desvio padrão de três marcas para cada tipo de óleo. ANOVA *two-way* seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \* indica diferença significativa do óleo fresco (controle; tempo 0). ●:  $\alpha$ -tocoferol; ■:  $\gamma$ -tocoferol; ▲:  $\delta$ -tocoferol.

Kim *et al.* (2008) acompanharam o comportamento dos tocoferóis em óleos de soja, uva e azeite de oliva durante oxidação em Estufa de Schaal por 120 dias. Estes autores também observaram uma maior degradação do  $\alpha$ -tocoferol no período inicial da oxidação, seguida de uma degradação mais intensa do  $\gamma$ -tocoferol após 20 dias de oxidação. Além disso, não houve alteração no conteúdo de  $\delta$ -tocoferol no óleo de soja, concordando com os resultados do presente estudo.

Os nossos resultados também estão de acordo com a ordem de estabilidade sugerida pela literatura, onde o  $\delta$ -tocoferol apresenta maior estabilidade do que o  $\gamma$ -tocoferol que por sua vez é mais estável do que o  $\alpha$ -tocoferol (Seppanen *et al.*, 2010; Chayasit *et al.*, 2007). A estabilidade dos tocoferóis está relacionada inversamente com a sua capacidade em doar H aos radicais livres formados durante a oxidação lipídica, logo com a atividade antioxidante dos tocóis (Kulás & Ackman, 2001). Portanto, é possível que o  $\alpha$ -tocoferol apresente ação antioxidante anterior aos demais tocóis durante oxidação a 65°C, tendo em vista a sua rápida degradação nos estágios iniciais de oxidação nos óleos investigados.

Contudo, devido a maior reatividade do  $\alpha$ -tocoferol com os ROO<sup>•</sup>, existe uma elevada formação de radicais  $\alpha$ -tocoferoxil (TO<sup>•</sup>) os quais podem exercer atividade pró-oxidante durante a oxidação lipídica dos óleos. Estes radicais podem interagir entre si, produzindo tocoferolquinonas, ou com outros radicais livres e substratos lipídicos, propagando a reação em cadeia (Figura 7; Niki & Traber, 2012). Desta forma, a atividade pró-oxidante do  $\alpha$ -tocoferol relaciona-se com a quantidade de radicais formados. Neste contexto, alguns estudos reportam que o  $\alpha$ -tocoferol em concentrações acima de 700 ppm é capazes de agir como pró-oxidante (Seppanen *et al.*, 2010). Portanto, também é importante considerar este efeito pró-oxidante para interpretar o papel da degradação do  $\alpha$ -tocoferol para a estabilidade oxidativa dos óleos.

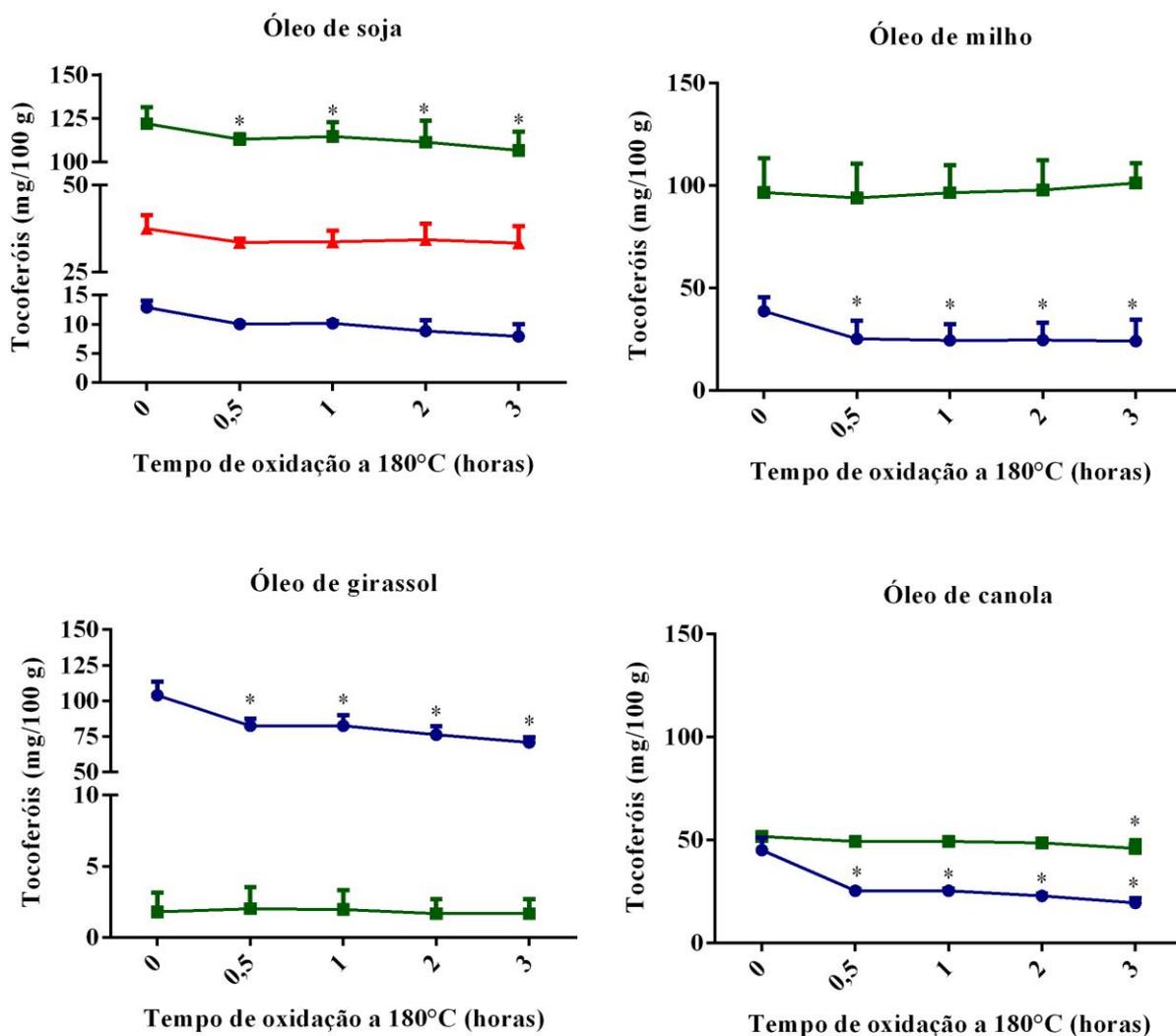


**Figura 7.** Formação do radical  $\alpha$ -tocoferoxil após a degradação do  $\alpha$ -tocoferol e suas possíveis reações com os substratos lipídicos e radicais livres. LH – substrato lipídico; LOOH – hidroperóxido; L• - radical alquila; LO• - radical alcóxila (Adaptado de Niki & Traber, 2012).

Da mesma forma, o  $\alpha$ -tocoferol apresentou a maior degradação durante os testes de oxidação a 180°C e de foto-oxidação dos óleos refinados e de nozes, respectivamente. Entretanto, especialmente a 180°C, a perda do  $\alpha$ - e do  $\gamma$ -tocoferóis não ultrapassou 40% ao final do tempo de oxidação, sugerindo uma maior estabilidade dos tocóis em elevadas temperaturas.

Durante oxidação a 180°C, os óleos de milho, de girassol e de canola apresentaram uma redução significativa nos teores de  $\alpha$ -tocoferol, enquanto apenas o óleo de soja apresentou redução no conteúdo de  $\gamma$ -tocoferol. Assim como foi observado durante o teste de Estufa de Schaal, não houve redução significativa do  $\delta$ -tocoferol durante a oxidação a 180°C, demonstrando uma maior estabilidade deste tocoferol em relação aos outros (Figura 8). Bruscatto *et al.* (2009) investigaram o comportamento dos tocoferóis em óleo de arroz

submetido a oxidação a 180°C por 18 dias e observaram que a perdas acentuadas do  $\alpha$ - e do  $\gamma$ -tocoferóis ocorreram apenas após 6 dias de oxidação. Semelhante aos nossos resultados, estes autores também observaram uma maior degradação do  $\alpha$ -tocoferol quando comparado ao  $\gamma$ -tocoferol

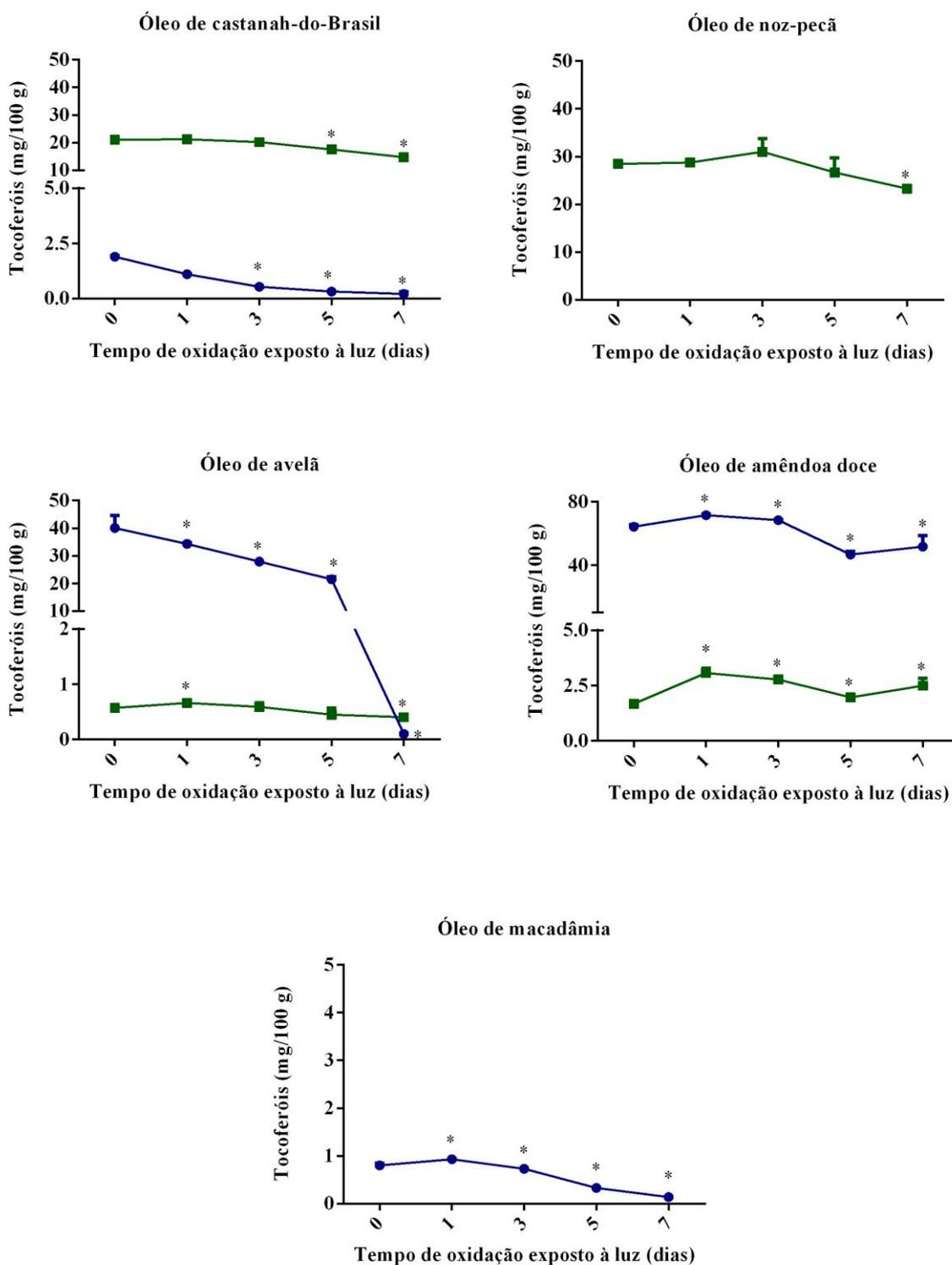


**Figura 8.** Degradação dos tocoferóis durante teste de oxidação a 180°C em óleos refinados de soja, milho, girassol e canola. Resultados apresentados como média e desvio padrão de três marcas para cada tipo de óleo. ANOVA *two-way* seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \* indica diferença significativa em relação ao óleo fresco (controle; tempo 0). ●:  $\alpha$ -tocoferol; ■:  $\gamma$ -tocoferol; ▲:  $\delta$ -tocoferol.

No mecanismo de oxidação a temperaturas elevadas existe uma menor solubilidade do oxigênio nos óleos vegetais, resultando em uma pequena formação de ROO<sup>•</sup> (Frankel, 2005; Dana & Saguy, 2001). Portanto, é possível que os tocoferóis degradem-se mais lentamente nos óleos oxidados a 180°C devido à concentração reduzida de ROO<sup>•</sup> nessas condições.

Em relação à foto-oxidação, o óleo de avelã apresentou a maior degradação de  $\alpha$ -tocoferol (99,7%), seguido dos óleos de castanha-do-Brasil (89,1%) e de macadâmia (82,4%). O óleo de castanha-do-Brasil também apresentou a maior degradação de  $\gamma$ -tocoferol (30,2%). Neste contexto, o óleo de avelã destacou-se devido à acentuada degradação do  $\alpha$ -tocoferol, entre 5-7 dias. (Figura 9). Entretanto, os demais óleos apresentaram uma marcante fase estacionária para o  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferóis, demonstrando uma degradação gradual destes tocóis.

Conforme descrito na literatura, durante a foto-oxidação também não ocorre a formação de ROO<sup>•</sup> nos estágios iniciais da oxidação (Zhong & Shahidi, 2009), justificando a perda menos acelerada dos tocoferóis nestas condições. Frankel (2005) reporta que os tocoferóis, embora classificados como antioxidantes primários, também são capazes de bloquear o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> por meio do mecanismo antioxidante de transferência de elétrons. A reação dos antioxidantes com os radicais livres por este mecanismo ocorre de forma mais lenta quando comparada ao mecanismo de transferência de H, necessitando de um tempo maior para que a reação se complete (Prior *et al.*, 2005). Portanto, este mecanismo também pode contribuir para uma degradação menos acelerada dos tocóis durante a foto-oxidação dos óleos de nozes.



**Figura 9.** Degradação dos tocoferóis durante teste de foto-oxidação de óleo de nozes prensados a frio. Resultados apresentados como média e desvio padrão de triplicatas. ANOVA *two-way* seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \* indica diferença significativa do óleo fresco (controle; tempo 0). ●:  $\alpha$ -tocoferol; ■:  $\gamma$ -tocoferol; ▲:  $\delta$ -tocoferol.

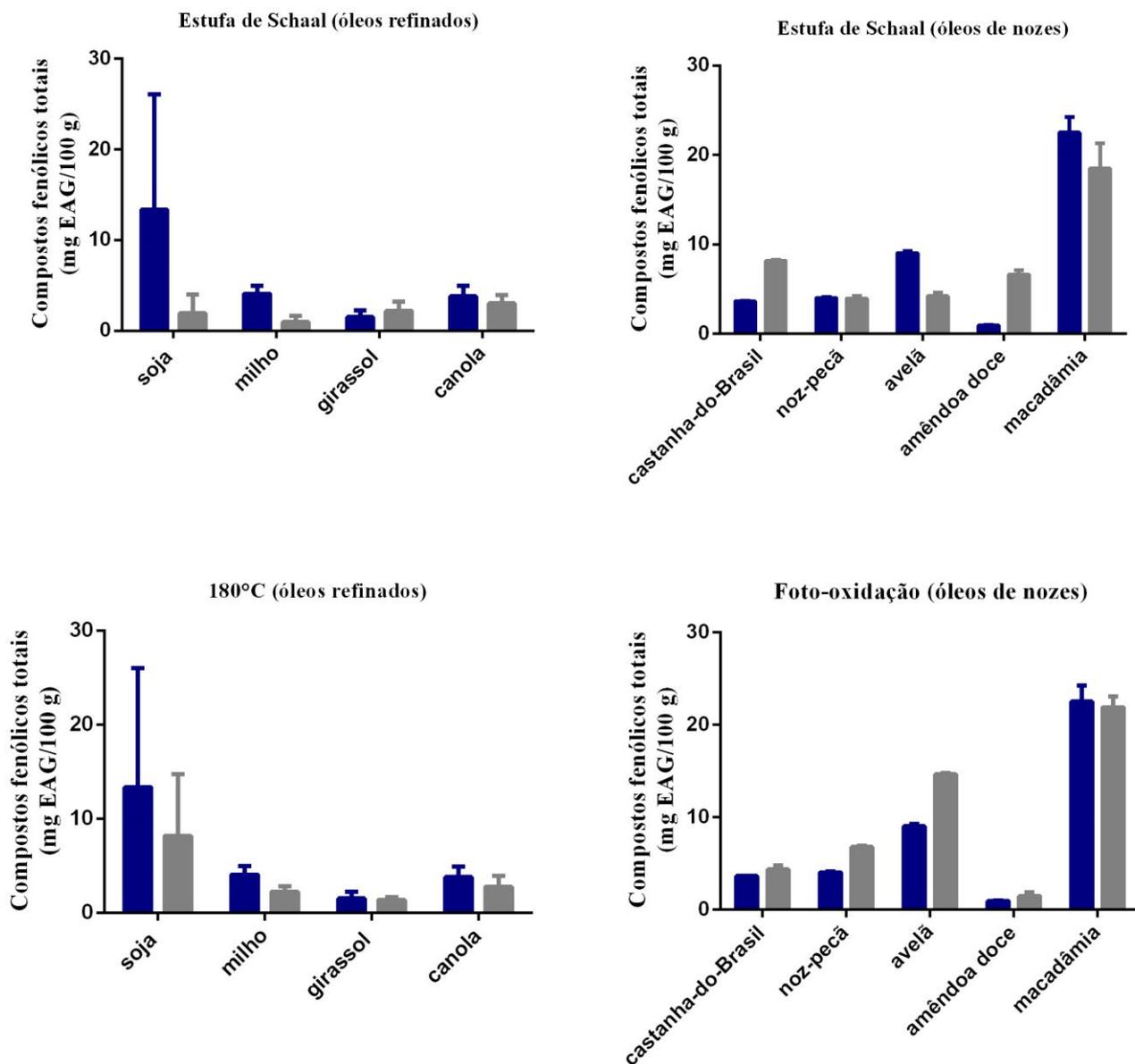
Portanto, a partir do comportamento observado ao longo dos testes de oxidação acelerada, observou-se que o  $\alpha$ -tocoferol foi o tocol mais instável, independentemente da condição de oxidação. Contudo, a intensidade de degradação deste tocol, bem como do  $\gamma$ -tocoferol, possivelmente, foi influenciada pela via inicial de oxidação as quais os óleos foram submetidos.

#### 4.4.3 Compostos fenólicos totais

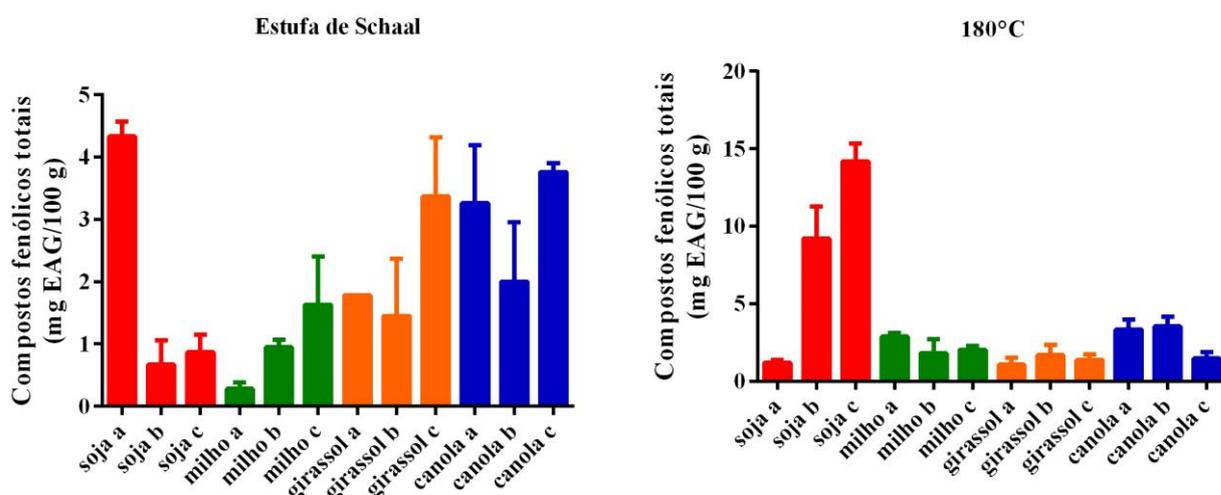
Os teores de compostos fenólicos totais ao final das diferentes condições de oxidação estão apresentados na Figura 10. Todos os resultados apresentaram coeficiente de variação acima de 10%, especialmente no caso dos óleos de soja, milho, girassol e canola (Figura 11). Além disso, ao contrário do esperado, houve um aumento significativo ( $P < 0,001$ ) nos teores de compostos fenólicos totais para os óleos de nozes.

A análise dos compostos fenólicos totais pelo método espectrofotométrico de *Folin-Ciocalteu* é uma alternativa simples que tem gerado dados comparáveis em diferentes estudos. No entanto, embora este método correlacione-se fortemente com os teores de compostos fenólicos das amostras, ele não é específico para estes compostos (Singleton *et al.*, 1999). Neste sentido, o método de reagente de *Folin-Ciocalteu* determina a concentração de qualquer composto capaz de reduzir o molibidênio, elemento constituinte do reagente de *Folin-Ciocalteu* que forma complexos azulados com agentes redutores (Prior *et al.*, 2005). Assim sendo, alguns interferentes, tais como a presença de proteínas e açúcares redutores, contribuem para a superestimação do teor de compostos fenólicos em vinhos, maçãs e feijões (Escarpa & González, 2001). Portanto, é provável que os diferentes produtos formados durante a oxidação dos óleos também sejam capazes de interagir com o reagente de *Folin-Ciocalteu*. Desta forma, sugere-se a determinação espectrofotométrica dos compostos

fenólicos totais não é um método analítico adequado para acompanhar a degradação dos compostos fenólicos durante a oxidação lipídica.



**Figura 10.** Teor de compostos fenólicos totais após oxidação dos óleos refinados de soja, milho, girassol e canola e dos óleos de nozes prensados a frio em diferentes condições. ■ controle; ■ ponto final da oxidação.

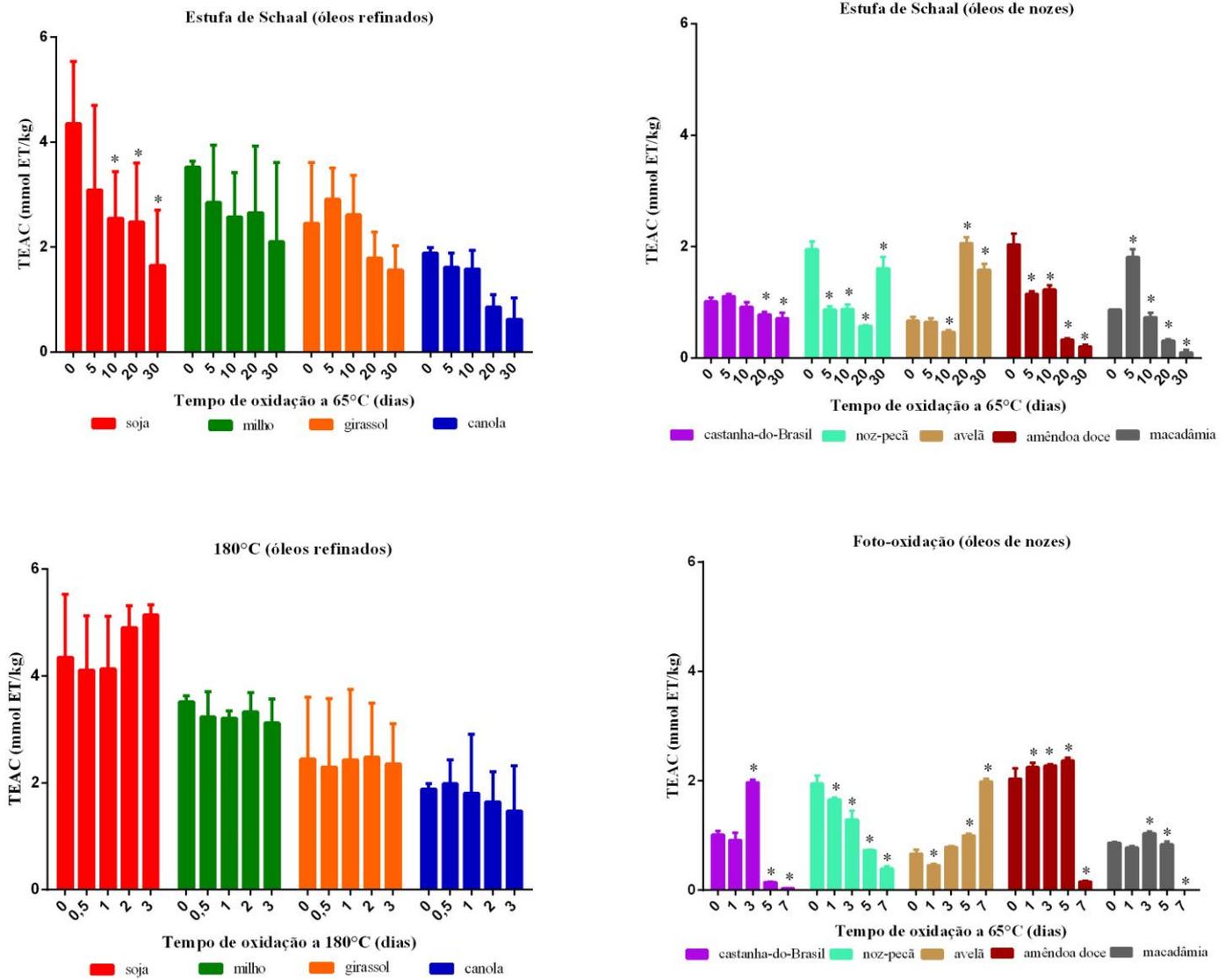


**Figura 11.** Teor de compostos fenólicos totais após oxidação em Estufa de Schaal e em 180°C nas diferentes marcas dos óleos refinados de soja, milho, girassol e canola.

#### 4.5 Transformações da capacidade antioxidante total

As alterações no comportamento da CAT dos óleos vegetais durante os testes de oxidação acelerada estão apresentadas na Figura 12. Não se observou alterações significativas da CAT nos óleos vegetais oxidados em Estufa de Schaal (exceto para o óleo de soja) e a 180°C. Em ambos os testes, houve diferença significativa quanto ao comportamento da CAT nas diferentes marcas de um mesmo tipo de óleos refinado ( $p < 0,001$ ), fato que contribuiu para a não alteração da CAT quando as três marcas são consideradas conjuntamente.

Entretanto, apesar da ausência de diferenças estatísticas, observou-se que os óleos refinados oxidados em Estufa de Schaal apresentaram uma tendência à redução da CAT ao longo da oxidação. Da mesma forma, o óleo de soja oxidado a 180°C apresentou uma tendência de aumento da CAT no intervalo entre 1 - 3 h (Figuras 12).



**Figura 12.** Alterações da capacidade antioxidante total dos óleos refinados de soja, milho, girassol e canola e dos óleos de nozes prensados a frio ao longo de diferentes testes de oxidação lipídica. ANOVA *two-way* seguida do pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). \* indica diferença significativa do óleo fresco (controle; tempo 0).

Em relação aos óleos de nozes prensados a frio, somente os óleos de castanha-do-Brasil e amêndoa doce oxidados em Estufa de Schaal e o óleo de noz-pecã foto-oxidado apresentaram uma redução significativa ao longo do tempo de oxidação, conforme o esperado.

De acordo com os dados descritos no Capítulo 1, o  $\gamma$ -tocoferol foi o principal determinante da CAT dos óleos frescos. Portanto, era plausível esperar que a CAT reduzisse ao longo dos testes de oxidação considerando a degradação do  $\gamma$ -tocoferol. Entretanto, os óleos de macadâmia, avelã e noz-pecã apresentaram um aumento da CAT entre 0 - 5 dias, 10 - 20 dias e 20 - 30 dias respectivamente, durante o teste de Estufa de Schaal. Da mesma forma, os óleos de castanha-do-Brasil, avelã, amêndoa doce e macadâmia apresentaram um aumento da CAT entre 0 - 3 dias durante o teste de foto-oxidação (Figura 12).

Nogala-Kalucka *et al.* (2005) observaram um aumento da CAT, determinada pelo ensaio de DPPH, após a oxidação a 110°C de triacilgliceróis isolados de óleo de canola. Igualmente, Lee *et al.* (2007), após oxidação dos óleos de soja e de canola a 180°C por 8 horas, também observaram um aumento da CAT pelo ensaio de DPPH. Desta forma, estes autores sugeriram que os radicais livres resultantes da oxidação das amostras podem bloquear o radical DPPH utilizado para monitorar a CAT das amostras neste ensaio.

Recentemente, Jeong *et al.* (2013) avaliaram o comportamento da CAT em sistema lipídico de metil-linoleato oxidado a 93°C. Estes autores observaram que a redução na absorvância do radical DPPH ao final da oxidação, indicativo de aumento da CAT, esteve fortemente correlacionado com os aldeídos voláteis propanal ( $r = -0,80$ ), pentanal ( $r = -0,82$ ), hexanal ( $r = -0,70$ ) e *t*-2-heptanal ( $r = -0,85$ ), sugerindo que compostos carbonílicos, resultantes da oxidação lipídica, também são capazes de estabilizar o radical DPPH.

Adicionalmente, em estudo prévio realizado pelos mesmos autores, não houve correlação entre o aumento da CAT e a formação de LOOH (Jeong *et al.*, 2012).

Portanto, a partir dos resultados observados no presente estudo, especialmente em quanto ao comportamento da CAT nos óleos de nozes, é possível que o radical ABTS utilizado no ensaio de TEAC, seja capaz de interagir com os produtos secundários, resultando em um aumento da CAT após a oxidação. Desta forma, é possível a CAT dos óleos oxidados correspondam à ação integrada dos compostos antioxidantes bem como dos produtos de oxidação.

#### *4.6 Influência das transformações da composição química para a variação dos produtos da oxidação lipídica e da capacidade antioxidante total.*

A influência das transformações ocorridas na composição química quanto aos tocoferóis e os ácidos graxos durante os testes de oxidação acelerada sobre a formação dos produtos primários e secundários da oxidação bem como para a variação da CAT foi investigada por Análise de Correlações Canônicas (ACC). ACC é uma ferramenta estatística que permite investigar a influência de um grupo de variáveis em relação a outro grupo de variáveis pela combinação linear de cada conjunto tal que a correlação entre os dois grupos seja maximizada (Hair *et al.*, 1998)

Uma das premissas para incluir uma variável na ACC é verificar a sua linearidade assim como a sua colinearidade. Desta forma, as variáveis utilizadas na ACC foram pré-selecionadas por meio de Correlações Parciais as quais avaliam a relações entre as variáveis, eliminando o efeito de colinearidade. Além disso, os resultados obtidos em cada teste de oxidação acelerada foram considerados conjuntamente para a obtenção de uma visão mais abrangente sobre o comportamento dos óleos durante a oxidação lipídica.

Neste contexto, observou-se uma correlação positiva entre as variáveis  $\Delta$  aumento IP e  $\Delta$  formação DC ( $r = 0,90$ ;  $p < 0,0001$ ),  $\Delta$  degradação  $\alpha$ -tocoferol e  $\Delta$  formação DC ( $r = 0,43$ ;  $p = 0,01$ ),  $\Delta$  degradação  $\gamma$ -tocoferol e  $\Delta$  comportamento CAT ( $r = 0,46$ ;  $p = 0,01$ ),  $\Delta$  aumento IpA e o  $\Delta$  comportamento CAT ( $r = 0,40$ ;  $p = 0,02$ ). Por outro lado, observou-se uma correlação negativa entre as variáveis  $\Delta$  degradação  $\alpha$ -tocoferol e o  $\Delta$  aumento IP ( $r = 0,58$ ;  $p < 0,0001$ ).

Essas correlações demonstram que tanto o IP quanto os DC podem ser utilizados como indicadores da formação de produtos primários nas diferentes condições de oxidação testadas. Além disso, são consistentes com a hipótese de que o comportamento da CAT durante a oxidação dos óleos é influenciada pela presença dos produtos secundários carbonílicos assim como pela degradação do  $\gamma$ -tocoferol. Da mesma forma, estas correlações demonstram que a degradação do  $\alpha$ -tocoferol contribui para a estabilidade oxidativa óleos vegetais. Entretanto, não houve nenhuma correlação com o comportamento dos principais ácidos graxos oxidáveis, sugerindo um papel mais importante dos tocoferóis para a manutenção da qualidade dos óleos vegetais.

Portanto realizou-se a ACC entre as variáveis  $\Delta$  de degradação do  $\alpha$ - e  $\gamma$ -tocoferol (variável canônica 1) e o  $\Delta$  de aumento do IP, DC e IpA (variável canônica 2). Desta forma, observou-se correlação canônica significativa para dois pares de correlação canônica, indicando que os grupos considerados não são independentes. Contudo, observou-se que as associações intergrupos são estabelecidas, principalmente pelo 1º par que explicou 49,8% da variação do comportamento dos óleos durante as condições aceleradas de oxidação (Tabela 1).

A partir das relações obtidas no 1º par de correlação canônica, observa-se que a degradação do  $\alpha$ -tocoferol foi o principal determinante para a estabilidade oxidativa dos

óleos. Neste contexto, a maior degradação de  $\alpha$ -tocoferol contribuiu para o menor aumento de IP e para a maior formação de DC durante a oxidação lipídica, independente da via de iniciação. Por outro lado, degradação de  $\alpha$ -tocoferol contribuiu pouco para a formação dos produtos secundários bem como para a variação da CAT.

Em relação ao 2º par de correlação canônica, que explicou 25,1% da variação do comportamento dos óleos, observou-se que o  $\gamma$ -tocoferol foi o principal determinante desta variação, relacionando-se com a variação da CAT e com o comportamento dos produtos primários e secundários da oxidação. Sendo assim, a menor degradação do  $\gamma$ -tocoferol contribuiu para o menor aumento do IP e para o maior aumento da *Ipa*. Da mesma forma, a menor perda do  $\gamma$ -tocoferol durante a oxidação contribuiu para a menor variação da CAT.

**Tabela 1.** Correlações canônicas e pares canônicos estimados entre o comportamento da composição química e a formação de produtos de oxidação em óleos vegetais refinados de soja, milho, girassol e canola e de óleos de nozes prensados a frio submetidos a diferentes condições de oxidação acelerada.

	Pares Canônicos	
	1º par	2º par
<b>Grupo 1</b>		
$\Delta$ IP (formação) <sup>a</sup>	-2,2364	-0,8149
$\Delta$ DC (formação)	1,4793	0,1618
$\Delta$ IpA (formação)	0,1080	0,8563
$\Delta$ CAT <sup>b</sup>	0,076	-0,9732
<b>Grupo 2</b>		
$\Delta$ $\alpha$ -tocoferol (degradação) <sup>c</sup>	1,007	0,1141
$\Delta$ $\gamma$ -tocoferol (degradação)	0,2789	-0,9747
R	0,7058	0,5012
$\alpha$	1%	5%

<sup>a</sup> Δ de formação (valor máximo da variável – valor da variável no ponto 0); <sup>b</sup> Δ CAT (valor final – valor inicial); <sup>c</sup> Δ de degradação dos tocoferóis (valor da variável do último ponto de oxidação – valor da variável no ponto 0).

Portanto, os resultados indicam que o  $\alpha$ -tocoferol foi o mais eficaz em proteger os óleos vegetais contra a oxidação lipídica, com base na sua influência para a formação de LOOH. Contudo, estes resultados também podem indicar que a degradação de  $\alpha$ -tocoferol apresentou um efeito pró-oxidante em relação à formação de dienos conjugados.

No entanto, é possível que essa relação não seja indício de ação pró-oxidante, mas apenas a consequente formação de um intermediário conjugado da oxidação lipídica, após reação de radical conjugado com o tocoferol. Essa hipótese necessita futuras investigações para sua melhor compreensão e confirmação. Em contrapartida, o  $\gamma$ -tocoferol foi um importante indicador da CAT dos óleos vegetais e das possíveis alterações sensoriais dos óleos, tendo em vista a sua influência para a formação dos produtos secundários da oxidação lipídica.

Embora a CAT não seja um adequado indicador de bioatividade, a partir dos resultados observados no presente estudo, supõe-se que a CAT dos óleos pode ser considerada um indicador de preservação do  $\gamma$ -tocoferol e, portanto, do seu conteúdo em óleos vegetais. A bioatividade do  $\alpha$ -tocoferol ainda é a mais estudada, contudo, há fortes evidências de que o  $\gamma$ -tocoferol atua na quimioprevenção do câncer (Niki & Traber, 2012; Saldeen & Saldeen, 2005; Jiang *et al.*, 2001). A elevada estabilidade oxidativa do  $\gamma$ -tocoferol em todas as condições de oxidação dos óleos vegetais sugere que seja o tocol mais estável durante o armazenamento de óleos vegetais e no seu uso no preparo de alimentos. Desta forma, possivelmente, o  $\gamma$ -tocoferol é altamente consumido pela população em geral, necessitando de maior atenção quanto ao estudo do seu papel bioativo no metabolismo humano.

## 5. Conclusão

No presente estudo, a estabilidade oxidativa dos óleos vegetais refinados de soja, milho, girassol e canola e dos óleos de nozes prensados a frio foi investigada por meio de três testes de oxidação acelerada que corresponderam as principais vias de iniciação da oxidação lipídica nos óleos vegetais: auto-oxidação (Estufa de Schaal), termo-oxidação (180°C) e foto-oxidação. Os produtos primários mostraram-se bons indicadores do grau oxidativo dos óleos durante as vias de auto-oxidação e foto-oxidação, enquanto os produtos secundários mostraram-se bons indicadores do grau oxidativo dos óleos durante a termo-oxidação. Os óleos de girassol e de amêndoa doce destacaram-se negativamente devido a sua baixa estabilidade oxidativa em todos os testes de oxidação acelerada aos quais foram submetidos, enquanto o óleo de macadâmia destacou-se positivamente pela sua alta estabilidade oxidativa.

O comportamento dos ácidos graxos e dos tocoferóis variou de acordo com a via inicial de oxidação, contudo o  $\alpha$ -tocoferol foi o tocol mais instável, independente do processo oxidativo. Por fim, a aplicação de correlações canônicas demonstrou que o comportamento do  $\alpha$ - e do  $\gamma$ -tocoferol apresentam contribuições diferentes para a qualidade global dos óleos vegetais, evidenciando a relevância do  $\alpha$ -tocoferol para a estabilidade oxidativa e do  $\gamma$ -tocoferol para a CAT dos óleos vegetais.

## **Capítulo 3**

*Capacidade antioxidante total como uma nova ferramenta no controle de  
qualidade de óleos vegetais*

## 1. Introdução

Nas últimas décadas, o interesse pelos compostos antioxidantes dos alimentos foi crescente, especialmente devido aos seus efeitos positivos na redução do risco de diferentes doenças crônico-degenerativas, tais como o câncer e as doenças cardiovasculares (Kris-Etherton *et al.*, 2002). Paralelamente, inúmeros estudos sugerem que a CAT dos alimentos seja um importante indicador de bioatividade destas matrizes alimentares tendo em vista a sua possível relação com a CAT plasmática após o consumo destes alimentos (La Vecchia *et al.*, 2013; Farvid *et al.*, 2013; Del Rio *et al.*, 2011; Halvorsen *et al.*, 2006; Pitsavos *et al.*, 2005).

Entretanto, a influência da CAT de um alimento, após o seu consumo, sobre a CAT plasmática depende de diversos fatores, entre eles, o nível de estresse oxidativo ao qual o organismo está exposto, a composição e as quantidades de antioxidantes habitualmente ingeridos bem como a biodisponibilidade dos compostos antioxidantes após a ingestão de cada alimento (Host & Willimson, 2008; Sies, 2007). De fato, Serrano *et al.* (2007) demonstraram que a CAT de variados cereais, frutas e leguminosas subestimou a CAT fisiológica *in vitro* após a administração destes alimentos.

Adicionalmente, Saura-Calixto & Goni (2006) observaram que a contribuição da CAT dos óleos vegetais para a CAT total da dieta é pequena (< 2%) devido ao baixo consumo destes alimentos diariamente. Portanto, é plausível esperar que a CAT dos óleos colabore pouco para a CAT plasmática. Portanto, a CAT pode não ser um adequado indicador da bioatividade dos óleos vegetais.

Por outro lado, alguns estudos sugerem uma associação entre a CAT e a estabilidade oxidativa dos óleos. Arranz *et al.* (2008) e Ninfali *et al.* (2002) observaram correlação entre a CAT (determinada pelos ensaios de DPPH e ORAC, respectivamente) e a estabilidade oxidativa dos óleos de nozes e do extrato metanólico do azeite de oliva extra-virgem, o qual

não considera a presença de tocoferóis. Desta forma, estes autores sugerem o uso da CAT como um indicador de estabilidade oxidativa dos óleos.

Entretanto, até o momento, não se tem conhecimento de estudos que investiguem a correlação entre o ensaio de TEAC, o mais recomendado para óleos vegetais, e a estabilidade oxidativa dos mesmos. Além disso, outros tipos de óleos e condições de oxidação acelerada devem ser avaliados para confirmar o potencial uso da CAT como indicador de qualidade dos óleos vegetais. Portanto, torna-se relevante a investigação da CAT, por meio do ensaio de TEAC, em diferentes tipos de óleos vegetais, expostos a diferentes condições de oxidação acelerada, a fim de contribuir com o potencial uso da CAT como uma nova ferramenta para o controle de qualidade dos óleos vegetais.

## **2. Objetivos**

### **Geral**

Investigar o potencial uso da capacidade antioxidante total como indicador de estabilidade oxidativa dos óleos por meio da associação entre o ensaio de TEAC e a formação dos produtos primários e secundários dos óleos oxidados em diferentes condições.

### **Específicos**

- Investigar a contribuição da capacidade antioxidante total dos óleos frescos para a formação dos produtos primários e secundários durante oxidação em Estufa de Schaal, em 180°C e em exposição à luz pela aplicação de Modelo Linear Generalizado;
- Investigar a relação entre a capacidade antioxidante total e o índice de peróxido dos óleos frescos a fim de propor um limite mínimo aceitável para CAT de óleos vegetais de boa qualidade.

### 3. Material e métodos

O desenvolvimento do Capítulo 3 considerou os resultados previamente apresentados e discutidos nos Capítulos 1 e 2. Desta forma, utilizou-se os resultados da CAT e do IP dos óleos frescos e do período de indução dos óleos oxidados por *Rancimat* do Capítulo 1 bem como os resultados de IP ( $\Delta$  aumento IP) e IpA ( $\Delta$  aumento IpA) nos diferentes testes de oxidação acelerada do Capítulo 2. As metodologias de cada análise estão descritas nos seus respectivos capítulos. O GLM foi utilizado para avaliar a contribuição quantitativa da CAT para cada indicador de estabilidade oxidativa. As variáveis  $CAT_{inicial}$  e  $IP_{inicial}$  dos óleos foram consideradas variáveis preditoras, enquanto o  $\Delta$  aumento IP, o  $\Delta$  aumento IpA e o período de indução foram consideradas variáveis de resposta. Análise de regressão linear simples foi utilizada para investigar a relação entre a CAT e o IP dos óleos frescos. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Todas as análises foram realizadas no programa estatístico *Statgraphics v. 12.2* (Manugistics, EUA).

### 4. Resultados e discussão

#### 4.1 Relação entre a capacidade antioxidante total e a estabilidade oxidativa

A contribuição da CAT dos óleos frescos para a estabilidade oxidativa dos mesmos foi observada por meio do ajuste de modelos significativos para o período de indução, para o  $\Delta$  aumento IP a 65°C e o  $\Delta$  aumento IpA a 65°C (Tabela 1). Entretanto, não foi possível ajustar modelos significativos considerando o grau de oxidação a 180°C e durante a exposição à luz. Além disso, utilizou-se a variável  $IP_{inicial}$  como preditora, juntamente com a CAT, devido a importância do IP como indicador de estabilidade oxidativa dos óleos (Frankel, 1993).

**Tabela 1.** Contribuição da capacidade antioxidante total e do índice de peróxido dos óleos frescos (n=18) para a sua estabilidade oxidativa em diferentes condições de oxidação acelerada.

Variável dependente	Determinantes químicos	<i>P</i> valor	Peso da variável <sup>1</sup>	Modelo <sup>2</sup>
<i>PI</i>	Tipo de óleo	0,0009	-	$(-7,00 \times k_1) + (1,89 \times k_2) + (3,10 \times k_3) + (3,74 \times k_4) - (4,24 \times k_5) + (0,60 \times k_6) + (0,10 \times k_7) + (1,55 \times k_8) + (0,62 \times \text{IP}_{\text{inicial}}) + (2,64 \times \text{CAT}_{\text{inicial}})$ R <sup>2</sup> ajustado = 99,0 % <i>P</i> da ANOVA para o modelo <0,0001
	CAT <sub>inicial</sub>	0,0018	6,62	
	IP <sub>inicial</sub>	0,0438	1,77	
Δ aumento IP (65°C)	Tipo de óleo	0,0029	-	$(-157,0 \times k_1) - (180,1 \times k_2) + (51,9 \times k_3) + (73,9 \times k_4) + (196,3 \times k_5) - (247,8 \times k_6) + (157,4 \times k_7) - (73,3 \times k_8) + (43,5 \times \text{IP}_{\text{inicial}}) - (28,3 \times \text{CAT}_{\text{inicial}})$ R <sup>2</sup> ajustado = 94,5 % <i>P</i> da ANOVA para o modelo < 0,0001
	CAT <sub>inicial</sub>	0,0000	70,8	
	IP <sub>inicial</sub>	0,0004	122,2	
Δ aumento IpA (65°C)	Tipo de óleo	0,0160	-	$(-49,9 \times k_1) - (41,6 \times k_2) + (22,0 \times k_3) + (38,4 \times k_4) + (18,5 \times k_5) - (47,9 \times k_6) + (23,5 \times k_7) - (5,89 \times k_8) + (7,77 \times \text{IP}_{\text{inicial}}) - (5,89 \times \text{CAT}_{\text{inicial}})$ R <sup>2</sup> ajustado = 90,9 % <i>P</i> da ANOVA para o modelo = 0,0005
	CAT <sub>inicial</sub>	0,0000	14,7	
	IP <sub>inicial</sub>	0,0011	21,8	

<sup>1</sup>Peso da variável (contribuição relativa média) = coeficiente × média da variável. <sup>2</sup> Óleo de soja:  $k_1 = k_2 = k_3 = k_4 = k_5 = k_6 = k_7 = k_8 = -1$ ; óleo de milho:  $k_1 = k_2 = k_3 = k_4 = k_5 = k_6 = k_8 = 0$  e  $k_7 = 1$ ; óleo de girassol:  $k_1 = k_2 = k_3 = k_4 = k_6 = k_7 = k_8 = 0$  e  $k_5 = 1$ ; óleo de canola:  $k_1 = k_2 = k_4 = k_5 = k_6 = k_7 = k_8 = 0$  e  $k_3 = 1$ ; óleo de amêndoa doce:  $k_2 = k_3 = k_4 = k_5 = k_6 = k_7 = k_8 = 0$  e  $k_1 = 1$ ; óleo de avelã:  $k_1 = k_3 = k_4 = k_5 = k_6 = k_7 = k_8 = 0$  e  $k_2 = 1$ ; óleo de castanha-do-Brasil:  $k_1 = k_2 = k_3 = k_5 = k_6 = k_7 = k_8 = 0$  e  $k_4 = 1$ ; óleo de noz-pecã:  $k_1 = k_2 = k_3 = k_4 = k_5 = k_6 = k_7 = 0$  e  $k_8 = 1$ . CAT= capacidade antioxidante total; IP = índice de peróxido; Δ aumento IP = (valor máx-valor min de IP); Δ aumento IpA = (valor máx-valor min de IpA); PI = período de indução.

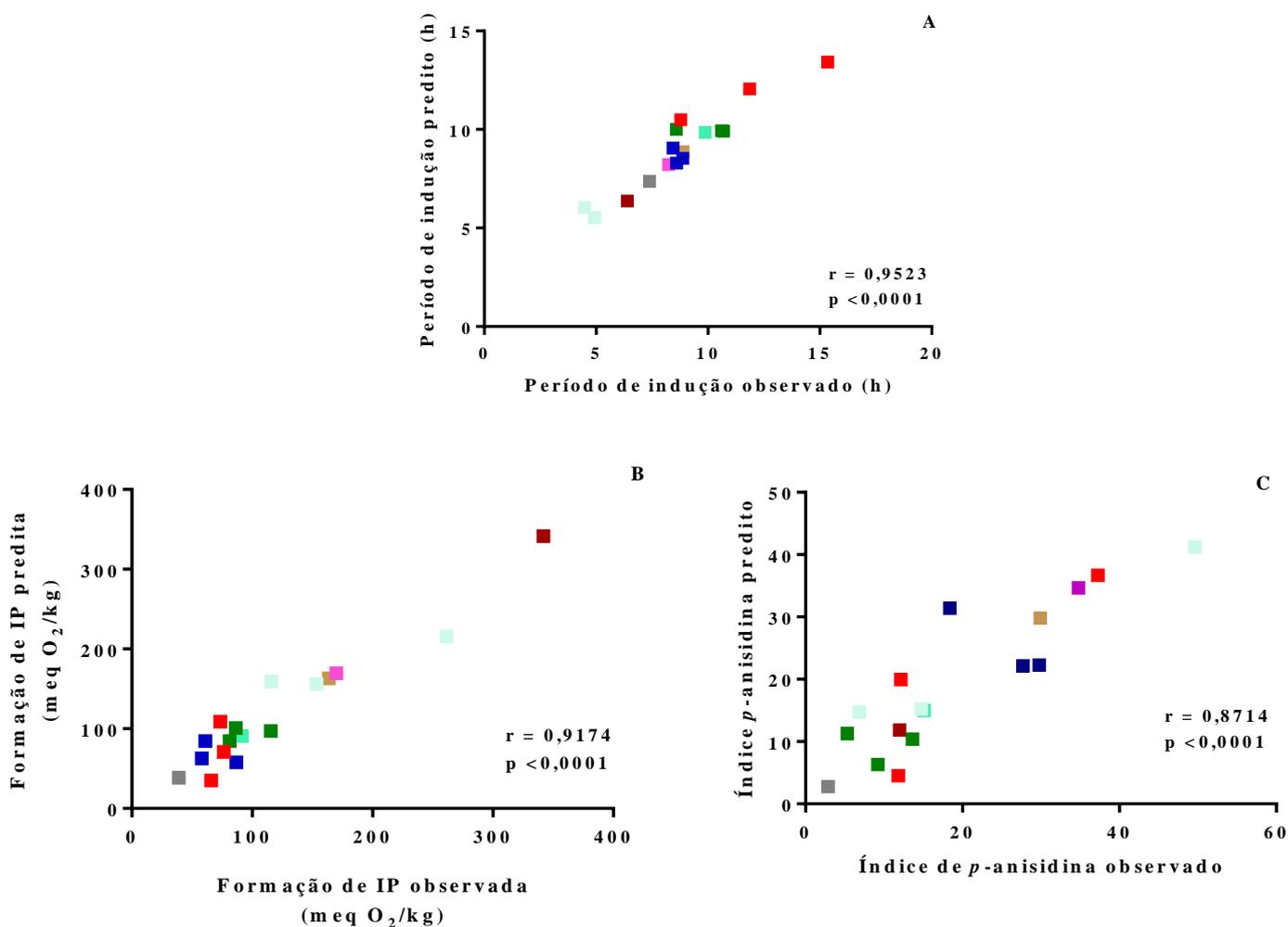
De acordo com os modelos apresentados, nota-se que o tipo de óleo, a CAT e o IP dos óleos frescos contribuíram fortemente para a variabilidade da estabilidade oxidativa dos óleos ( $p < 0,001$   $R^2 > 90\%$ ), sugerindo que ambos são bons indicadores do grau de oxidação dos óleos durante o teste de *Rancimat* e o de Estufa de Schaal.

De acordo com os valores de  $p$  e de  $\beta$ -coeficiente, observou-se que a CAT dos óleos frescos contribuiu fortemente para prolongar o período de indução dos óleos oxidado pelo *Rancimat*, bem como para diminuir a formação dos produtos primários e dos secundários durante oxidação em Estufa de Schaal. Por outro lado, o IP dos óleos frescos contribuiu para aumentar a formação dos produtos primários e secundários em óleos oxidados a 65°C, embora também contribuiu para prolongar o período de indução pelo *Rancimat*. Portanto, óleos com maior CAT inicial tendem a ser mais estáveis, enquanto óleos com maior IP, mais instáveis.

Existem diferentes indicadores capazes de prever a estabilidade oxidativa dos óleos, dentre eles, o IP é o mais tradicional. O IP é normalmente utilizado pela indústria de alimentos para o controle de qualidade dos óleos, tendo em vista que o IP dos óleos frescos reflete as condições de extração, refino e armazenamento dos óleos, bem como é capaz de prever a estabilidade oxidativa dos mesmos (Kardash-Strochkova *et al.*, 2001).

Entretanto, o IP estima a estabilidade oxidativa dos óleos por meio das relações existentes entre o grau de oxidação dos óleos e a presença de LOOH, não resultando em nenhuma informação direta sobre a relação dos antioxidantes com a estabilidade oxidativa destes alimentos. De acordo com os Capítulos 1 e 2 desta tese, observou-se que a estabilidade oxidativa dos óleos é fortemente influenciada pelos tocoferóis. Desta forma, sugere-se que CAT dos óleos, cujos determinantes são os tocoferóis, seja um indicador que permite avaliar a qualidade dos óleos com base no comportamento dos principais antioxidantes presentes nos óleos vegetais.

A partir dos modelos ajustados estimou-se a estabilidade oxidativa dos óleos expostos ao método de *Rancimat* e ao teste de Estufa de Schaal, tendo em vista a forte correlação entre os valores experimentais e os estimados pelos modelos (Figura 1). De acordo com a literatura, os testes de Estufa de Schaal e o método de *Rancimat* são os mais utilizados para verificar a estabilidade oxidativa dos óleos, correspondendo a mecanismos diferenciados da oxidação lipídica. (Kochhar & Henry 2009; Kim *et al.*, 2008; Miraliakbari & Shahidi, 2008b; Farhoosh, 2007).



**Figura 1.** Estimativa da estabilidade oxidativa dos óleos utilizando as variáveis *índice de peróxido* e *capacidade antioxidante total* como independentes em um mesmo modelo: (A) Período de Indução; (B) Aumento do índice de peróxido (65°C); (C) Aumento do índice de *p*-anisidina (65°C). ■ soja; ■ milho; ■ girassol; ■ canola; ■ castanha-do-Brasil; ■ noz-pecã; ■ avelã; ■ amêndoa doce; ■ macadâmia.

Relata-se que o teste de Estufa de Schaal apresenta boa correlação com a vida de prateleira dos óleos vegetais em condições de temperatura ambiente (Frankel, 2003). Em contrapartida, o método de *Rancimat* corresponde à estabilidade dos óleos em temperaturas elevadas (> 100°C). No entanto, alguns autores demonstraram que o período de indução de diferentes óleos de nozes pelo método de *Rancimat* também foi capaz de prever a estabilidade oxidativa dos mesmos óleos a 20°C (Kochhar & Henry, 2009). Portanto, a forte correlação da CAT com métodos amplamente utilizados e que correspondem a mecanismos de oxidação diferenciados, indica que a CAT tem potencial para ser um determinante holístico da estabilidade oxidativa dos óleos vegetais, especialmente quando determinada pelo ensaio de TEAC.

#### *4.2 Recomendação de um valor mínimo da CAT para óleos de boa qualidade*

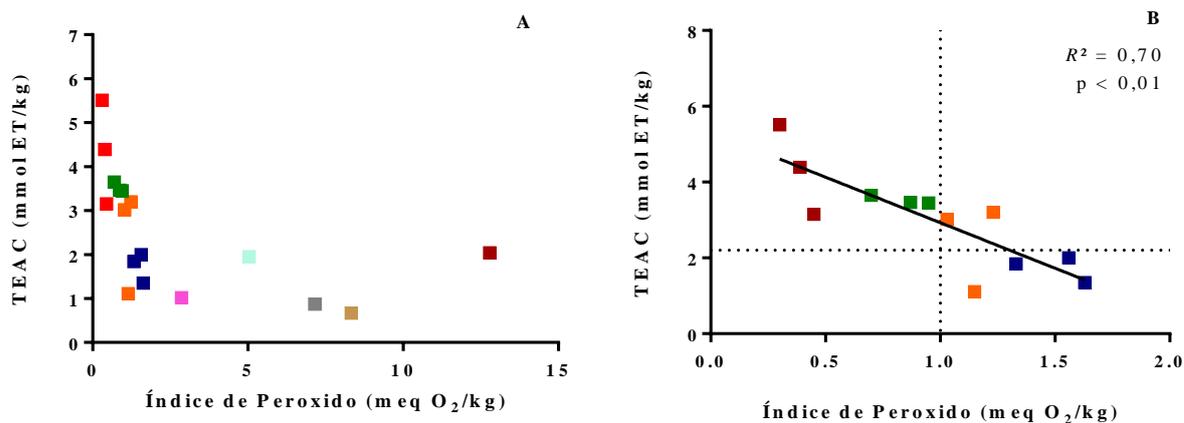
Em 22 de Setembro de 2005, a ANVISA decretou o regulamento técnico para óleos vegetais visando à inspeção do processo de produção e, conseqüentemente, a obtenção de um produto final de qualidade (RDC nº 275/2005). Desta forma, fixou-se a identidade e as características mínimas pelas quais os produtores de óleos vegetais devem orientar-se. Dentre os requisitos específicos preconizados, existe a definição de um valor máximo de IP aceitável para óleos de boa qualidade, a saber: 10 meq O<sub>2</sub>/ kg e 15 meq O<sub>2</sub>/ kg para óleos refinados e prensados a frio, respectivamente.

Neste contexto, a CAT dos óleos frescos, determinada pelo ensaio de TEAC, foi um importante indicador de estabilidade oxidativa dos óleos, juntamente com o IP. Desta forma, é possível que o ensaio de TEAC seja uma ferramenta útil para o controle de qualidade dos óleos vegetais. Portanto, a definição de um valor mínimo de CAT correspondente ao valor

máximo permitido de IP pode resultar em informações complementares para o controle de qualidade dos óleos.

Por conseguinte, após a aplicação de regressão linear simples, observou-se uma correlação negativa entre a CAT e o IP dos óleos frescos ( $R^2 = 0,30$  e  $p < 0,05$ ). Entretanto, parece que este modelo não explicou adequadamente a relação entre a CAT e o IP dos óleos de nozes prensados a frio (Figura 2A). Considerando apenas os óleos refinados, observou-se uma forte correlação negativa entre estas variáveis ( $R^2 = 0,70$  and  $p < 0,01$ ; Figura 2B). Desta forma, é possível sugerir que os processos de extração e de refino influenciem na relação entre a CAT e o IP nos óleos frescos. Contudo, uma comparação direta entre óleos refinados e prensados a frio do mesmo tipo de óleo deve ser realizada para investigar esta hipótese.

Nossos resultados demonstram que óleos refinados com um IP inicial maior do que 2,5 meq  $O_2/kg$  tendem a apresentar uma atividade antioxidante nula. Desta forma, considerou-se que óleos refinados de boa qualidade (nutricional e, possivelmente, sensorial) devem seguir os parâmetros mais rigorosos de limite máximo de IP sugeridos pela AOCs (1 meq  $O_2/kg$ ). Desta forma, propõe-se que 2,20 mmol ET/kg seja o valor mínimo de CAT para óleos refinados de boa qualidade global. Portanto, a CAT dos óleos refinados, determinada pelo ensaio de TEAC, tem potencial para tornar-se uma nova alternativa para o controle de qualidade dos óleos que considera as propriedades nutricionais e oxidativas dos mesmos, simultaneamente.



**Figura 2.** Relação entre a capacidade antioxidante total e o índice de peróxido em óleos frescos (A) e apresentação de um limite mínimo de capacidade antioxidante total para óleos refinados (B). ■ soja; ■ milho; ■ girassol; ■ canola; ■ castanha-do-Brasil; ■ noz-pecã; ■ avelã; ■ amêndoa doce; ■ macadâmia.

## 5. Conclusão

No presente estudo, a CAT dos óleos, determinada pelo ensaio de TEAC, demonstrou-se um adequado indicador de estabilidade oxidativa dos óleos, estimando a o grau de oxidação dos mesmos nos principais testes de oxidação acelerada, os testes de Estufa de Schaal e o método de *Rancimat*. Além disso, a CAT também pode ser um importante indicador da qualidade inicial dos óleos vegetais que reflete a presença dos principais antioxidantes presentes nestas matrizes, além da suscetibilidade de cada óleo à degradação oxidativa. Deste modo, sugere-se que óleos refinados com CAT mínima de 2,20 mmol ET/kg apresentem boa qualidade inicial e oxidativa. Portanto, a CAT determinada pelo ensaio de TEAC, pode complementar as informações fornecidas pelo IP, contribuindo para um controle mais completo quanto à qualidade dos óleos vegetais.

## **Conclusões Finais**

A presente tese investigou a relação das transformações químicas durante a oxidação lipídica de óleos vegetais e a sua relação com a capacidade antioxidante aplicando análises de estatística multivariada. Abordou-se variados aspectos desta relação, a saber: a influência da composição inicial para a capacidade antioxidante e a estabilidade oxidativa dos óleos (Capítulo 1), a relação das transformações da composição química durante a oxidação para a formação e degradação dos produtos de oxidação bem como para capacidade antioxidante (Capítulo 2) e por fim; o potencial uso do ensaio de capacidade antioxidante (TEAC) como um indicador de estabilidade oxidativa dos óleos vegetais (Capítulo 3).

As reações de oxidação lipídica nos óleos vegetais são extremamente complexas e esse aspecto ficou claro na observação conjunta dos resultados apresentados nos três capítulos e na investigação de sua relação com a CAT dos óleos. Não é de nosso conhecimento a existência de um estudo igualmente amplo quanto às condições de oxidação e ao número de tipos de óleos testados, especialmente aliando-se os dados experimentais à aplicação de estatística multivariada. Neste contexto, a estatística multivariada pode gerar informações mais fidedignas em relação ao comportamento oxidativo dos óleos vegetais, tendo em vista que permite avaliar o efeito de uma variável dependente, consideração a suas interações com outras variáveis. Portanto, espera-se que os resultados observados nesta Tese possam representar uma importante contribuição para o conhecimento da estabilidade oxidativa dos óleos e da sua relação com a CAT bem como para o desenvolvimento de novas estratégias tecnológicas para o controle de qualidade desta matriz alimentar.

Neste contexto, observou-se que os antioxidantes, especialmente os tocoferóis, foram os principais determinantes da estabilidade oxidativa e da capacidade antioxidante dos óleos, demonstrando que os antioxidantes apresentam um papel mais relevante para a qualidade final dos óleos do que os ácidos graxos poli-insaturados, reconhecidamente, os

principais substratos da oxidação lipídica. Por conseguinte, o  $\alpha$ -tocoferol destacou-se por sua relação com a estabilidade oxidativa dos óleos, enquanto o  $\gamma$ -tocoferol destacou-se pela sua relação com a capacidade antioxidante.

O  $\alpha$ - e o  $\gamma$ -tocoferol apresentam papéis complementares em relação à qualidade global dos óleos vegetais. O papel do  $\gamma$ -tocoferol esteve mais ligado com a capacidade antioxidante dos óleos frescos, bem como com sua estabilidade oxidativa (*Rancimat*). Por sua vez, o comportamento de degradação do  $\alpha$ -tocoferol foi o principal responsável pelas transformações ocorridas na oxidação lipídica, especialmente quanto à formação de produtos primários. Embora a degradação do  $\gamma$ -tocoferol tenha contribuído menos para a formação dos produtos de oxidação, foi mais importante para a variação na capacidade antioxidante ao longo da oxidação.

A capacidade antioxidante dos óleos apresentou um comportamento inesperado durante os diferentes testes de oxidação acelerada, especialmente para os óleos de nozes que apresentaram aumento da capacidade antioxidante na oxidação. Provavelmente, as transformações químicas dos óleos vegetais promoveram mudanças nos determinantes químicos da capacidade antioxidante, durante os testes de oxidação acelerada. A capacidade antioxidante apresentou-se mais estável que seu principal determinante, o  $\gamma$ -tocoferol, na oxidação acelerada dos óleos. Adicionalmente, a associação da capacidade antioxidante com os produtos secundários formados na oxidação acelerada indica que produtos da oxidação lipídica, tais como aldeídos, podem ter papel antioxidante nos óleos vegetais. Desta forma, o estudo das transformações da capacidade antioxidante pode contribuir com novas informações sobre a atividade dos produtos secundários da oxidação lipídica.

Por fim, a capacidade antioxidante inicial dos óleos foi capaz de estimar com adequado grau de precisão a estabilidade oxidativa nas principais condições de oxidação

utilizadas para o monitoramento do grau de oxidação dos óleos. Portanto, tendo em vista a sua relação com o  $\gamma$ -tocoferol e com a formação dos produtos primários e secundários da oxidação lipídica, a capacidade antioxidante tem potencial para ser um indicador da qualidade global dos óleos. Nesse contexto, a capacidade antioxidante dos óleos frescos correlacionou-se fortemente com o IP, indicador de estabilidade oxidativa amplamente utilizado pela indústria de óleos vegetais. A aplicação do limite mínimo proposto para a capacidade antioxidante de óleos refinados e prensados a frio pode confirmar o ensaio de capacidade antioxidante como uma nova ferramenta no controle de qualidade dos óleos vegetais.

## **Referências Bibliográficas**

- Abramovic H, Butinar B, Nikolic V (2007). Changes occurring in phenolic content, tocopherol composition and oxidative stability of *Camelina sativa* oil during storage. *Food Chemistry*; **104** (3): 903-909.
- Alasalvar C & Pelvan E (2011). Fat-soluble bioactives in nuts. *European Journal of Lipid Science and Technology*; **113**: 943-949.
- Alasalvar C & Shahidi F (2009). Natural antioxidants in tree nuts. *European Journal of Lipid Science and Technology*; **111**: 1056-1062.
- Alasalvar C, Amaral JS, Shahidi F (2006). Functional lipids characteristics of turkish tombul hazelnut (*Corylus avellana* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **54**: 10177-10183.
- Anderson A & Black T (1998). *Análise multivariada de dados*. 5° edição. São Paulo: Artmed, 1998, pp 583.
- Andjelkovic M, Camp JV, Trawka A, Verhe R (2010). Phenolic compounds and some quality parameters of pumpkin seed oil. *European Journal of Lipid Science and Techonolgy*; **112**: 208-217.
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (1997). Portaria n° 540 de 27 de outubro de 1997. Regulamento técnico: Aditivos alimentares – definições, classificação e emprego.
- ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005). Resolução RDC n° 270 de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal.
- Anwara F, Bhangar MI, Kazi TG (2003) Relationship between rancimat and active oxygen method values at varying temperatures for several oils and fats. *Journal of American Oil Chemist's Society*; **80**: 151–155.
- AOAC –*Official methods of analysis of the AOAC, 14<sup>th</sup> ed.* Arlington, VA, USA: Association of the Official Analytical Chemists, Inc pp. 276-319; 511-13.
- AOCS - *Official Methods and Recommended Practices of the AOCS*, 5° edição. American Oil chemist Society: Champaign, Illinois.
- Aparício R, roda L, Albi MA, Gutiérrez F (1999). Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **47**: 4150-4155.
- Arranz S, Cert R, Pérez-Jiménez J, Cert A, Saura-Calixto Fulgencio (2008). Comparison between free radical scavenging capacity and oxidative stability of nut oils. *Food Chemistry*; **110**: 985-990.
- Azeredo HMC, Faria JAF, da Silva MAAP (2004). Minimization of peroxide formation rate in soybean oil by antioxidants combination. *Food Research International*; **37**: 689-694.

- Bahrudin S, Sing YY, Nawi MA, Hashim NH, Ali ASM, Saled MI, Sulaiman SF, Talib KM, Ahmad K (2007). Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reverse-phase HPLC. *Food Chemistry*; **105**: 389-394.
- Bakir T, Sönmezoglu I, Imer F, Apak R (2013). Polar paradox revisited: analogous pairs of hydrophilic and lipophilic antioxidants in linoleic acid emulsion containing Cu (II). *Journal of the Science of Food and Agricultural*; **93**: 2478-2485.
- Balasundram N, Sundram K, Samman S (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*; **99**: 191–203.
- Baldioli M, Servili M, Perretti G, Montedoro GF (1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of American Oil Chemist' Society*; **73 (11)**: 1589 – 1593.
- Barrera-Arellano D, Ruiz-Méndez V, Velasco J, Márquez-Ruiz G, Dobarganes C. Loss of tocopherols and formation of degradation compounds at frying temperatures in oils differing in degree of unsaturation and natural antioxidant content. *Journal of the Science of Food and Agriculture*; **82**: 1696-1702.
- Bendini A, Cerretani L, Carrasco-Pancorbo A, Gómez-Caravacca AM, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A, Lercker G (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: A survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*; 12(8): 1679-1719.
- Blakes C, Psomiadou E, Tsimidou M, Boskou M (2002). On the importance of total polar phenols to monitor the stability of Greek virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*; **104**: 340-346.
- Blomhoff R, Carlsen MH, Andersen LF, Jacobs DRJ (2006). Health benefits of nuts: potential role of antioxidants. *British Journal of Nutrition*; **96 (suppl.2)**: S52-S60.
- Bozan B & Temelli F (2008). Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. *Bioresource Technology*; **99**: 6354-6359.
- Brenes M, García A, García P, Rios JJ, Garrido A (1999). Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **47**: 3535-3540.
- Bruscatto MH, Zambiazzi RC, Sganzerla M, Pestana VR, Otero D, Lima R, Paiva F (2009). Degradation of tocopherols in rice bran oil submitted to heating at different temperatures. *Journal of Chromatographic Science*; **47**: 762-765.

- Castelo-Branco VN & Torres AG (2011). Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. *Revista de Nutrição*; **24** (1): 173-188.
- Castelo-Branco VN & Torres AG (2012). Generalized linear model describes determinants of total antioxidant capacity of refined vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*; **114**: 332-342.
- Chaiyasit W, Elias RJ, McClements DJ, Decker EA (2008b). The Relationship between the Physicochemical Properties of Antioxidants and Their Ability to Inhibit Lipid Oxidation in Bulk Oil and Oil-in-Water Emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; **53**: 4982-88.
- Chaiyasit W, Elias RJ, McClements DJ, Weiss J, Decker EA (2008a ). Impact of surface-active compounds on physicochemical and oxidative properties of edible oil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; **56**: 550-556.
- Chaiyasit W, Elias RJ, McClements J, Decker EA (2007). Role of physical structures in bulk oils on lipid oxidation. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **47**: 299-317.
- Chen B, Han A, Laguerre M, McClements DJ, Decker EA (2011). Role of reverse micelles on lipid oxidation in bulk oils: impact of phospholipids on antioxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol and Trolox. *Food & Function*; **2**: 302-309.
- Chen B, McClements DJ, Decker EA (2011). Minor components in food oils: A critical review of their roles on lipid oxidation chemistry in bulk oils and emulsions. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **51**: 901-916.
- Cheung SCM, Szeto YT, Benzie IFF (2007). Antioxidant protection of edible oils. *Plant Food for Human Nutrition*; **62**: 39-42.
- Choe E & Min DB (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*; **5**: 169-186.
- Choe E & Min DB (2007). Chemistry of deep-fat frying oils. *Journal of Food Science*; **72** (5): 77-86.
- Coates AM & Howe PRC (2007). Edible nuts and metabolic health. *Current Opinion in Lipidology*; **18**: 25–30.
- Codex Standard for named vegetable oils. *Codex Standard for fats and oils from vegetable sources*. CODEX-STAND 210.
- Coorod D, Brick MA, Byrne PF, DeBonte L, Chen Z (2008). Inheritance of long chain fatty acid in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Euphytica*; **164**: 583-92.
- Crews C, Hough P, Godward J, Brereton P, Lees M, Guiet S, Winkelmann W (2005). Study of the main constituents of some authentic hazelnut oils. *Journal of Food Agricultural and Food Chemistry*; **53**: 4843-4852.

- Czernichow S, Thomas D, Bruckert E (2010). *n*-6 Fatty acids and cardiovascular health: a review of the evidence for dietary intake recommendations. *British Journal of Nutrition*; **104**: 788-796.
- Dana D & Saguy IS (2001). Frying of nutritious food: obstacles and feasibility. *Food Science and Technology Research*; **7 (4)**: 265-279.
- Del Carlo M, Sacchetti G, Di Mattia C, Compagnone D, Mastrocola D, Liberatore L, Cichelle A (2004). Contribution of the phenolic fraction to the antioxidant activity and oxidative stability of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **52**: 4072-4079.
- Del Rio D, Agnoli C, Pellegrini N, Krogh V, Brighenti F, Mazzeo T, Masala G, Bendinelli B, Berrino F, Sieri S, Tumino R, Rollo PC, Gallo V, Sacerdote C, Mattiello A, Chiodini P, Panico S (2011). Total antioxidant capacity of the diet is associated with lower risk of ischemic stroke in a large Italian Cohort. *The Journal of Nutrition*; **141**: 118-123.
- Desai ID, Bhagavan H, Salkeld R, Oliveira JED (1988). Vitamin E content of crude and refined vegetable oils in Southern Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*; **1**: 231-238.
- Dimitrios B (2006). Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science and Technology*; **17**: 505-512.
- Doert M, Jaworska K, Moersel JT, Kroh LW (2012). Synergistic effect of lecithins for tocopherols: lecithin-based regeneration of  $\alpha$ -tocopherol. *European Food Research and Technology*; **235 (5)**: 915-928.
- Dolde D & Wang T (2011). Oxidation of corn oils with spiked tocopherols. *Journal of American Oil Chemists Society*; **88**: 1759-1765.
- Dubois V, Breton S, Linder M, Fanni J, Parmentier M (2007). Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology*; **109**: 710-732.
- Durmaz G & Gökmen V (2010). Impacts of roasting oily seeds and nuts on their extracted oils. *Lipid Technology*; **22 (8)**: 179-182.
- Eckan N, Ayranci G, Ayranci E (2009). A kinetic study of oxidation development in sunflower oil under microwave heating: effect of natural antioxidants. *Food Research International*; **42**: 1171-1177.
- Elisia I, Young JW, Yuan YV, Kitts (2013). Association between tocopherol isoform composition and lipid oxidation in selected multiple edible oils. *Food Research International*; **52**: 508-514.
- Escarpa A & González MC (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of

- chromatographic and spectrophometric methods. *Analytica Chimica Acta*; **427**: 119-127.
- Esmailzadeh A & Azadbakht L (2011). Different kinds of vegetable oils in relation to individual cardiovascular risk factors among Iranian woman. *British Journal of Nutrition*; **105**: 919-927.
- Espín JC, Soler-Rivas C, Wichers HJ (2000). Characterization of the Total Free Radical Scavenger Capacity of Vegetable Oils and Oil Fractions Using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; **48**: 648-56.
- FAO - Food and Agricultural Organization of the United Nations. OECD-FAO *Agricultural Outlook 2011-2020*. Capítulo 5. Oilseeds and oilseeds products. Pg107118. <http://www.oecd.org/site/oecd/faoagriculturaloutlook/48186214.pdf>. Acessado em 26/03/2013.
- Farhoosh R & Pazhouhanmehr S (2009 b). Relative contribution of compositional parameters to the primary and secondary oxidation of canola oil. *Food Chemistry*; **114**: 1002-1006.
- Farhoosh R, Einafshar S, Sharayei P (2009 a). The effect of commercial refining steps on the rancidity measures of soybean and canola oils. *Food Chemistry*; **115**: 933-938.
- Farhoosh R, Niazmand R, Rezaei M, Sarabi M (2008). Kinetic parameter determination of vegetable oil oxidation under Rancimat test conditions. *European Journal of Lipid Science Technology*; **110**: 587-592.
- Farhoosh R (2007). The effect of operational parameters of the rancimat method on the determination of the oxidative stability measures and shelf-life prediction of soybean oil. *Journal of American Oil Chemist's Society*; **84**: 205–209.
- Farvid MS; Homayouni F, Kashkalani F, Shirzadeh L, Valipour G, Farahnak Z (2013). The association between oxygen radical absorbance capacity of dietary intake and hypertension in type 2 diabetic patients. *Journal of Human Hipertension*; **27**: 164-168.
- FDA – Food and Drug Administration. Qualified claims about cardiovascular disease risk: Nuts & heart disease. <http://www.cfsan.fda.gov/wdms/qhc-sum.html#nuts>. Acesso em 15/03/2013.
- FEDIOL - The European Union Vegetable Oil and Proteinmeal Industry. Vegetable oils production, imports, exports and consumption – 2011 Annual Statistic. <http://www.fediol.eu/data/1348739622Stat%20oils%202011.pdf>. Acesso em 25/02/2013.

- Flores F, Moreno MT, Cubero JI (1998). A comparison of univariate and multivariate methods to analyze GxE interaction. *Fields Crops Research*; **56** (3): 271-286.
- Foreign Agricultural Service USDA. Major Vegetable Oils: World Supply and Distribution. (2013). <http://www.fas.usda.gov/oilseeds/circular/2013/tabela3.pdf>. Acessado em 29.03.2013.
- Franke AA, Murphy SP, Lacey R, Custer LJ (2007) Tocopherol and Tocotrienol Levels of Food Consumed in Hawaii. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; **55**: 769-78.
- Frankel EN & Finley JW (2008) How To Standardize the Multiplicity of Methods To Evaluate Natural Antioxidants. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; **56**: 4901-08.
- Frankel EN (1993). In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science and Technology*; **4**: 220 – 225.
- Frankel EN (1996). Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry*; **57** (1): 51-55.
- Frankel EN (2005a). Free radical oxidation. Em *Lipid Oxidation*; Frankel EN eds.; Oily Press: Bridgwater. Capítulo 1; pp 15.
- Frankel EN (2005b). Methods to determine extent of oxidation. Em *Lipid Oxidation*; Frankel EN eds.; Oily Press: Bridgwater. Capítulo 5; pp 99.
- Freitas JB & Naves MMV (2010). Composição química de nozes e sementes comestíveis e a sua relação com a saúde e nutrição. *Revista de Nutrição*; **23**(2): 269-279.
- García AG, Ruiz-Méndez MV, Romero C, Brenes M (2006). Effect of refining on the phenolic composition of crude olive oils. *Journal of American Oils Chemist's Society*; **83** (3): 159-164.
- Ghazani SM & Marangoni AG (2013). Minor components in canola oil and effects of refining on these constituents: a review. *Journal of American Oils Chemist's Society*; **90**: 923-932.
- Ghazani SM, García-Latas G, Marangoni AG (2013a). Minor constituents in canola oil processed by traditional and minimal refining methods. *Journal of American Oils Chemist's Society*; **in press**.
- Gimeno E, Castellote AI, Lamuela-Raventós RM, de la Torre MC, López-Sabater MC (2000). Rapid determination of vitamin E in vegetable oils by reversed-

- phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 881: 251-54.
- Goa X, Wilde PE, Lichtenstein AH, Bermudez OI, Tucker KL (2006). The maximal amount of dietary  $\alpha$ -tocopherol intake in U.S. adults (NHANES 2001-2001). *Journal of Nutrition*; **136**: 1021-1026.
- Goa X, Wilde PE, Lichtenstein AH, Bermudez OI, Tucker KL (2006). The Maximal Amount of dietary  $\alpha$ -Tocopherol Intake in U.S. Adults (NHANES 2001-2002). *Journal of Nutrition*; **136**: 1021-26.
- Gómez-Alonso S, Fregapane G, Salvador MD, Gordon MH (2003). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **51 (3)**: 667-672.
- Gómez-Alonso S, Salvador MD & Fregapane G (2004). Evolution of the Oxidation Process in Olive Oil Triacylglycerol Under Accelerated Storage Conditions (40 -60°C). *Journal of American Oil Chemist's Society*; **81(2)**:177-84.
- Guillen MD & Cabo N (2002). Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and *p*-anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chemistry*; **77**: 503-510.
- Gutfinger T (1981). Polyphenols in olive oils. *Journal of American Oil Chemist's Society*; **58 (11)**: 966-968.
- Hair JF, Rolph AE, Ronald TL, Black WC (1998). Canonical Correlation Analysis, em *Multivariate Data Analysis*. 5ª edição. Copyright, Prentice Hall.
- Halliwell B (2012). Free radical and antioxidants: updating a personal view. *Nutrition Reviews*; **70 (5)**: 257-265.
- Haloom R, Smith AJ, Balcerzyk A, Ziemann M, Ooi J, Loveridge SJ, Baker EK, El-Osta A, Karagiannis (2012). Investigation into biological properties of the olive polyphenol, hydroxytyrosol: mechanistic insights by genome-wide mRNA-seq analysis. *Genes & Nutrition*; **7 (2)**: 343-355.
- Halvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, Bohn SK, Holte K, Jacobs DR Jr, Blomhoff R (2006). Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *The American Journal of Clinical Nutrition*; **84**: 95-135.
- Hamilton RJ, Kalu C, Prisk E, Padley FB, Pierce H (1997). Chemistry of free radicals in lipids. *Food Chemistry*; **60 (2)**: 193-199.
- Han HI & Csallany AS (2009). Formation of toxic  $\alpha,\beta$ -unsaturated 4-hydroxy-aldehydes in thermally oxidized fatty acid methyl esters. *Journal of American Oil Chemist's Society*; **86**: 253-260.

- Han NM & May CY (2012). Chromatographic analysis of tocopherols and tocotrienols in palm oil. *Journal of Chromatographic Science*, **50**: 283-286.
- Hernandez E (2005). Production, processing and refining of oils. In *Healthful Lipids*; Akoh, C.C.; Lai M, eds.; AOCS Press: Illinois, 2005, cap. 3.
- Holoom R, Ververis K, Karagiannis T (2012). Mechanisms of action of phenolic compounds in olive. *Journal of dietary supplements*; **9 (2)**: 96-109.
- Hoshina R, endo Y, Fujimoto K (2004). Effect of triacylglycerol structures on the thermal oxidative stability of edible oil. *Journal of American Oil Chemist's Society*; **81 (5)**: 461-465.
- Hu FB & Stampfer MJ (1999). Nut consumption and risk of coronary heart disease: a review of epidemiologic evidence. *Current Atherosclerosis Reports*; **3**: 204-209.
- Hu FB, Manson JE, Willet WC (2001). Types of dietary fat and risk of coronary heart disease: A critical review. *Journal of The American College of Nutrition*; **20 (1)**: 5-19.
- Huang D, Ou B, Prior R (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; **53**: 1841-1856.
- Huang SW, Frankel EN, German JB (1994). Antioxidant activity of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -tocopherols in bulk oils and in oil water emulsions. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; **42**: 2108-2114.
- Huang SW, Frankel EN, German JB (1995). Effects of Individual Tocopherols and Tocopherol Mixtures on the Oxidative Stability of Corn Oil Triglycerides. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; **43**: 2345-50.
- Huang W, Niu H, Shi B, Yang M, Jiang J (2008). HPLC coupled with ion trap MS/MS for analysis of tertiary butylhydroquinone in edible oil samples. *Journal of Food Lipids*; **15**: 1-12.
- Hunter SC & Cahoon EB (2007). Enhancing vitamin E in oilseeds: unraveling tocopherol and tocotrienol biosynthesis. *Lipids*; **42**: 97-108.
- Iqbal S & Bhangar MI (2007). Stabilization of sunflower oil by garlic extract during accelerated storage. *Food Chemistry*; **100**: 246-254.
- Isnardy B, Wagner KH, Elmadfa I (2003). Effects of  $\alpha$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -Tocopherols on the Autoxidation of Purified Rapeseed Oil Triacylglycerols in a System Containing Low Oxygen. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; **51**: 7775-80.
- Jeong MK, Yeo JD, Jang EY, Kim MJ, Lee JH (2012). Aldehydes from oxidized lipids can react with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radicals in isooctane systems. *American Oil Chemist's Society*; **89**: 1831-1838.

- Jeong MK, Yeo JD, Jang EY, Lee JH (2013). Monitoring of radical scavenging compounds from oxidized lipids (RSOL) by 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivatization in thermally oxidized linoleic acid and lard systems. *Journal of Food Science & Biotechnology*; **22 (S)**: 161-165.
- Jiang Q, Christen S, Shigenaga MK, Ames BN (2001).  $\gamma$ -Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention. *The American Journal of Clinical Nutrition*; **74**: 714-722.
- Kamal-Eldin (2006). Effect of fatty acids and tocopherols on the oxidative stability of vegetable oils. *European Journal of Lipid science and Technology*; **58**: 1051-1061.
- Kamal-Eldin A & Andersson R (1997). A multivariate study of the correlation between tocopherol content and fatty acid composition in vegetable oils. *Journal of American Oil Chemist's Society*; **74 (4)**: 375-380.
- Karadag A, Ozcelik B, Saner S (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Journal of Food Analysis Methods*; **2**: 41-60.
- Karupaiah T, Noor MI, Sundram K (2005). Dietary fatty acids and their influence on blood lipids and lipoproteins. Em *Healthful Lipids*; Akoh, C.C.; Lai M, eds.; AOCS Press: Illinois, 2005, cap. 9.
- Keys A (1970). Coronary heart disease in Seven Countries. *Circulation*; **41**: 186 – 195.
- Khadem S & Marles RJ (2010). Monocyclic phenolic acids; hydroxy- and polyhydroxybenzoic acids: occurrence and recent bioactivity studies. *Molecules*; **15**: 7985-8005.
- Kim H, Kim SG, Choi Y, Jeong HS, Lee J (2008). Changes in tocopherols, tocotrienols, and fatty acid contents in grape seed oils during oxidation. *Journal of American Oil Chemist's Society*; **85**: 487-489.
- Kim N & Choe E (2012). Singlet oxygen-related photooxidative stability and antioxidant changes of diacylglycerol-rich oil derived from mixture of olive and perilla oil. *Journal of Food Science*; **77**: 1185-1191.
- Kochhar OS & Henry JK (2009). Oxidative stability and shelf-life evaluation of selected culinary oils. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*; **60 (S7)**: 289-296.
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Etherton TD (2002). Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the
- Kritchevsky D (2002). Fats and oil in human health. In: *Food Lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology*. Editado por Akoh CC & Min DB. Nova Iorque.

- Kulas E & Ackman RG (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**: 1724-1729.
- La Rosa LA, Alvarez-Parrilla E, Shahidi F (2011). Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of Mexican Pecan (*carya illinoensis*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **59**: 152-162.
- La Vecchia C, Decarli A, Serafini M, Parpinel M, Bellico R, Galeone C, Bosetti C, Zucchetto A, Polesel J, Ligiou P, Negri E, Rossi M (2013). *International Journal of Cancer*; **133**: 1447-1452.
- Laguerre M, Bayrasy C, Panya A, Weiss J, McClements J, Lecomte J, Decker EA, Villeneuve P (2013). What makes good antioxidants in lipid-based systems? The next theories beyond the polar paradox. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; **in press**.
- Laguerre M, Lecomte J, Villeneuve P (2007). Evaluation of the stability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid research*; **46**: 244-282.
- Lanna AC, José IC, Oliveira MGA, Barros EG, Moreira MA (2005). Effect of temperature on polyunsaturated fatty acid accumulation in soybean seeds. *Brazilian Journal of Plant Physiology*; **17 (2)**: 213-22.
- Läubi MW & Bruttel PA (1986). Determination of oxidative stability of fat and oils: comparison between the active oxygen method (AOCS Cd 12-57) and the Rancimat method. *Journal of American Oil Chemist's Society*; **63 (6)**: 792-795.
- Lavedrini F, Ravel A, Poupard A, Alary J (1997). Effect of geographic origin, variety and storage on tocopherol concentrations in walnuts by HPLC. *Food Chemistry*; **58 (1/2)**: 135-140.
- Lee JM, Chung H, Chang PS, Lee JH (2007). Development of a method predicting the oxidative stability of edible oils using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). *Food Chemistry*; **103 (2)**: 662-669.
- Lepage G & Roy CC (1986). Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *Journal of Lipid Research*; **27**: 114-20.
- Li C, Yao Y, Zhao G, Cheng W, Liu H, Liu C, Shi Z, Chen Y, Wang S (2011). Comparison and analysis of fatty acids, sterols, and tocopherols in eight vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **59**: 12493-12498.
- Lindley MG (1998). The impact of food processing on antioxidants in vegetable oils, fruits and vegetables. *Trends in Food Science & Technology*; **9**: 336-340.

- Lopez-Huertas E (2010). Health effects of oleic acid and long-chain omega-3 fatty acids (EPA + DHA) enriched milks. A review of intervention studies. *Pharmacological Research*; **61 (3)**: 200-207.
- Madawala SRP, Kochhar SP, Dutta PC (2012). Lipid components and oxidative status of selected specialty oils. *Grasas y Aceite*; **63 (2)**: 143-151.
- Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta*; **613**: 1-19.
- Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta*; **613**: 1-19.
- Mai LW & Ness MR (1999). Canonical correlation analysis of customers satisfaction and future of mail-order speciality food. *British Food Journal*; **101**: 857-870.
- Makinen M, Kamal-Eldin A, Lampi AMa, Hopia A (2000). Effects of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -Tocopherols on Formation of Hydroperoxides and Two Decomposition Products from Methyl Linoleate. *Journal of American Oil Chemistry Society*; **77**: 801-06.
- Marmesat S, Morales A, Velasco J, Dobarganes MC (2012). Influence of fatty acids composition on chemical changes in blends of sunflower oils during thermoxidation and frying. *Food Chemistry*; **135**: 2333-2339.
- Martin CA, Almeida VV, Ruiz MR, Visentainer JEL, Matshushita M, Souza NE, Visentainer JV (2006). Ácidos graxos poliinsaturados  $\omega$ 3 e  $\omega$ 6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*; **19 (6)**: 761-770.
- Matson FH & Grundy SM (1985). Comparison of effects of dietary saturated, mono-unsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *Journal of Lipid Research*; **26**: 194-202.
- Merril LI, Pike AO, Ogden LV, Dunn ML (2008). Oxidative stability of conventional and high-oleic vegetable oils with added antioxidants. *Journal of American Oil Chemist's Society*; **85**: 771-776.
- Min DB & Boff JM (2008). Lipid oxidation of edible oil. Em *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*; Akoh, C.C.; Min, D.B., eds.; CRC Press: Florida, 2008, cap. 11.
- Miraliakbari & Shahidi (2008a). Lipid class compositions, tocopherols and sterol of tree nut oils extracted with different solvents. *Journal of Food Lipids*; **15**: 81-96.

- Miraliakbari & Shahidi (2008b). Oxidative stability of tree nut oils. *Journal of agricultural and food chemistry*; **56**: 4751-4759.
- Miraliakbari & Shahidi (2008c). Antioxidant activity of minor components of tree nut oils. *Food Chemistry*; **111**: 421-427.
- Moayedi A, Rezaei K, Moini S, Keshavarz B (2011). Chemical composition of oils from several wild almond species. *Journal of American Oil Chemist's Society*; **88**: 503-508.
- Mondini L & Monteiro CA (1994). Mudanças no padrão de alimentação da população urbana brasileira (1962-1988). *Revista de Saúde Pública*; **28(6)**:433-39.
- Mutihac L & Mutihac R (2008). Mining in chemometrics. *Analytica Chimica Acta*; **612**: 1-18.
- Niki E & Traber MG (2012). History of vitamin E. *Annals of Nutrition & Metabolism*; **61**: 207-212.
- Ninfali P, Aluigi G, Bacchiocca M, Magnani M (2001). Antioxidant Capacity of Extra-Virgin Olive Oils. *Journal of American Oil Chemist's Society*; **78**: 243-47.
- Ninfali P, Bacchiocca M, Biagiotta E, Serveli M, Montedoro G (2002). Validation of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) parameter as a new index of quality and stability of virgin olive oil. *Journal of American Oil Chemist's Society*; **79**: 977-982.
- Nogala-Kalucka M, Korczak J, Dratwia M, Lampart-Szczapa E, Siger A, Buchowski M (2005). Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. *Food Chemistry*; **93**: 227-235.
- OECD-FAO (2011). Oilseeds and oilseeds products. *Agricultural outlook 2011-2020*. <http://www.oecd.org/site/oecd-faoagriculturaloutlook/48202074.pdf>. Acesso em 20.03.2012.
- Oil World (2013). Oils & Fats. *Oil World Annual 2013*. <http://www.oilworld.biz/annual> . Acesso em 10/03/2013.
- Orem A, Yucesan FB, Orem C, Akcan B, Kural BV, Alasalvar C, Shahidi F (2013). Hazelnut-enriched diets improves cardiovascular risk biomarkers beyond a lipid lowering effect in hypercholesterolemic subjects. *Journal of Clinical Lipidology*; **7**: 123-131.
- Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F (2003). Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils

- Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *Journal of Nutrition*; **133(9)**: 2812-19.
- Pérez-Jiménez J & Saura-Calixto F (2006). Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*; **39**: 791–800.
- Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, Díaz- Rubio ME, Serrano J, Goñi I , Saura-Calixto F (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*; **41**: 274–85.
- Perona JS, Cabello-Moruno R, Ruiz-Gutierrez V (2006). The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *Journal of Nutritional Biochemistry*; **17**: 429-445.
- Pitsavos C, Panagiotakos DB, Tzima N, Chrysohoou C, Economou M, Zampelas A, Stefanadis C (2005). Adherence to the mediterranean diet is associated with total antioxidant capacity in healthy adults: the ATTICA study. *The American Journal of Clinical Nutrition*; **82**: 694-699.
- Prado ACP, Manion BA, Seetharaman K, Deschamps FC, Arellano DB, Block JM (2013). Relationship between antioxidant properties and chemical composition of the oil and the shell of pecan nuts [*Caryaillinoensis* (Wangenh) C.Koch]. *Industrial Crops and Products*; **45**: 64-73.
- Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *The American Journal of Medicine*; **113 (9B)**: 71S:88S.
- Prior RL, Wu X, Schaich K (2005). Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; **53**: 4290-302.
- Psomiadou E & Tsimidou M (2002). Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **50**: 716-721.
- Quinn LA & Tang HH (1996). Antioxidant properties of phenolic compounds in macadamia nuts. *Journal of the American Oil Chemist's Society*; **73 (11)**: 1585-1588.
- Ramalho VC & Jorge N (2006). Antioxidants utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*; **29 (4)**: 755-760.
- Rani A, Kumar V, Verma SK, Shakya AK, Chauhan GS (2007). Tocopherol content and profile of soybean genotypic variability and correlation studies. *Journal of the American Oil Chemist's Society*; **84**: 377-383.
- Rastrelli L, Passi S, Ippolito F, Vacca G, de Simone F (2002). Rate of degradation of  $\alpha$ -tocopherol, squalene, phenolics, and polyunsaturated fatty acids in olive

- oil during different storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **50**: 5566-5570.
- Renaud S, Lorgeril M, Delaye J, Guidollet J, Jacquard F, Mamelle JLM, Monjaud I, Salen P, Toubol P (1995). Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*; **61 (suppl)**: 1360S-1367S.
- Rencher AC (2002). *Methods of multivariate analysis*. 2<sup>o</sup> edição. Canadá: Wiley-Interscience, 2002, 695.
- Rice-Evans CA, Nicholas JM, Pagana G (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*; **20 (7)**: 993-956.
- Robbins KS, Shin EC, Shewfelt RL, Eitenmiller RR, Pegg RB (2011). Update on the healthful lipid constituents of commercially important tree nuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **59**: 12083-12092.
- Robbins R (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **51**: 2866-2887.
- Roman O, Heyd B, Broyart B, Castillo R, Maillard MN (2013). Oxidative reactivity of unsaturated fatty acids from sunflower, high oleic sunflower and rapeseed oils subjected to heat treatment, under controlled conditions. *Food Science and Technology*; **52**: 49-59.
- Rossi M, Alamprese C, Ratti S (2007). Tocopherols and tocotrienols as free radical-scavengers in refined vegetable oils and their stability during deep-fat frying. *Food Chemistry*; **102**: 812-817.
- Ruiz-Gutiérrez V, Muriana FJG, Guerrero A, Cert AM, Villar J (1997). Role of dietary oleic acid from two different sources on fatty acid composition of erythrocyte membrane and blood pressure in health subjects. *Nutritional Biochemistry*; **8**: 689-695.
- Rukmini A & Raharjo (2010). Pattern of peroxide value changes in virgin coconut oil (VCO) due to photo-oxidation sensitized by chlorophyll. *Journal of American Oil Chemist's Society*; **87**: 1407-1412.
- Saad Bahrudin, Sing YY, Nawi MA, Hashim NH, Ali ASM, Saleh MI, Sulaiman SF, Talib KM, Ahmad K (2007). Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reverse-phase HPLC. *Food Chemistry*; **105**: 389-394.
- Sacchi R, Savarese M, Del Regno A, Paduano A, Terminiello R, Ambrosino ML (2008). Shelf life of vegetable oils bottled in different scavenging polyethyleneterephthalate (PET) containers. *Packaging Technology and Science*; **21**: 269-277.

- Saldeen K & Saldeen T (2005). Importance of tocopherols beyond  $\alpha$ -tocopherol: evidence from animal and human studies. *Nutrition Research*; **25**: 877–89.
- Sánchez CS, Gonzáles TAM, García-Parrilla MC, Granados JJQ, la Serrana HLG, Martínez MCL (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*; **593**: 103-107.
- Savage GP, Dutta PC, McNeil DL (1999). Fatty acid and tocopherol contents and oxidative stability of walnuts oils. *Journal of American oil Chemist's Society*; **76 (9)**: 1059-1063.
- Schneider C (2009). An update on products and mechanisms of lipid peroxidation. *Molecular Nutrition Food Research*; **53**: 315-321.
- Schroeder MT, Becker EM, Skibsted LH (2006). Molecular Mechanism of Antioxidant Synergism of Tocotrienols and Carotenoids in Palm Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **54(9)**: 3445-3453.
- Sen CK, Khanna S, Roy S (2006). Tocotrienols: vitamin E beyond tocopherols. *Life Sciences*; **78**: 2088-98.
- Seppanen CM & Csallany SA (2002). Formation of 4-hydroxynonenal, a toxic aldehyde, in soybean oil at frying temperature. *Journal of American oil Chemist's Society*; **79 (10)**: 1033-1038.
- Seppanen CM, Song Q, Csallany AS (2010). The antioxidant functions of tocopherol and tocotrienol homologues in oils, fats, and food systems. *Journal of American Oil Chemist' Society*; **87**: 469-481.
- Servili M, Esposito S, Fabiani R, Urbani S, Taticchi A, Mariucci F, Selvaggini R, Montedoro GF (2009). Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*; **17**: 76–84.
- Shahidi F & Zhong Y (2010a). Lipid oxidation and improving the oxidative stability. *Chemical Society Reviews*; **39**: 4067-4079.
- Shahidi F & Zhong Y (2010b) Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. *European Journal of Lipid Science and Technology*; **112**: 930-940.
- Shantha NC (1992). Gas chromatography of fatty acids. *Journal of chromatography*; **624**: 37-51.
- Siger A, Nogala-Kalucka M, Lampart-Szczapa (2008). The content and antioxidant activity of phenolic compounds in cold-pressed plant oils. *Journal of Food Lipids*; **15**: 137-149.

- Silva FAM, Borges MFM, Ferreira MA (1999). Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*; **22(1)**: 94-103.
- Silvagni A, Franco L, Bagno A, Rastrelli F (2010). Thermoinduced lipid oxidation of culinary oil: a kinetic study of the oxidation products by magnetic resonance spectroscopies. *Journal of Physical Chemistry*; **114**: 10059-10065.
- Simopoulos AP (2006). Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega 3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*; **60**: 502-507.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*; **299**: 152-178.
- Somogyi A, Rosta K, Pusztai P, Tulassay Z, Nagy G (2007). Antioxidant measurements. *Physiological Measurement*; **28**: R41–R55.
- Sutherland WHF, Williams MJA, Jong SA, McCormick MP (2007). Ingestion of moderately thermally oxidized polyunsaturated fat decreases serum resistance to oxidation in men with coronary artery disease. *Nutrition Research*; **27**: 265-272.
- Szydłowska-Czeraniak A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G, Szlyk E (2008b). Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta*; **76 (4)**: 899-905.
- Szydłowska-Czeraniak A, Karlovits G, Dianoczki C, Recseg K, Szlyk E (2008a). Comparison of Two Analytical Methods for Assessing Antioxidant Capacity of Rapeseed and Olive Oils. *Journal of American Oil Chemist's Society*; **85**: 141–49.
- Tabee E, Damirchi SA, Jägerstad M, Dutta PC (2008). Effects of  $\alpha$ -tocopherol on oxidative stability and phytosterol oxidation during heating in some regular and high-oleic vegetable oils. *Journal of American Oils Chemist's Society*; **85**: 857-867.
- Tan B & Brzuskiwicz L (1989). Separation of tocopherol and tocotrienol isomers using normal- and reverse-phase liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*; **180 (2)**: 368-373.
- Torres M, Martínez M, Pierantozzi P, Albanese M, Nasjleti A, Maestri D (2011). Contribution of compositional parameters to the oxidative stability of olive and walnut oil blends. *Journal of American Oils Chemist's Society*; **88**: 755-762.
- Tsao R (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients*; **2**: 1231-1246.

- Tuberoso CIG, Kowalczyk A, Sarritu E, Cabras P (2007). Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chemistry*; **103**: 1494-1501.
- Valavanidis A, Nisiotou C, Papageorgiou Y, Kremli I, Satravelas N, Zinieris N, Zygalki H (2004). Comparison of the Radical Scavenging Potential of Polar and Lipidic Fractions of Olive Oil and Other Vegetable Oils under Normal Conditions and after Thermal Treatment. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; **52**: 2358-65.
- Vega-López S, Ausman LM, Jalbert SM, Erkkila AT, Lichtenstein AH (2006). Palm and partially hydrogenated soybean oils adversely alter lipoprotein profiles compared with soybean and canola oils in moderately hyperlipidemic subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*; **84**: 56: 62.
- Velasco J & Dobarganes C (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*; **104 (9/10)**: 661-676.
- Venkatachalam M & Sathe SK (2006). Chemical composition of selected edible nut seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **54**: 4705-4714.
- Vujasinovic V, Djilas S, Dimic E, Romanic R, Takaci A (2010). Shelf life of cold-pressed pumpkin (*Cucurbita pepo* L) seed oil obtained with screw press. *Journal of American Oil Chemist's Society*; **87**: 1947-1505.
- Wagner KH, Elmadfa I (2000). Effects of tocopherols and their mixtures on the oxidative stability of olive oil and linseed oil under heating. *European Journal of Lipid Science and Technology*; **102**: 624-629.
- Wall MM (2010). Functional lipid characteristics, oxidative stability, and antioxidant activity of macadamia nut (*Macadamia integrifolia*) cultivars. *Food Chemistry*; **121**: 1103-1108.
- Wall R, Ross RP, Fitzgerald GF, Stanton C (2010). Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids. *Nutrition Reviews*; **68 (5)**: 280-289.
- Wanasundara UN & Shahidi F (1994). Canola Extract as an Alternative Natural Antioxidant for Canola Oil. *Journal of American Oil Chemist' Society*; **71(8)**: 817-822.
- Wang L & Weller CL (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*; **17**: 300-312.
- Wang S, Hwang H, Yoon S, Choe Eunok (2010). Temperature dependence of autoxidation of perilla oil and tocopherol degradation. *Journal of Food Science*; **75**: C498- C505.

- Warner K & Moser J (2009). Frying stability of purified mid-oleic sunflower oil triacylglycerols with added pure tocopherols and tocopherol mixture. *Journal of American Oil Chemist' Society*; **86**: 1199-1207.
- Wolf RL, Bayard CC, Fabien RJ (1995). Evaluation of sequential methods for determination of butterfat fatty acid composition with emphasis on trans-18:1 acids. Application to the study of seasonal variation on fresh butter. *Journal of American Oil Chemist' Society*; **72(12)**: 1471-83.
- Wong RSY & Radhakrishnan AK (2012). Tocotrienol research: past into present. *Nutrition Reviews*; **70 (9)**: 483-490.
- Wu X, Gu L, Holden J, Haytowitz DB, Gebhardt SE, Beecher G (2004). Development of a database for total antioxidant capacity in foods: a preliminary study. *Journal of Food Composition and Analysis*; **17**: 407-422.
- Yang J (2009). Brazil nuts and associated health benefits: A review. *Food Science and Technology*; **42**: 1573-1580.
- Yoshida Y, Niki E, Noguchi N (2003). Comparative study on the action of tocopherols and tocotrienols as antioxidant: chemical and physical effects. *Chemistry and Physics of Lipids*; **123**: 63-75.
- Yoshida Y, Saito Y, Jones LS, Shigeri Y (2007). Chemical reactivities and physical effects in comparison between tocopherols and tocotrienols: physiological significance and prospects as antioxidants. *Journal of Bioscience and Bioengineering*; **104(6)**: 439-45.
- Zajdenweg C, Branco GF, Alamed J, Decker EA, Castro IA (2011). Correlation between sensory and chemical markers in the evaluation of Brazil nut oxidative shelf-life. *European Research Technology*, **233**: 109-116.
- Zárate J, Goicoechea E, Pascual J, Echevarría E, Guillén MD (2009). A study of the toxic effect of oxidized sunflower oil containing 4-hydroperoxy-2-nonenal and 4-hydroxy-2-nonenal on cortical TrkA receptor expression in rat. *Nutritional Neuroscience*; **12**: 249-259.
- Zatonski W, Campos H, Willett W (2008). Rapid declines in coronary heart disease mortality in Eastern Europe are associated with increased consumption of oils rich in alpha-linolenic acid. *European Journal of Epidemiology*; **23**: 3-10.
- Zhong Y & Shahidi F (2012). Antioxidant behavior in bulk oil: limitations of polar paradox theory. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; **60**: 4-6.