

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANDRESSA HOINATSKI DE ARAUJO

Processo limpo de incorporação de antioxidantes do orégano e do gengibre em
óleo de canola

Maringá

2015

ANDRESSA HOINATSKI DE ARAUJO

Processo limpo de incorporação de antioxidantes do orégano e do gengibre em
óleo de canola

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau

Coorientador: Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer

Maringá

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

A663p Araujo, Andressa Hoinatski de
Processo limpo de incorporação de antioxidantes
do orégano e do gengibre em óleo de canola /
Andressa Hoinatski de Araujo. -- Maringá, 2015.
60 f. : il. color., figs., tabs.,

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau.
Coorientador: Prof. Dr. Jesuí Vergílio
Visentainer.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de
Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

1. Cromatografia líquida de alta eficiência -
Espectrometria de massas (CLAE-EM). 2. Óleo de
canola - Oxidação lipídica. 3. Orégano (*Origanum
vulgare*) - Atividade antioxidante. 4. Gengibre
(*Zingiber officinale*) - Atividade antioxidante 5.
Química verde. 6. Solvent free. I. Pilau, Eduardo
Jorge, orient. II. Visentainer, Jesuí Vergílio,
coorient. III. Universidade Estadual de Maringá.
Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química.
Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDD 21.ed. 543.0894

MN-003141



Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Andressa Hoinatski de Araujo**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 20 de março de 2015.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau
Presidente - DQI/UEM

Prof. Dr. Jesu Vergilio Visentainer
Membro - DQI/UEM

Prof. Dr. Marcio Pozzobon Pedroso
Membro - UFLA

Dedico este trabalho aos meus pais,
Wilma e Celso que, com muito carinho e
apoio, não mediram esforços para que eu
chegasse até esta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me abençoar todos os dias com vida, saúde, família e amigos, e por me dar forças para prosseguir na minha caminhada.

Ao meu pai Celso Araujo e minha mãe Wima Hoinatski de Araujo, que sempre acreditaram nos meus sonhos e nunca mediram esforços para que eu pudesse realizá-los. À minha irmã Vanessa pela companhia e ajuda nas horas difíceis, e à Babi e ao Juca, que são minha alegria de todos os dias.

Ao meu orientador Prof. Eduardo Jorge Pilau, que acredito ter caído dos céus. Obrigada Professor, por me orientar neste trabalho, e por apostar e acreditar em mim em momentos que nem eu acreditei.

Aos amigos do grupo LaBioMass, Evandro, Patrícia, Franciel, Thais, principalmente à Carla Porto e Alexandre, por toda ajuda e apoio. Não teria conseguido sem vocês.

À amiga Nayara, que mesmo tão longe, esteve sempre por perto. Obrigada amiga por sempre encontrar conforto e incentivo em suas palavras.

Ao Prof. Jesuí Vergílio Visentainer e seus Grupos de Pesquisa CromAlimentos e APPLE-A, e à aluna Maria Eugênia, por ceder tempo e espaço de laboratório para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Maringá, que me proporcionou o acesso ao Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

*“Revela ao SENHOR tuas tarefas, e teus projetos se
realizarão.”*

Provérbios 16 - 3

Processo limpo de incorporação de antioxidantes do orégano e do gengibre em óleo de canola

RESUMO

O óleo de canola vem despertando grande interesse devido a sua composição em ácidos graxos, como os ácidos oleico, linoleico e α -linolênico, apontados como benéficos para a saúde, além de possuir baixíssima quantidade de gordura saturada. Porém, este óleo ainda é pouco estudado. A fim de prolongar a vida útil de alimentos, a indústria alimentícia faz uso de antioxidantes. A adição desses compostos sintéticos está em desuso por apresentar riscos à saúde, assim, há um aumento na busca por antioxidantes provenientes de fontes naturais. O processo de extração/obtenção de antioxidantes é realizado por meio do uso de solventes orgânicos, tendo o metanol e o etanol como os solventes mais amplamente e comumente utilizados. Esses solventes, além de alto custo, possuem propriedades perigosas e tóxicas, e seu uso deve ser restrito. Sendo assim, neste estudo foram explorados antioxidantes naturais provenientes do orégano e do gengibre, incorporados em óleo de canola de forma direta, sem o uso de solventes orgânicos, processo conhecido como “*solvent free*”.

A capacidade antioxidante dos óleos de canola com especiarias foi avaliada pelo método de absorção dos radicais oxigenados (ORAC_{FL}) de compostos hidrofílicos (H-ORAC_{FL}) e compostos lipofílicos (L-ORAC_{FL}). O óleo de canola contendo orégano apresentou a maior capacidade antioxidante ($832 \pm 12,8$ umol TE g⁻¹) seguido do óleo de canola contendo gengibre ($137 \pm 15,8$ umol TE g⁻¹) na concentração de 5,0 g de especiarias por 100,0 g de óleo de canola. As análises do Oxitest® e TBARS comprovaram a eficácia dos antioxidantes do orégano e gengibre na proteção de óleo de canola contra a oxidação lipídica, e os resultados obtidos utilizando CLAE-EM e CLAE-EM/EM confirmou a eficiência da extração/incorporação direta de antioxidantes em óleo de canola utilizando um processo verde de extração e identificação total de 9 compostos antioxidantes provenientes do orégano e gengibre.

Palavras-chave: CLAE-EM, ORAC, capacidade antioxidante, Oxitest®, TBARS, química verde.

Processo limpo de incorporação de antioxidantes do orégano e do gengibre em óleo de canola

ABSTRACT

Canola oil is very interest because the composition of fatty acid reports as beneficial to health. However, this oil has been little studied. In order to prolong the shelf life of food, the food industry adds synthetic antioxidants in foods. However, it's in disuse for presenting health risks, so there is an increase to search antioxidants from natural sources. The extraction/obtain process of antioxidants is made through the use of organic solvents, like methanol and ethanol. These solvents are expensive, have hazardous and toxic properties, and its use should be restricted. Therefore, in this study natural antioxidants from oregano and ginger were incorporated into canola oil directly, without using organic solvents, known like "solvent free" process.

The antioxidant capacity of the canola oils with spices was evaluated by Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC_{FL}) method of hydrophilic compounds (H-ORAC_{FL}) and lipophilic compounds (L-ORAC_{FL}), and the highest antioxidant capacity was of the samples containing oregano ($832 \pm 12.8 \mu\text{mol TE g}^{-1}$) and ginger ($137 \pm 15.8 \mu\text{mol TE g}^{-1}$) in the concentration of 5.0 g of spices per 100.0 g of canola oil. Oxitent[®] and TBARS analysis proved the efficiency of antioxidants from oregano and ginger in the protection of canola oil against lipid oxidation, and the results obtained using HPLC-MS and HPLC-MS/MS confirmed the efficiency of the extraction/incorporation direct of antioxidants in canola oil using a green extraction process and identification of a total of 9 antioxidant compounds from oregano and ginger.

Keywords: HPLC-MS, ORAC, antioxidant capacity, Oxitest[®], TBARS, green chemistry, solvent free.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema das reações de oxidação lipídica.....	16
Figura 2. Mecanismo de ação para os antioxidantes primários.....	17
Figura 3. Estruturas dos antioxidantes sintéticos	18
Figura 4. Estrutura dos tocoferóis.....	19
Figura 5. Estruturas químicas dos principais ácidos benzóicos.....	20
Figura 6. Estrutura dos principais ácidos cinâmicos.	20
Figura 7. Estrutura química do ácido o-cumárico e das cumarinas.....	21
Figura 8. Reação de oxidação da fluoresceína do método ORAC.	24
Figura 9. Decaimento da curva de fluoresceína no ensaio ORAC	24
Figura 10. Equipamento utilizado para estudos de indução do ponto de rancificação de óleos. (Oxitest [®]).....	26
Figura 11. Exemplo de gráfico gerado pelo Oxitest [®]	26
Figura 12. Reação do teste TBARS entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído	27
Figura 13. Ficha utilizada para avaliação da aceitabilidade das nove amostras de óleo de canola.	32
Figura 14. Resultado de ORAC para as amostras de óleo de canola aromatizado com maior aceitabilidade na avaliação sensorial.....	33
Figura 15. Óleo de canola bruto/controle (C), e com adição de orégano nas concentrações de 2,5 g 100 g ⁻¹ (1), 5,0 g 100 g ⁻¹ (2) e 10,0 g 100 g ⁻¹ (3).	39
Figura 16. Óleo de canola bruto/controle (C), e com adição de gengibre nas concentrações de 2,5 g 100 g ⁻¹ (1), 5,0 g 100 g ⁻¹ (2) e 10,0 g 100 g ⁻¹ (3).	39
Figura 17. Tempos de indução para as análises de rancificação do óleo de canola. Média dos valores ± desvio padrão; n=3. Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0,05	40
Figura 18. Curva de calibração do teste TBARS expressa em mg MA L ⁻¹	42
Figura 19. Cromatogramas dos extratos metanólicos do orégano (A) e do gengibre (B).	43

Figura 20. Cromatogramas dos extratos metanólicos dos óleos de canola bruto (A), óleo contendo orégano (B) e óleo contendo gengibre (C).	44
Figura 21. Cromatogramas dos extratos metanólicos do orégano (A) e do óleo de canola com orégano (B).....	45
Figura 22. Cromatogramas dos extratos metanólicos do gengibre (A) e do óleo de canola com gengibre (B).....	45
Figura 23. Espectros de massas do pico de tempo de retenção 7,27 minutos dos cromatogramas dos extratos metanólicos do óleo de canola bruto (A), do óleo contendo orégano (B) e do orégano (C).....	46
Figura 24. Espectros de massas do pico de tempo de retenção 11,28 minutos dos cromatogramas dos extratos metanólicos do óleo de canola bruto (A), do óleo contendo gengibre (B) e do gengibre (C).	46
Figura 25. Cromatogramas da corrente iônica do íon $[M+H]^+$ m/z 271 dos extratos metanólicos do óleo de canola bruto (A), óleo de canola contendo orégano (B) e do orégano puro (C). Espectro de fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 271 referente a Apigenina (D).....	48
Figura 26. Cromatogramas de corrente iônica do íon $[M+H]^+$ m/z 277 dos extratos metanólicos do óleo de canola bruto (A), óleo de canola contendo gengibre (B) e do gengibre (C). Espectro de fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 277 referente 6-shogaol (D).	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Médias das pontuações provenientes da avaliação sensorial dos óleos de canola aromatizados.....	32
Tabela 2. Gradiente de eluição utilizado na separação dos constituintes da amostra.	36
Tabela 3. Capacidade antioxidante das amostras de óleo de canola por meio do método ORAC.....	38
Tabela 4. Resultados obtidos pelo teste TBARS com óleo de canola sob refrigeração e abrigo da luz.	41
Tabela 5. Resultados obtidos pelo teste TBARS com óleo de canola após ensaio utilizando Oxitest por 24 horas.	41
Tabela 6. Principais antioxidantes presentes no orégano e no gengibre.	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Óleo de canola e seus benefícios	15
1.2. Oxidação lipídica	16
1.3. Compostos antioxidantes	17
1.4. Química verde e processo de extração de antioxidantes.....	21
1.5. Orégano (<i>Origanum vulgare</i> L.)	22
1.6. Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>).....	23
1.7. Capacidade de absorção dos radicais oxigenados.....	23
1.8. Oxitest®: ponto de indução de rancificação	26
1.9. Substâncias reativas do Ácido tiobarbitúrico.....	27
1.10. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM).....	27
2. OBJETIVOS	30
2.1. Objetivo Geral.....	30
2.2. Objetivos Específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1. Triagem.....	31
3.2. Amostragem.....	33
3.3. Incorporação dos antioxidantes do orégano e gengibre no óleo de canola.....	33
3.4. Análise da atividade antioxidante	34
3.5. Oxitest.....	35
3.6. Avaliação da oxidação de lipídios	35
3.7. Preparo das amostras para análise por CLAE-EM/EM	35
3.7.1 <i>Extrato metanólico do orégano e gengibre</i>	35
3.7.2 <i>Extrato metanólico do óleo de canola</i>	36
3.7.3 <i>Identificação dos compostos por CLAE-EM/EM</i>	36
3.8. Análise estatística	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5 CONCLUSÃO	51
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE ABREVIACOES

AAPH	Dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno
CAT	Capacidade antioxidante total
CLAE (CLAE/EM)	Cromatografia líquida de alta eficiência (acoplada ao espectrômetro de massas)
EM	Espectrometria de massas
MA	Malonaldeído
ORAC	Capacidade de absorção dos radicais oxigenados
PG	Galato de propila
TBA	cido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TBHQ	Terc-butil-hidroquinona

1. INTRODUÇÃO

1.1. Óleo de canola e seus benefícios

A canola (*Brassica napus* L. var *oleífera*) é uma oleaginosa pertencente à família das brassicaceas e ao gênero *Brassica*, e é uma modificação da colza contendo menos de 2% de ácido erúico (22:1n-9) no óleo e menos de 30 μmol de glucosinolatos por grama de farelo desengordurado, os quais são considerados inconvenientes para o desenvolvimento humano^{1,2}.

Na safra 2012/2013, a quantidade produzida de grãos de canola no mundo foi estimada em 60,63 milhões de toneladas, representando 13% da produção mundial de grãos de oleaginosas³, tendo como seus maiores produtores a União Europeia (19,21%), China (14,01%), Canadá (13,87%) e Índia (6,80%), os quais juntos responderam por 53,89% da produção mundial⁴. No Brasil a produção de canola ainda é baixa quando comparada com outros países. Porém, entre os anos de 2008 e 2011 teve um crescimento na sua produção atingindo 59.100 hectares (ha) de área plantada². O Rio Grande do Sul, principal estado produtor, atingiu sua maior área semeada em 2014, com 40.025 há³.

Conhecido e utilizado na cozinha de vários países, o óleo de canola é o terceiro óleo vegetal mais produzido e consumido no mundo, depois da palma e do óleo de soja⁵. É conhecido como uma excelente fonte de ácido linoleico (18:2n-6) e alfa-linolênico (18:3n-3), que são ácidos graxos poli-insaturados das famílias ômega-6 e ômega-3, respectivamente, conhecidos como essenciais por não poderem ser sintetizados pelo organismo humano, adquiridos por meio da dieta⁶. Os ácidos graxos poli-insaturados das famílias ômega-3 e ômega-6 trazem benefícios para a saúde humana, pois previnem enfermidades cardiovasculares, câncer de cólon, doenças imunológicas, favorecem o desenvolvimento cerebral e da retina e possuem características anti-inflamatórias^{7,8}.

Em virtude dessas suas qualidades, o óleo de canola tem conquistado espaço no mercado ano após ano e, inclusive, tem sido vendido a preços mais elevados⁹. Segundo Omidi e colaboradores¹⁰, o óleo de canola apresenta o menor teor de gordura saturada (7%) de qualquer óleo comestível comum. Dos ácidos graxos insaturados, é composto por 61% de ácido oleico (18:1n-9), 22% de ácido linoleico (18:2n-6) e 10% de ácido alfa-linolênico

(18:3n-3). Estudos^{11,12,13} evidenciam os benefícios associados ao consumo do óleo de canola, a reduzir o risco de cardiopatias vasculares, com a redução do colesterol total no sangue e da lipoproteína de baixa densidade (LDL), conhecido como “colesterol ruim”, devido a sua composição em ácidos graxos.

1.2. Oxidação lipídica

Devido à alta quantidade de ácidos graxos insaturados presentes no óleo de canola, os quais oxidam facilmente, torna-se necessária a adição de compostos antioxidantes para inibir os mecanismos de oxidação lipídica¹⁴.

A oxidação lipídica é um processo degradativo que ocorre quando o oxigênio atmosférico, ou aquele que está dissolvido no óleo, reage com ácidos graxos insaturados presentes no mesmo. As reações químicas envolvidas no processo de oxidação dos óleos são complexas e geram, em seus estágios mais avançados, produtos sensorialmente inaceitáveis, dentre eles, aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos¹⁴.

Segundo Araújo¹⁵, os lipídios podem ser oxidados por diferentes mecanismos. Dentre os mais comuns estão à auto-oxidação, as reações hidrolíticas, enzimáticas, e a fotoxidação.

A auto-oxidação é o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras. Este processo pode ser dividido em três etapas esquematizadas na Figura 1: iniciação, propagação e finalização¹⁶.

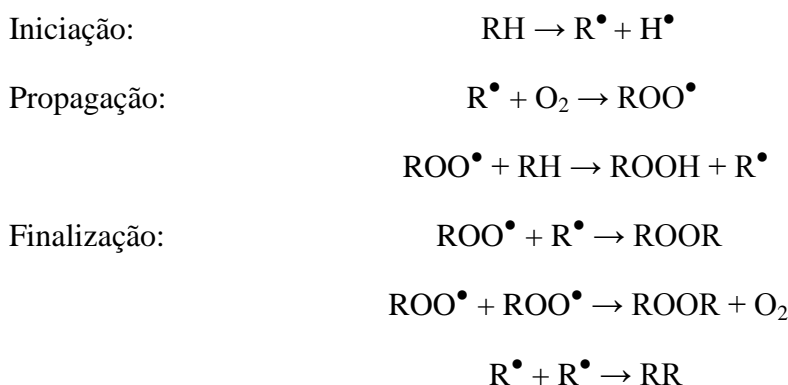


Figura 1. Esquema das reações de oxidação lipídica¹⁶

A etapa de iniciação consiste na quebra da ligação carbono-hidrogênio vizinho à dupla ligação da cadeia carbônica do ácido graxo (RH) com a formação de radicais livres (R[•]). Na

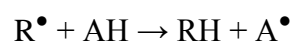
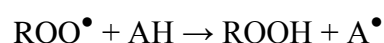
segunda etapa, a de propagação, o radical formado reage com o oxigênio, que por sua vez, reage com outra insaturação do ácido graxo, formando o hidroperóxido (ROOH) e um novo radical livre. Os radicais livres produzidos atuam como propagadores da reação, resultando em um processo autocatalítico. Na etapa de finalização, os radicais livres que reagem entre si juntamente com a decomposição dos hidroperóxidos produzem compostos carbonílicos como cetonas, aldeídos, ácidos carboxílicos, álcoois, éter e outros compostos orgânicos^{16,17}.

O efeito do antioxidante consiste na inativação dos radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução dos hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres e produtos de decomposição rançosos¹⁵.

A complexidade do processamento do alimento, aliada à necessidade de aumentar o período de armazenamento, torna o produto sujeito à deterioração oxidativa. Portanto, a utilização de substâncias químicas capazes de oferecer proteção contra a oxidação se faz necessária.

1.3. Compostos antioxidantes

Os antioxidantes, em sua maioria, são compostos aromáticos com finalidade de inibir ou retardar a oxidação de óleos e gorduras em alimentos gordurosos¹⁶. O mecanismo de ação dos antioxidantes, representado na Figura 2, baseia-se na doação de um elétron a um radical livre interrompendo a oxidação por ele provocada. Os antioxidantes transformam-se em radicais livres, porém, podem se estabilizar sem promover ou propagar reações de oxidação¹⁶.



onde: ROO[•] e R[•] são radicais livres; AH é um antioxidante ativo e A[•] é um radical inerte

Figura 2. Mecanismo de ação para os antioxidantes primários¹⁶.

Dentre as propriedades características dos antioxidantes descritas por Bailey¹⁸ estão, a eficácia em baixas concentrações, ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor, e em outras características do alimento, estabilidade durante o processamento e armazenamento, além da baixa toxicidade de seus produtos de oxidação.

Os antioxidantes sintéticos mais comumente utilizados na indústria de alimentos (Figura 3) são o butil-hidroxi-anisol (BHA), 2,6-di-terc-butil-4-hidroxitolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG)¹⁶.

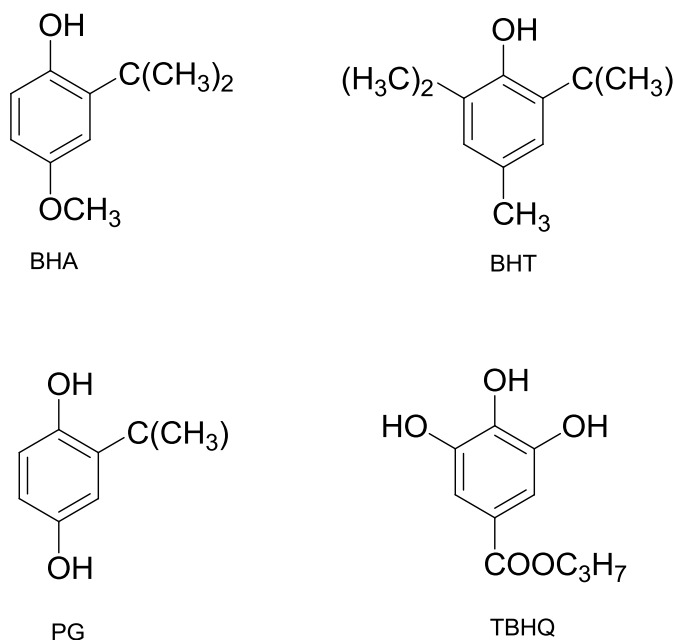


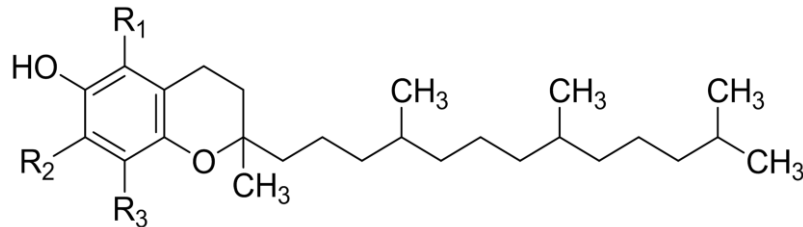
Figura 3. Estruturas dos antioxidantes sintéticos¹⁶

No Brasil, a ANVISA limita 200 mg Kg⁻¹ para o BHA (INS 320) e TBHQ (INS 319) e 100 mg Kg⁻¹ para BHT (INS 321) e PG (INS 310) como concentrações máximas permitidas em alimentos¹⁹. Pesquisas^{20,21,22} relacionadas à toxicologia indicam a possibilidade de antioxidantes sintéticos apresentarem efeitos carcinogênicos em experimentos com animais. Dessa forma, pesquisas têm sido desenvolvidas no sentido de explorar produtos naturais que permitam substituir ou serem associados aos antioxidantes sintéticos com finalidade de diminuir suas quantidades nos alimentos²³.

Estudos encontrados na literatura^{24,25} relatam que muitas são as vantagens da utilização de antioxidantes naturais provenientes de plantas alimentícias. Além de serem aceitos pelos consumidores, são considerados seguros e não precisam de testes de segurança, já que a maioria dessas substâncias já se encontram presentes em alimentos. Esses são obtidos a partir de recursos naturais com propriedades funcionais e propriedades sensoriais aceitáveis.

Dos antioxidantes naturais, os mais utilizados são os tocoferóis e os ácidos fenólicos¹⁶. Conhecidos como Vitamina E, os tocoferóis ocorrem em quatro diferentes compostos, α , β , γ e δ (*alfa*, *beta*, *gama* e *delta*), dependendo da localização dos grupos metila no anel

(Figura 4)²⁶. A atividade antioxidante relativa entre os diferentes compostos dos tocoferóis depende de vários parâmetros, como temperatura, composição e forma da gordura (líquida, emulsão) e concentração¹⁶.



α - tocoferol: $R_1 = R_2 = R_3 = \text{CH}_3$
 β - tocoferol: $R_1 = R_3 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$
 γ - tocoferol: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = R_3 = \text{CH}_3$
 δ - tocoferol: $R_1 = R_2 = \text{H}$; $R_3 = \text{CH}_3$

Figura 4. Estrutura dos tocoferóis.

Este grupo é associado à prevenção de doenças neurodegenerativas, aterosclerose, inflamação crônica, câncer e envelhecimento precoce, devido ao seu poder antioxidante e vitamínico²⁶.

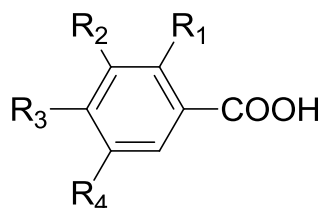
A legislação brasileira permite a adição de 300 mg Kg^{-1} de tocoferóis (INS 307) em alimentos como aditivos com função antioxidante¹⁹. Os tocoferóis são encontrados de forma natural em óleos vegetais, dentre eles o óleo de girassol, considerado o mais rico em α -tocopherol, seguido pelo de algodão, palma, canola, amendoim, oliva, milho, soja e coco²⁶.

Os ácidos fenólicos são caracterizados por possuírem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula²⁷. Devido ao poder destes compostos, de conferirem propriedades antioxidantes tanto para os alimentos como para o organismo, são indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças²⁷.

São divididos em três grupos: dos ácidos benzóicos (Figura 5), que possuem sete átomos de carbono ($\text{C}_6\text{-C}_1$) e são os mais simples encontrados na natureza. Ácidos cinâmicos

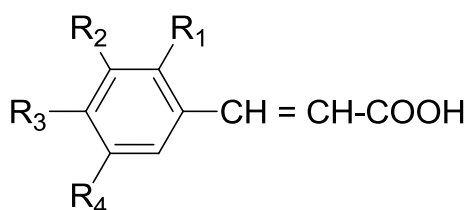
(figura6), que possuem nove átomos de carbono (C_6-C_3), e as cumarinas, obtidas por derivatização do ácido *o*-cumárico, por meio da ciclização da cadeia lateral (Figura 7)^{16,27}.

Os produtos intermediários formados por estes antioxidantes são relativamente estáveis, devido à ressonância do seu anel aromático¹⁷.



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

Figura 5. Estruturas químicas dos principais ácidos benzóicos.



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

Figura 6. Estrutura dos principais ácidos cinâmicos.

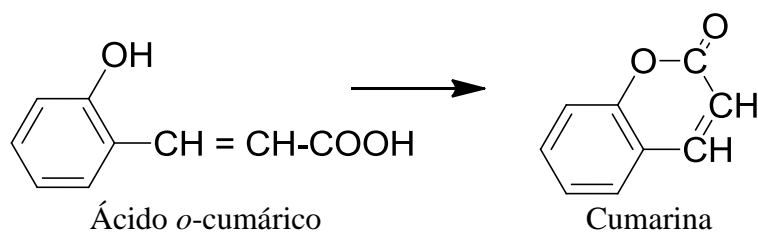


Figura 7. Estrutura química do ácido *o*-cumárico e das cumarinas.

1.4. Química verde e processo de extração de antioxidantes

Atualmente, a química tem uma vasta participação no desenvolvimento e produção de inúmeros produtos, que são fundamentais a humanidade. Porém, a produção química também gera alguns inconvenientes. Entre os maiores causadores de impacto ambiental encontra-se o tratamento inadequado ou, ainda, o não tratamento de resíduos gerados pela indústria química²⁸. Assim como os resíduos domésticos e industriais produzidos diariamente, a utilização de solventes perigosos e tóxicos em laboratórios é considerada um problema para a saúde e segurança dos trabalhadores e também para a poluição ambiental²⁹.

A linha de pensamento, que tem por objetivo tornar a química uma aliada do meio ambiente, é chamada de química verde, ou química limpa, química ambientalmente correta, ou ainda, química autossustentável²⁸. Um dos princípios da química verde, o da prevenção, frisa que a forma mais eficiente de minimizar o impacto ambiental de uma atividade industrial é prevenindo a produção de resíduos após sua geração, ao invés de tratá-los²⁸. Estudos^{30,31} buscam alternativas que evitem ou minimizem a produção de resíduos industriais, com a restrição do uso de solventes orgânicos nas linhas de produção industriais, método este, conhecido como “*solvent free*”.

Atualmente, o processo de obtenção dos antioxidantes através de extratos vegetais é feito via solventes orgânicos, como metanol, etanol, éter de petróleo, clorofórmio, entre outros²⁹. Esses solventes possuem propriedades perigosas e tóxicas, podendo causar efeitos adversos à saúde, além de ter alto custo, pois são, em sua maioria, derivados do petróleo²⁹.

Por exemplo, a exposição crônica ao metanol, um dos solventes mais utilizados para obtenção dos extratos, pode levar à intoxicação, causando inflamação dos olhos, dores de cabeça recorrentes, insônia, problemas de estômago, insuficiência visual, e dermatite³².

Nos dias de hoje, os alimentos orgânicos vem ganhando cada vez mais espaço no mercado. Cultivados e processados sem o uso de fertilizantes artificiais, pesticidas, herbicidas, fungicidas, reguladores de crescimento e aditivos, os alimentos orgânicos despertam interesse nos consumidores, que procuram consumir esses alimentos, visando á saúde, bem estar, e o meio ambiente³³.

Sendo assim, no caso dos produtos com adição de antioxidantes naturais, é mais fácil mostrar ao consumidor que o seu produto não contém resíduos dos solventes orgânicos utilizados na sua fabricação, quando estes não estão envolvidos no processo²⁸. Dessa forma, o método “*solvent free*” ganha destaque pra este fim.

1.5. Orégano (*Origanum vulgare* L.)

O Orégano (*Origanum vulgare*) é uma espécie nativa da Europa, do Mediterrâneo e do sul da Ásia Central. É uma erva perene e aromática, muito utilizada na cozinha como tempero devido ao seu aroma e sabor característico³⁴.

Esta especiaria é utilizada como uma planta medicinal com propriedades antibacteriana e antifúngica poderosas. Os compostos responsáveis por estas propriedades biológicas são os polifenóis, tais como ácido rosmarínico, o carvacrol, o ácido caféico e o timol³⁵. Estudos^{36,37} determinaram que estes compostos possuem poder anticancerígeno, antimicrobiano, antiviral, antimutagênica, anti-inflamatória e efeito sobre doenças cardiovascular.

Além destas propriedades citadas, o orégano é muito eficaz contra o retardamento da oxidação lipídica. Atuando como um antioxidante, previne todas as fases do processo oxidativo, incluindo o bloqueio da peroxidação lipídica dos fosfolipídeos das membranas das células, catalisada pelo ferro³⁸. Dentre a gama de antioxidantes presentes no orégano, o ácido rosmarínico é o que normalmente se encontra em maiores concentrações³⁸. O orégano é apontado também como fonte dos antioxidantes kaempferol, ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido caféico, ácido siríngico, entre outros³⁹.

Esta gama diversa das propriedades biológica e antioxidante do orégano torna essa especiaria muito interessante, e pesquisas^{40,41} visam a utilização de extratos e/ou do óleo essencial do orégano como aditivos em alimentos tanto para uso humano quanto para uso animal, a fim de aumentar a qualidade de seus produtos e torná-los mais saudáveis.

1.6. Gengibre (*Zingiber officinale*)

O gengibre (*Zingiber officinale*) é uma planta herbácea da família das Zingiberaceae, originária da ilha de Java, da Índia e da China. Utilizado como condimento e como erva medicinal desde a antiguidade pelos povos asiáticos, foi distribuído pelos continentes na era das grandes navegações e comércio de especiarias. O rizoma, parte comercial da planta, atualmente é comercializado in natura, em conserva, cristalizado, seco e em pó⁴².

É uma das especiarias mais populares e usadas mundialmente, devido ao seu aroma e sabor pungente⁴³. Ao longo dos anos, o gengibre tornou-se um importante medicamento para tratamento de gripe, distúrbios do sistema nervoso, infecções gengivais, dores de dente, asma, paralisia, desconforto gastrointestinal e diabetes⁴⁴.

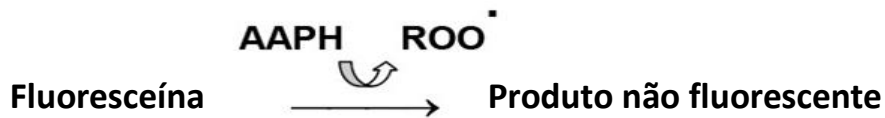
O óleo essencial do gengibre possui aplicação na indústria de alimentos como aromatizante e antioxidante, na indústria cosmética como fragrância e na indústria farmacêutica devido às propriedades anti-inflamatória, antibacteriana e antitumoral⁴⁵. Estudos^{42,46,47} evidenciam o uso de extrato de gengibre e comprovam a sua eficácia na inibição do processo carcinogênico em células cancerosas em experimentos realizados com animais. Dessa forma, o extrato de gengibre é apontado como um agente quimioterapêutico alternativo na prevenção e inibição do câncer. Mahady e colaboradores⁴⁸ mostram que o extrato de gengibre exerce efeito quimiopreventivo nos casos de gastrite e úlceras, provocados pela bactéria *Helicobacter pylori*.

Além disso, o gengibre também tem despertado bastante interesse devido a sua eficácia como antioxidante, cuja atividade é atribuída aos compostos conhecidos como gingerols, gingerdióis e shogaols^{43,49}. Devido à sua abundância, baixo custo, segurança no consumo e às suas propriedades biológicas e antioxidante, o gengibre despertou grande interesse nas indústrias alimentícia e farmacêutica, a fim de inovar seus produtos e levar aos consumidores os benefícios oferecidos por ele⁴².

1.7. Capacidade de absorção dos radicais oxigenados

A capacidade de absorção dos radicais oxigenados (ORAC, do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) é um método amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante em amostras biológicas e alimentos. O método determina a degradação oxidativa da molécula de fluoresceína (FL) na presença de geradores de radicais livres, tais como

compostos azo-iniciadores que são responsáveis por produzir o radical peróxil. À medida que a reação progride, a fluoresceína é consumida e a intensidade de fluorescência diminui (Figura 8)⁵⁰.



Figura

8. Reação de oxidação da fluoresceína do método ORAC.

Na presença de antioxidante, o decaimento da fluorescência é inibido, devido à reação entre os compostos antioxidantes com os radicais peróxil, interrompendo a oxidação provocada.

O grau de proteção é quantificado e atribuído à área líquida ($A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}$) entre as curvas de decaimento da fluorescência da amostra que contém o antioxidante com a amostra que não o contém, como ilustra a Figura 9. Os resultados são expressos como equivalente de Trolox, que é um análogo da vitamina E^{51,52}.

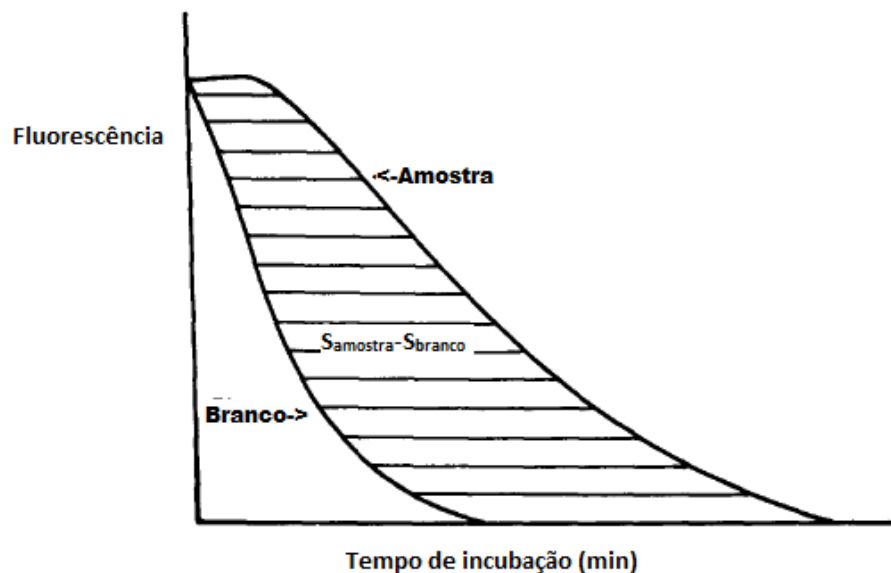


Figura 9. Decaimento da curva de fluoresceína no ensaio ORAC⁵¹

Huang e colaboradores⁵² foram os pioneiros no desenvolvimento do ensaio para componentes lipofílicos, utilizando β -ciclodextrina como um potencializador da solubilidade, o que permite mensurar a capacidade antioxidante de ambos os componentes de uma amostra, lipofílicos e hidrofílicos, e dessa forma, obter um valor total da capacidade antioxidante⁵³.

O ORAC_{FL} é uma técnica consolidada e de alta precisão, dentre outras vantagens pode-se destacar que é adaptável para inúmeras matrizes de amostras, incluindo plasma, tecido vegetal, alimentos entre outros, sendo capaz de quantificar antioxidantes não proteicos utilizando ácido perclórico, sulfato de amônio ou acetona nos procedimentos de extração⁵⁴.

1.8. Oxitest®: ponto de indução de rancificação

O Oxitest® (do inglês, *Oxidation Test Reactor*) fabricado pela Velp Scientifica (Figura 10) é um equipamento utilizado para determinar o período de indução de rancificação de lipídios, através da aceleração do processo de oxidação utilizando temperaturas elevadas (até 110 °C) e pressão de oxigênio ultra puro pré-determinada⁵⁵.



Figura 10. Equipamento utilizado para estudos de indução do ponto de rancificação de óleos. (Oxitest®)

O tempo necessário para que se iniciem as reações de oxidação da amostra é dito tempo ou período de indução de rancificação, e no Oxitest®, este tempo é determinado a partir da diminuição da pressão de oxigênio, por meio de duas tangentes (Figura 11).

Durante o processo oxidativo da gordura, o oxigênio é consumido, e esta diminuição da pressão de oxigênio nos permite obter informações úteis sobre a amostra, de modo acelerado, poupando tempo em relação a outras metodologias existentes, além de obter resultados mais precisos⁵⁶.

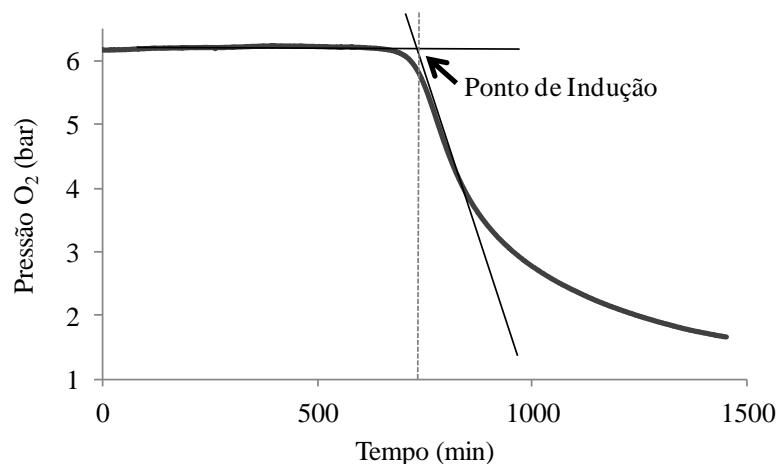


Figura 11. Exemplo de gráfico gerado pelo Oxitest®.

1.9. Substâncias reativas do Ácido tiobarbitúrico

O método TBARS (do inglês, *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*) é muito utilizado para avaliar o grau de oxidação em alimentos, por meio da quantificação das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBA). O TBA reage com o malonaldeído (MA), um produto secundário da peroxidação lipídica, em meio ácido e alta temperatura, produzindo um composto de cor vermelha, com absorvância ao redor de 532-535 nm⁵⁷. A formação do cromogênio envolve duas moléculas de TBA e uma de MA, iniciada pelo ataque nucleofílico entre o carbono 5 do TBA e o carbono 1 do MA, seguido de desidratação e reação similar do composto intermediário com uma segunda molécula de TBA (Figura 12)⁵⁸.

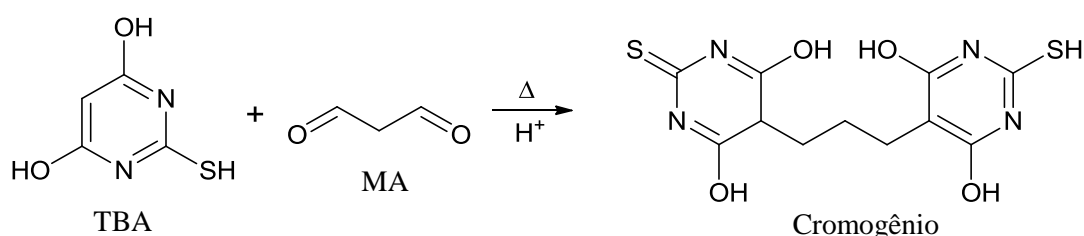


Figura 12. Reação do teste TBARS entre o ácido 2-tiobarbitúrico e o malonaldeído⁵⁹

A quantificação é feita a partir de curvas de calibração com concentrações conhecidas de malonaldeído. Esta é uma técnica rápida, sensível e de baixo custo, utilizada em uma variedade de sistemas complexos, como plasma, urina e soro, tendo grande utilidade na comparação de um único material em diferentes estágios de oxidação^{58, 59, 60}.

1.10. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

A cromatografia é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura. Ela está fundamentada na migração diferencial dos componentes, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis que estão em contato íntimo, a fase móvel e a fase estacionária⁶¹.

A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação, podendo ser utilizada, além da separação dos componentes de uma mistura, para a identificação de compostos, por comparação com

padrões previamente existentes e também para a purificação de compostos, separando as substâncias indesejáveis⁶¹.

A cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE) emprega colunas recheadas com materiais especialmente preparados e uma fase móvel, eluída sob altas pressões, o que permite uma redução no diâmetro das partículas da fase estacionária, no interior da coluna cromatográfica. Essa diminuição das partículas resulta em uma área superficial muito maior, o que promove uma separação mais eficiente dos componentes da amostra, além de permitir o uso de colunas menores, volumes menores de amostras, na faixa de microlitros (μL), e de fase móvel^{62,63}.

Esta técnica separa e analisa qualitativamente ou quantitativamente uma grande variedade de compostos em diversos tipos de amostras complexas, como sangue, urina, solo, alimentos, entre outros, com tempo reduzido de análise, alta resolução, eficiência e versatilidade⁶¹. Visto isto, os campos de utilização da CLAE são muitos, por exemplo, é utilizada para fins legais, médicos, indústrias e pesquisas.

Os detectores normalmente utilizados na CLAE são o detector espectrofotométrico (UV-Vis), por índice de refração, por fluorescência, eletroquímico e o espectrômetro de massas. Este último fornece um nível de detectabilidade muito maior quando acoplado ao CLAE, com apenas a desvantagem de ser de alto custo e necessitar de um operador capacitado⁶¹.

O espectrômetro de massas é constituído basicamente por três partes: fonte de ionização, analisador de massas e o detector, que são operados sob condições de alto vácuo. Uma vez formados os íons, eles são analisados pelo analisador de massas de acordo com as suas razão massa/carga (m/z)^{61,64}. Os métodos de ionização mais utilizados nos dias atuais são por *electrospray* (ESI) e ionização/dessorção a laser auxiliada por matriz (MALDI do inglês *Matrix-assisted laser desorption/ionization*)⁶⁵. Os analisadores mais comuns são: magnéticos e eletrostáticos, quadrupolos lineares, quadrupolos *ion trap* e tempo de voo. A detecção é feita por meio de multiplicador de elétrons⁶¹.

O desenvolvimento de novos equipamentos com capacidade de experimentos de espectrometria de massas sequencial (MS^n), tornou a espectrometria de massas uma das principais técnicas para caracterização de moléculas⁶⁵, sendo aplicada em análise ambiental, proteômica, metabolômica, aplicações clínicas e forense⁶⁴.

Na análise de antioxidantes, a CLAE tem-se mostrado muito eficiente, quando comparado, por exemplo, a cromatografia gasosa (CG), outro método de análise muito utilizado⁶⁶. Na CG, a amostra deve ser volátil e termicamente estável, já que o método utiliza temperaturas elevadas. Quando a amostra não possui essas características, é necessário fazer uma derivação⁶¹. Como os compostos antioxidantes do orégano e do gengibre são de baixa volatilidade e termicamente instáveis, a caracterização desses compostos via CG é inviável⁶⁴. Já na CLAE, o único requisito para a amostra, é que ela seja solúvel na fase móvel, por isso esta técnica se torna tão interessante para este tipo de análise⁶¹.

Ultimamente, muitos estudos^{39, 64, 67, 68} utilizaram a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM) para analisar compostos antioxidantes, com a finalidade de identificação, caracterização estrutural das moléculas e quantificação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Incorporar antioxidantes provenientes do orégano e gengibre de forma direta no óleo de canola.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a capacidade antioxidante dos óleos de canola bruto, com orégano e com gengibre por meio de método ORAC_{FL};
- Avaliar o período de indução de oxidação do óleo de canola, com e sem adição de antioxidantes, utilizando um novo método, o Oxitest®;
- Avaliar o grau de oxidação do óleo utilizando o método TBARS;
- Caracterizar os antioxidantes presentes no orégano e no gengibre por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM; CLAE-EM/EM).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Triagem

Por meio de buscas na literatura^{37, 69, 70, 71, 72, 73} de ervas e especiarias mais comuns na culinária brasileira, que se apresentam como fontes acessíveis de antioxidantes naturais, foram pré-selecionadas para este trabalho, orégano (*Origanum vulgare* L.), alho (*Allium sativum* L.), sálvia (*Salvia officinalis* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), manjerição (*Ocimum basilicum* L.), alfazema (*Lavandula angustifolia*), cenoura (*Daucus carota* L.) e gengibre (*Zingiber officinale*). Todos *in natura*, exceto o orégano, que foi utilizado desidratado. Estes produtos foram adquiridos no comércio de Maringá-PR.

Todas as hortaliças, exceto o orégano desidratado, foram lavadas em água corrente e deixadas em uma solução de hipoclorito de sódio (0,25% v/v), preparada de acordo com o rótulo do produto, por 15 minutos, e posteriormente secas com papel toalha.

O alho, a cenoura e o gengibre foram descascados e posteriormente triturados. Da cenoura, utilizou-se somente a casca. As folhas de sálvia, alecrim, manjerição, alfazema e orégano também foram triturados e armazenados a vácuo em sacos de polipropileno a -18°C e posteriormente incorporados no óleo de canola, conforme descrito no item 3.3.

Foram obtidas nove amostras de óleo de canola aromatizado: orégano desidratado; alho; sálvia; alecrim; manjerição; alfazema; gengibre; manjerição + alho; cenoura + alho. Para essas amostras, utilizou-se 5,0 g das especiarias para 100 g de óleo de canola, exceto para as amostras das combinações de manjerição com alho, e cenoura com alho, que foi utilizado 2,5 g de cada especiaria, totalizando 5,0 g.

Posteriormente, realizou-se uma avaliação sensorial, para o requisito aroma, das nove amostras de óleo de canola, utilizando uma ficha de avaliação de acordo com a Figura 13. A incorporação de aroma proveniente de fontes naturais no óleo de canola visa aumentar a aceitação comercial deste produto.

Avalie as amostras de óleo de canola com aromatizantes e pontue conforme a escala hedônica cada amostra quanto ao atributo AROMA:	
Amostra 1	
9-	Gostei muitíssimo
8-	Gostei muito
7-	Gostei moderadamente
6-	Gostei ligeiramente
5-	Não gostei/ Nem desgostei
4-	Desgostei ligeiramente
3-	Desgostei moderadamente
2-	Desgostei muito
1-	Desgostei muitíssimo

Figura 13. Ficha utilizada para avaliação da aceitabilidade das nove amostras de óleo de canola.

A tabela 1 traz as médias das pontuações, na ordem decrescente, de cada amostra de óleo de canola aromatizado conforme a avaliação sensorial. De acordo com a tabela, as amostras que tiveram maior aceitação no requisito aroma foram o óleo de canola com orégano, alho, manjericão e gengibre.

Tabela 1. Médias das pontuações provenientes da avaliação sensorial dos óleos de canola aromatizados.

Óleo de canola aromatizado	Média
Orégano desidratado	7,5
Gengibre	6,7
Manjericão	6,1
Alho	5,4
Manjericão + alho	5,3
Cenoura + alho	5,3
Alecrim	4,6
Alfazema	4,5
Sálvia	4,0

A partir do resultado do teste sensorial, analisou-se qualitativamente a capacidade antioxidante das quatro amostras com maior aceitação por meio do $ORAC_{FL}$. Quanto maior a capacidade da amostra, menor é o decaimento da fluorescência. Sendo assim, de acordo com a Figura 14, é possível observar que a amostra de óleo de canola contendo orégano foi a que apresentou maior capacidade antioxidante, seguido das amostras contendo gengibre, manjericão e alho.

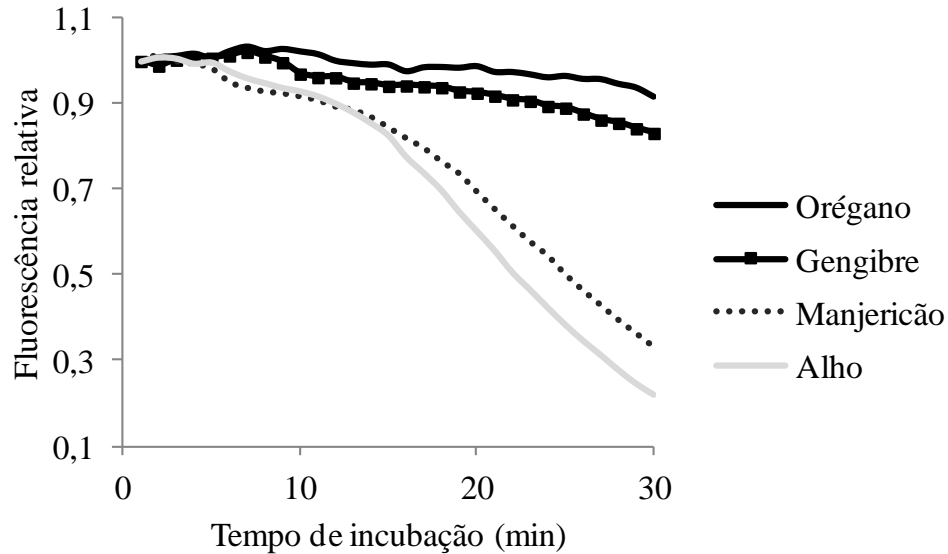


Figura 14. Resultado de ORAC para as amostras de óleo de canola aromatizado com maior aceitabilidade na avaliação sensorial.

De acordo com os resultados obtidos pelo método $ORAC_{FL}$, selecionaram-se as especiarias que apresentaram melhores resultados, orégano e gengibre, para os estudos posteriores.

3.2. Amostragem

O gengibre foi lavado em água corrente e deixado imerso em uma solução de hipoclorito de sódio (0,25% v/v), preparada de acordo com o rótulo do produto, por 15 minutos. Depois de descascado, o gengibre foi cortado em pequenos pedaços e colocado para secar em estufa com ventilação forçada durante 24 h a 50°C. O orégano e o gengibre seco foram triturados e peneirados utilizando uma tela de 35 mesh e embalados a vácuo em sacos de polipropileno e mantidos no congelador a -18°C.

3.3 Incorporação dos antioxidantes do orégano e gengibre no óleo de canola

Na incorporação dos antioxidantes, foi utilizado óleo de canola bruto (sem antioxidantes), gentilmente cedido pela Cooperativa Agroindustrial de Maringá (Cocamar). Em um béquer de 250 mL, envolto em papel alumínio, foram adicionados 100 mL de óleo de canola, 2,5 g; 5,0 g e 10,0 g das especiarias. Foram colocados sob agitação magnética por 1 h em banho termostatizado a 30°C. Posteriormente foram armazenados em frascos âmbar e mantidos sob refrigeração para posterior análise.

3.4 Análise da atividade antioxidante

O poder antioxidante dos óleos foi analisado pelo método ORAC_{FL}, descrito por Wu e colaboradores⁷⁴. Nas análises lipofílicas foram utilizados 0,05 g de cada óleo de canola preparados de acordo com o item 3.3, solubilizados com 1,5 mL de acetona e 4,5 mL de solução de β -ciclodextrina 7% e armazenados em frascos âmbar para posterior análise. O gerador de radicais livres AAPH (dicloreto de 2,2'-azobis(2-amidinopropano)) foi utilizado nesta análise com concentração de 17,2 g L⁻¹ em tampão fosfato (NaH₂PO₄ mono-hidratado e Na₂HPO₄ hepta-hidratado) 0,075 mol L⁻¹ e pH 7,0.

Para as análises hidrofílicas foi utilizado 1,0 g de cada óleo de canola preparados de acordo com o item 3.3, os quais foram extraídos com 10 mL de solução contendo acetona/água/ácido acético (AWA) na proporção 140:59:1 (v/v/v) respectivamente. Os tubos foram agitados e sonicados por 5 minutos a 37°C. Após atingirem temperatura ambiente, os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 15 min e o sobrenadante foi removido. As amostras foram extraídas uma vez mais com 10 mL de AWA usando o mesmo procedimento, e os sobrenadantes foram combinados e transferidos para um balão volumétrico de 25 ml, e foi adicionado solução AWA para perfazer o volume final de 25 mL. O gerador de radicais livres AAPH utilizado nesta análise teve concentração de 8,6 g L⁻¹ em tampão fosfato (NaH₂PO₄ mono-hidratado e Na₂HPO₄ hepta-hidratado) 0,075 mol L⁻¹ e pH 7,0.

A solução para a reação final do ensaio continha 20 μ L da amostra, 200 μ L de solução de fluoresceína 0,012 mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,075 mol L⁻¹, pH 7,0 e 75 μ L de AAPH. As análises foram feitas em quadruplicata.

A capacidade antioxidante das amostras foram medidas utilizando o fluorímetro VICTOR™ X4 Multilabel Plate Reader da PerkinElmer ($\lambda_{\text{ext}} = 485$ nm; $\lambda_{\text{tran}} = 535$ nm) e os resultados foram expressos em μ mol de equivalente Trolox por grama de amostra (μ mol ET g⁻¹), sendo calculado pelas equações da reta $y = 0,1885x + 2,1336$, $r^2=0,9905$ para o L-ORAC_{FL} e $y = 0,3505x + 1,3897$, $r^2=0,9961$ para o H-ORAC_{FL}, obtidas na curva de calibração com o padrão Trolox.

3.5 Oxitest

Para as análises envolvendo o Oxitest, foram utilizados 5 g de cada óleo de canola preparados de acordo com o item 3.3. Além disso, foram realizados testes para o óleo de canola sem adição de antioxidantes (controle).

Todas as amostras foram submetidas às mesmas condições de temperatura e pressão de oxigênio, 90°C e 6 bar, respectivamente⁷⁵.

3.6 Avaliação da oxidação de lipídios

Para a avaliação da rancidez dos óleos foi utilizado o método TBARS, que quantifica as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.

Em um béquer, 5 g das amostras de óleo de canola bruto e óleo contendo as especiarias, armazenadas durante 100 dias sob refrigeração e abrigo da luz, foram dissolvidas em clorofórmio e transferidas para um balão volumétrico de 100 mL e seu volume foi completado com clorofórmio. Foram adicionados a um tubo de ensaio 5 mL desta solução e 5 mL de ácido tricloroacético 10% em água destilada, e a solução foi centrifugada. Transferiu-se 4 mL do sobrenadante para um outro tubo de ensaio e foi adicionado 1,25 mL de ácido tiobarbitúrico 0,75% em ácido acético glacial e ácido clorídrico (na proporção 49:1 (v/v) respectivamente). Os tubos foram postos em água fervente por 10 minutos. A absorbância da cor róseo-avermelhada desenvolvida foi medida a 530 nm usando um espectrofotômetro modelo Genesys 10 uv (Thermo Scientific, Madison, USA), usando um branco preparado paralelamente à amostra a partir de 5 mL de clorofórmio. A análise foi feita em triplicata e os resultados foram expressos em mg de Malonaldeído (MA) g⁻¹ de amostra, sendo calculado pela equação da reta ($y = 0,0051x + 0,0225$, $r^2=0,997$) obtida na curva de calibração com o malonaldeído⁷⁶.

3.7 Preparo das amostras para análise por CLAE-EM/EM

3.7.1 Extrato metanólico do orégano e gengibre

Para a obtenção dos extratos metanólicos do orégano e do gengibre, foram pesados 0,25 g de amostra e submetidos à agitação magnética com 6,3 mL (5,0 g) de metanol por 1 hora, em banho termostatizado a 30°C. Em seguida, o solvente foi evaporado sob fluxo de

nitrogênio e o extrato acondicionado em microtubo para centrífuga, protegido da luz, e armazenado a -18 °C até o período das análises.

3.7.2 Extrato metanólico do óleo de canola

Para a obtenção dos extratos metanólicos dos óleos de canola bruto, com orégano e com gengibre, foram pesados em tubos de ensaio, aproximadamente, 5,0 g de cada óleo preparado de acordo com o item 3.3, e extraídos com três porções de 2 mL de metanol. Os tubos foram agitados e centrifugados por 5 minutos. Em seguida, o solvente foi evaporado sob fluxo de nitrogênio e os extratos acondicionados em microtubo para centrífuga, protegido da luz, e armazenados a -18 °C para posterior análise.

3.7.3 Identificação dos compostos por CLAE-EM/EM

Para este trabalho foi utilizada a técnica de CLAE-EM/EM, para a identificação dos compostos presentes nos extratos metanólicos do orégano e do gengibre e nos extratos metanólicos dos óleos de canola contendo orégano e gengibre.

Assim, as análises foram realizadas em um cromatógrafo à líquido da marca Waters 1525 μ (Binary HPLC Pump) acoplado ao espectrômetro de massas Quattro micro API Waters (Beverly-EUA), geometria Triplo Quadrupolo. As condições de trabalho utilizadas para esse estudo foram as seguintes: coluna Waters Symmetry® C18 (4,6 x 75 mm x 3,6 μ m); o gradiente de eluição foi realizado com (A) água (0,1% de ácido fórmico) e (B) acetonitrila (0,1% ácido fórmico). A separação foi efetuada em 15 minutos sob as condições descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Gradiente de eluição utilizado na separação dos constituintes da amostra.

Tempo (min)	Vazão (mL min ⁻¹)	%A	%B
Inicial	0,50	98	2
8,00	0,50	50	50
11,00	0,50	30	70
11,01	0,50	2	98
15,00	0,50	98	2

A= Água (0,1% de ácido fórmico); B= Acetonitrila (0,1% ácido fórmico).

As condições do espectrômetro de massas para as análises foram: ionização em modo positivo; voltagem do capilar, 2,00 kV; voltagem do cone, 25,0 V; temperatura da fonte, 150°C; temperatura de dessolvatação, 450°C; fluxo do gás no cone, 25 L h⁻¹; fluxo do gás de dessolvatação, 900 L h⁻¹. O intervalo de massa utilizado no modo varredura (*scan*) foi de *m/z* 100 a 1000.

Após a análise pelo modo varredura, os íons com massas de interesse foram selecionados para posterior análise de fragmentação (EM/EM).

3.8 Análise estatística

As análises foram realizadas todas em triplicata e a comparação entre médias foi realizada pelo teste de Tukey, através do programa Statistica.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a triagem realizada e a seleção do orégano e gengibre como fontes de antioxidantes a serem utilizados, uma análise quantitativa da capacidade antioxidante de diferentes concentrações das especiarias no óleo de canola foi realizada, gerando valores que compõe a Tabela 3, na qual se encontram as capacidades antioxidantes dos componentes hidrofílicos (H-ORAC_{FL}), lipofílicos (L-ORAC_{FL}) e a capacidade antioxidante total (CAT) em μmol de equivalente Trolox por grama de amostra ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$). As amostras foram preparadas como descrito no item 3.4.

Tabela 3. Capacidade antioxidante das amostras de óleo de canola por meio do método ORAC.

Amostra	Concentração (g 100 g ⁻¹)	H-ORAC _{FL} ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$)	L-ORAC _{FL} ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$)	CAT ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$)
Bruto	---	12,8 ± 0,48	1,3 ± 0,1	14,1 ± 0,49
Orégano	2,5	440 ^c ± 21,8	121 ^b ± 5,3	561 ^b ± 22,4
	5,0	713 ^a ± 10,5	119 ^b ± 7,4	832 ^a ± 12,8
	10,0	667 ^b ± 14,6	144 ^a ± 8,0	811 ^a ± 16,6
Gengibre	2,5	42 ^b ± 4,9	30 ^b ± 2,6	72 ^b ± 5,5
	5,0	89 ^a ± 12,5	48 ^a ± 9,7	137 ^a ± 15,8
	10,0	79 ^a ± 9,8	60 ^a ± 5,3	139 ^a ± 11,1

Média dos valores ± desvio padrão; n=3. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CAT=somatório dos valores de H-ORAC e L-ORAC.

É notória a alta capacidade antioxidante encontrada no óleo de canola contendo orégano. Essa capacidade é ainda maior que a encontrada no óleo de canola com adição de gengibre, que por sua vez, é extremamente maior ao do óleo de canola bruto. Fica claro que a maior concentração de compostos com capacidade antioxidante, está presente no orégano.

Com base nos resultados desta tabela, verificou-se que os valores de CAT para as concentrações de 5,0 e 10,0 g 100 g⁻¹, para o orégano são muito próximas, e consideravelmente maiores quando comparados com o valor de CAT para a concentração de

2,5 g 100 g⁻¹. Além disso, os valores de CAT para as concentrações de 5,0 e 10,0 g 100 g⁻¹ não apresentam diferenças significativas conforme teste de Tukey (p<0,05). O mesmo é observado para os valores do óleo de canola contendo gengibre.

As figuras a seguir trazem os óleos preparados neste trabalho. Óleo de canola bruto/controle, com adição de 2,5 g 100 g⁻¹, 5,0 g 100 g⁻¹ e 10,0 g 100 g⁻¹ de orégano (Figura 15), e 2,5 g 100 g⁻¹, 5,0 g 100 g⁻¹ e 10,0 g 100 g⁻¹ de gengibre (Figura 16). Como dito anteriormente, os óleos de canola com adição de 5,0 g 100 g⁻¹ de orégano e gengibre foram os que apresentaram maior CAT, além disso, analisando as Figuras 15 e 16, é possível perceber que os óleos com essa mesma concentração de orégano e gengibre (Figuras 15(2) e 16(2), respectivamente) são os que apresentam melhores propriedades organolépticas. Dessa forma, a melhor concentração a ser utilizada é de 5,0 g 100 g⁻¹ de óleo.

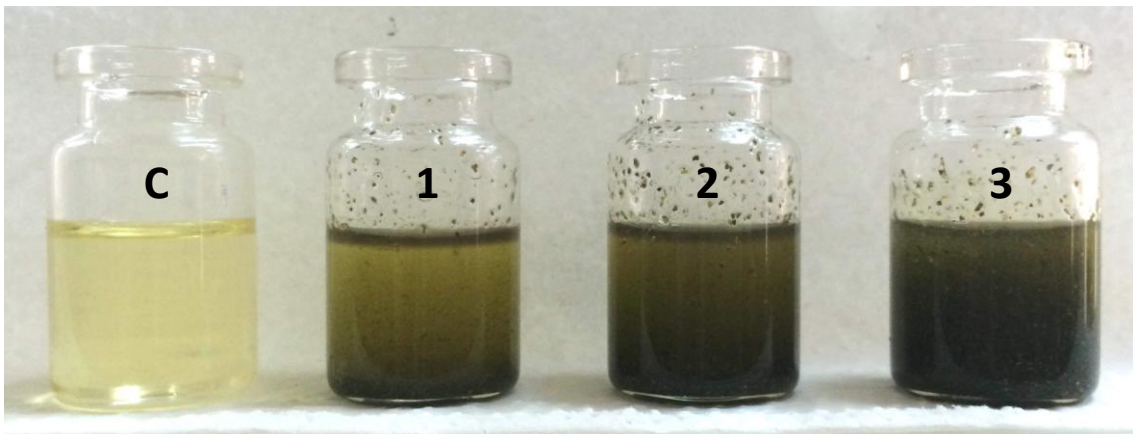


Figura 15. Óleo de canola bruto/controle (C), e com adição de orégano nas concentrações de 2,5 g 100 g⁻¹ (1), 5,0 g 100 g⁻¹ (2) e 10,0 g 100 g⁻¹ (3).

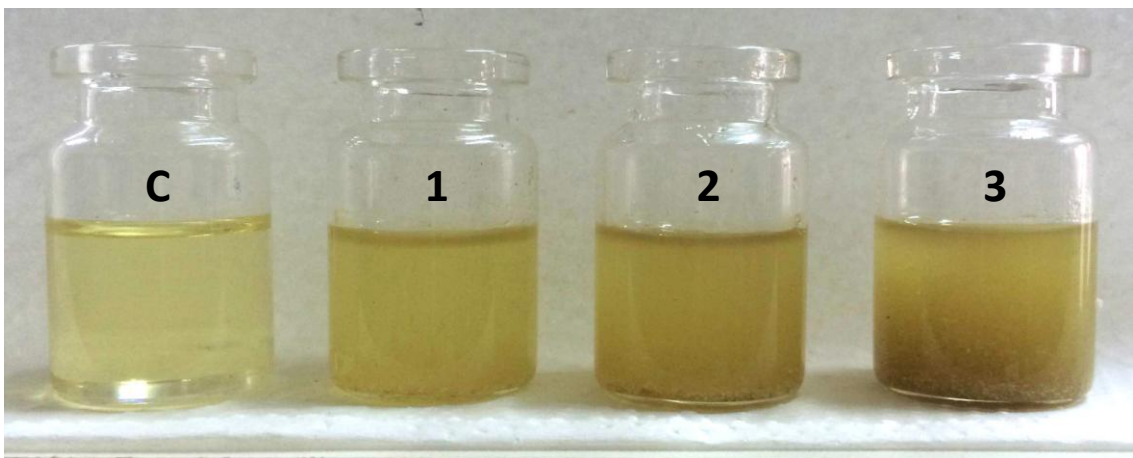


Figura 16. Óleo de canola bruto/controle (C), e com adição de gengibre nas concentrações de 2,5 g 100 g⁻¹ (1), 5,0 g 100 g⁻¹ (2) e 10,0 g 100 g⁻¹ (3).

Já nos ensaios realizados utilizando a técnica do Oxitest®, foi possível observar os diferentes períodos de indução do óleo de canola bruto e com a adição de especiarias, ilustrados na Figura 17. O aumento do período de indução por meio da adição de um antioxidante está relacionado à eficiência do antioxidante.

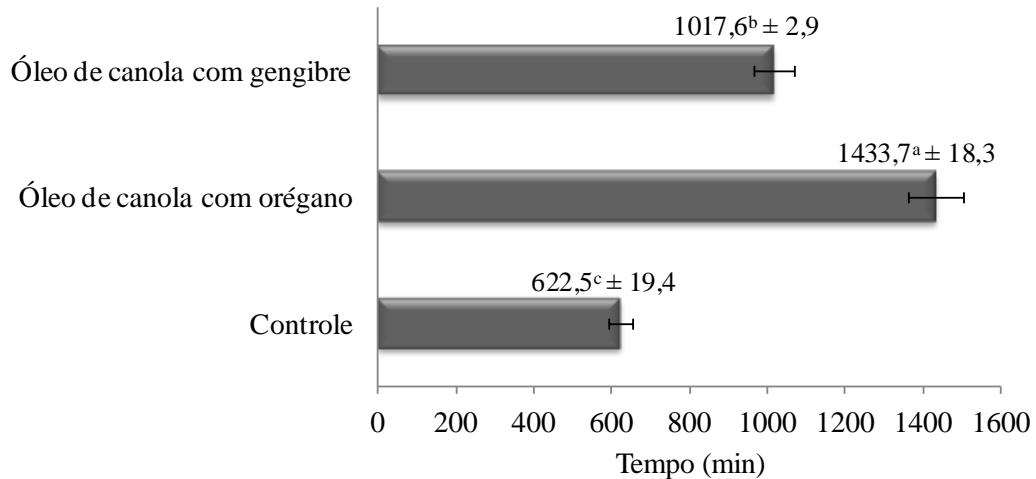


Figura 17. Tempos de indução para as análises de rancificação do óleo de canola. Média dos valores \pm desvio padrão; $n=3$. Médias seguidas de letras diferentes apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p<0,05$)

O maior tempo do período de indução de rancificação obtido foi de $1433,7 \pm 18,3$ minutos para o óleo de canola com orégano. Esse tempo foi superior ao obtido pelo óleo de canola com gengibre, $1017,6 \pm 2,9$ minutos. Podemos notar que houve incorporação dos antioxidantes provenientes do orégano, e gengibre no óleo de canola, já que seus tempos do período de indução de rancificação foi muito maior comparado com o óleo de canola sem adição de antioxidantes ($622,5 \pm 19,4$ minutos). Esse resultado se deve a características intrínsecas dos antioxidantes que é a de retardar a oxidação lipídica, desde que tenha afinidade ou esteja solubilizado no meio.

Análises de TBARS (Tabela 4) foram realizadas para avaliar a oxidação lipídica do óleo de canola sem antioxidante (Controle), do óleo de canola com orégano e do óleo de canola com gengibre, armazenados sob refrigeração e sob abrigo da luz por 100 dias.

Tabela 4. Resultados obtidos pelo teste TBARS com óleo de canola sob refrigeração e abrigo da luz.

Amostra	mg MA g⁻¹ amostra
Controle	0,20 ^a ± 0,06
Óleo com orégano	0,01 ^c ± 0,02
Oleo com gengibre	0,11 ^b ± 0,06

Média dos valores ± desvio padrão; n=3. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0.05).

É notório o poder antioxidante que o orégano exerce no óleo de canola, já que este apresentou quase nenhuma oxidação após 100 dias estocado sob refrigeração e sob abrigo da luz, apresentando um grau oxidativo de 0,01 ± 0,02 mg MA g⁻¹ amostra. Este valor foi menor que o obtido pelo óleo de canola com gengibre (0,11 ± 0,06 mg MA g⁻¹), confirmando mais uma vez a capacidade antioxidante destas especiarias se comparando com óleo de canola sem adição de antioxidantes, que obteve um grau de oxidação de 0,20 ± 0,06 mg MA por grama de amostra.

A Tabela 5 trata dos dados do TBARS realizados para o óleo de canola sem antioxidante após ensaio do Oxitest por 24 h (Resíduo controle), do óleo de canola com orégano após ensaio do Oxitest por 24 h (Resíduo óleo com orégano) e do óleo de canola com gengibre após ensaio do Oxitest por 24 h (Resíduo óleo com gengibre).

Tabela 5. Resultados obtidos pelo teste TBARS com óleo de canola após ensaio utilizando Oxitest por 24 horas.

Amostra	mg MA g⁻¹ amostra
Resíduo controle	8,83 ^a ± 0,20
Resíduo óleo com orégano	4,55 ^b ± 0,04
Resíduo óleo com gengibre	4,66 ^b ± 0,14

Média dos valores ± desvio padrão; n=3. Médias seguidas de letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey (p<0.05).

Ao comparar os dados da Tabela 5, é possível verificar que com o mesmo período de tempo de ensaio do Oxitest®, o óleo de canola sem adição de antioxidantes obteve um valor de oxidação ($8,83 \pm 0,20 \text{ mg MA g}^{-1}$) muito maior do que ao óleo de canola com gengibre ($4,66 \pm 0,14 \text{ mg MA g}^{-1}$), e também maior que o valor obtido pelo óleo de canola com orégano ($4,55 \pm 0,04 \text{ mg MA g}^{-1}$).

A curva de calibração utilizada na quantificação de malonaldeído do teste de TBARS foi composta por 5 pontos feitos em triplicatas (Figura 18).

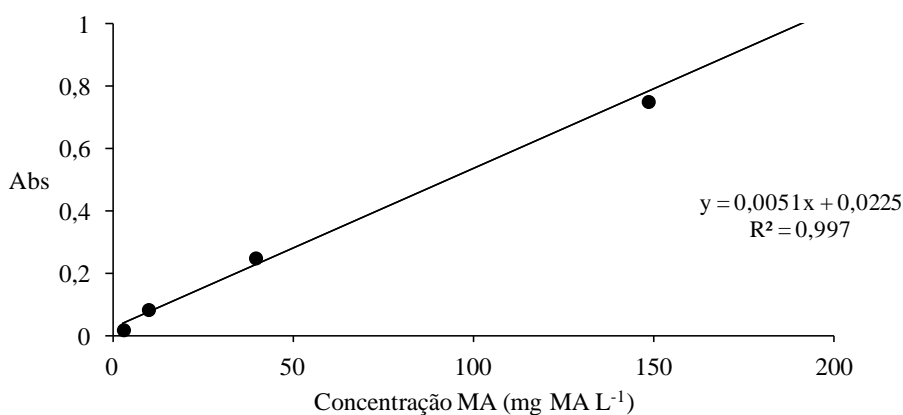


Figura 18. Curva de calibração do teste TBARS expressa em mg MA L^{-1} .

Os resultados do teste de TBARS corroboram com os resultados obtidos pelos métodos ORAC_{FL} e Oxitest®, e apontam o orégano e o gengibre como fontes potenciais de antioxidantes na inibição das etapas de degradação lipídica.

No entanto, após estes ensaios, por meio de CLAE-EM, foi possível estudar as classes dos antioxidantes encontrados no orégano e no gengibre, assim como também, avaliar e comparar a eficiência de extração do óleo quando comparado com solventes orgânicos normalmente empregados no processo de extração desses compostos.

Nesse trabalho, foi utilizado como solvente orgânico o metanol, por se tratar do solvente mais comumente utilizado, como já mencionado nesta dissertação.

Na Figura 19 encontram-se os cromatogramas de íons totais dos extratos metanólicos do orégano (A) e do gengibre (B) obtidos por meio da CLAE-EM. Para estas análises foram

utilizadas as condições cromatográficas descritas no item 3.7.1. Através das análises por espectrometria de massas no modo varredura (*screening*) foi possível obter uma identidade química da amostra.

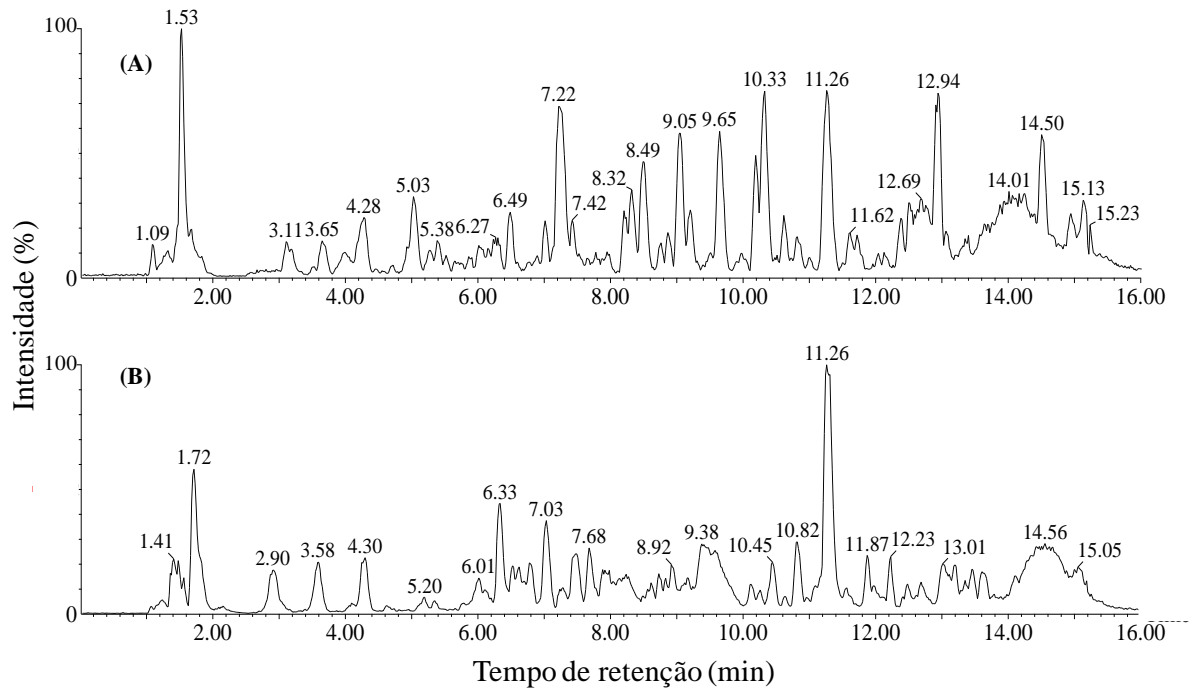


Figura 19. Cromatogramas dos extratos metanólicos do orégano (A) e do gengibre (B).

A figura 20 mostra os cromatogramas dos extratos metanólicos feitos a partir do óleo de canola bruto (A), do óleo com orégano (B), e do óleo com gengibre (C). Os extratos metanólicos dos óleos foram preparados conforme o item 3.7.2. Como pode ser observado, os óleos contendo orégano e gengibre apresentam um perfil cromatográfico bem diferente em comparação com o do óleo bruto. Isso se deve, provavelmente, pela incorporação dos antioxidantes presentes nas especiarias pelo óleo de canola.

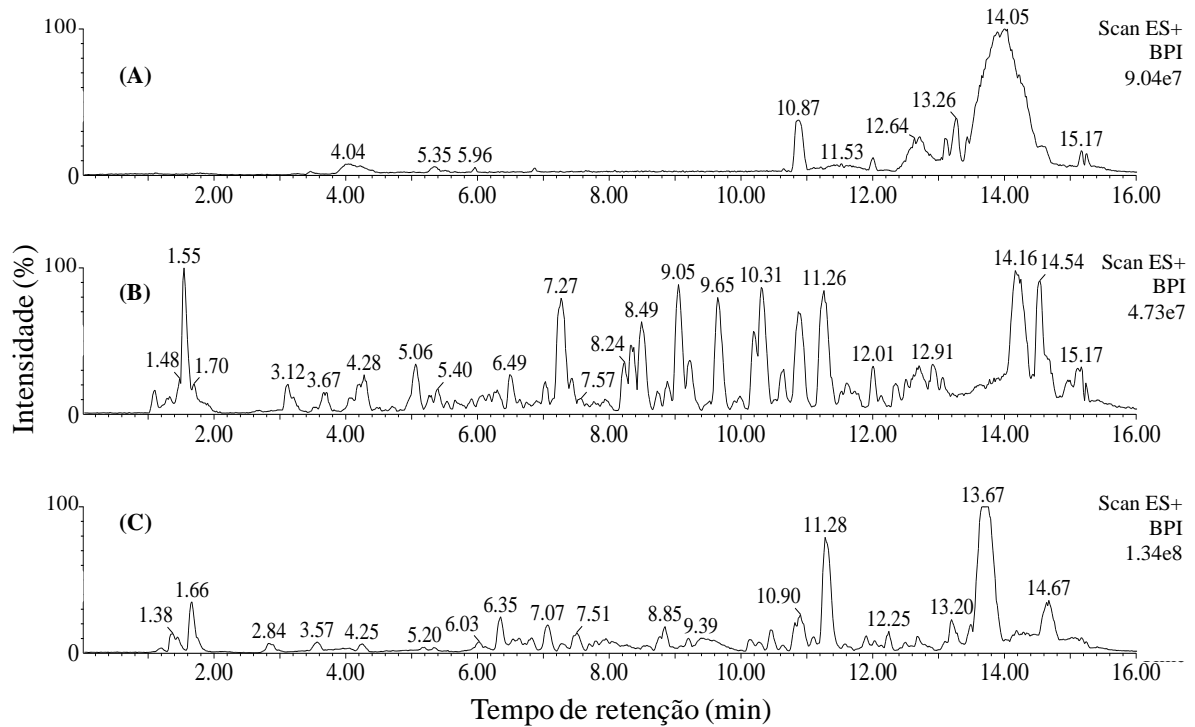


Figura 20. Cromatogramas dos extratos metanólicos dos óleos de canola bruto (A), óleo contendo orégano (B) e óleo contendo gengibre (C).

Ao comparar os cromatogramas dos extratos metanólicos do orégano (Figura 21A) e do gengibre (Figura 22A) com os extratos metanólicos feitos dos óleos de canola com incorporação dos antioxidantes provenientes do orégano (Figura 21B) e do gengibre (Figura 22B), é possível verificar o mesmo perfil cromatográfico para ambas as extrações, e também que as intensidades dos sinais cromatográficos são muito próximas.

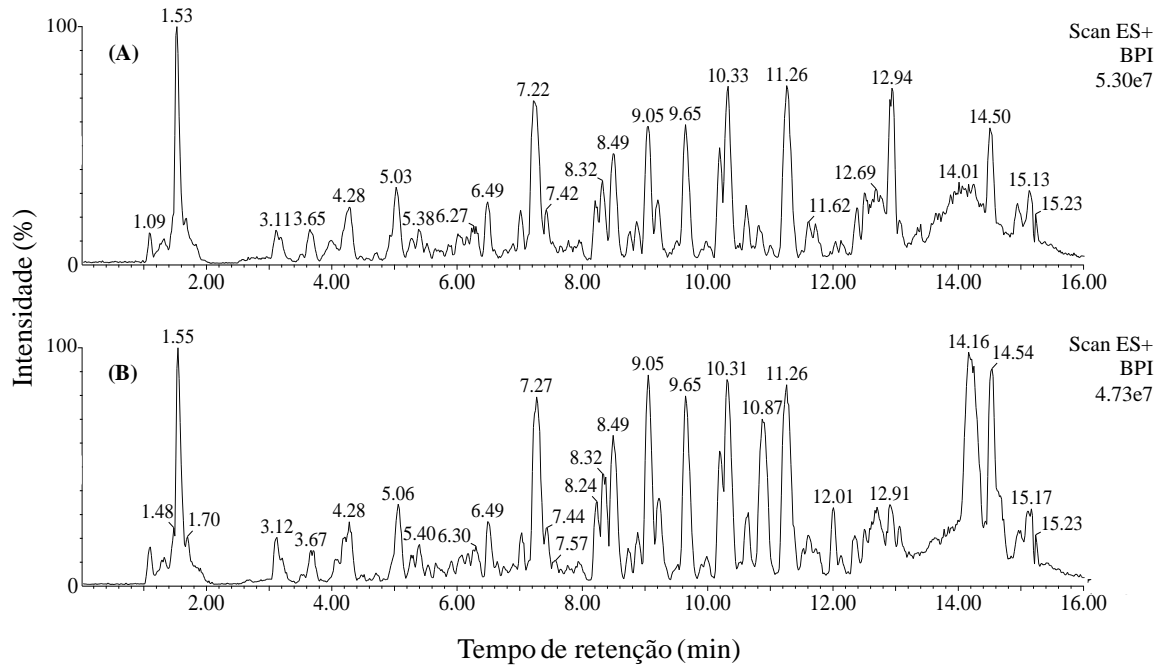


Figura 21. Cromatogramas dos extratos metanólicos do orégano (A) e do óleo de canola com orégano (B).

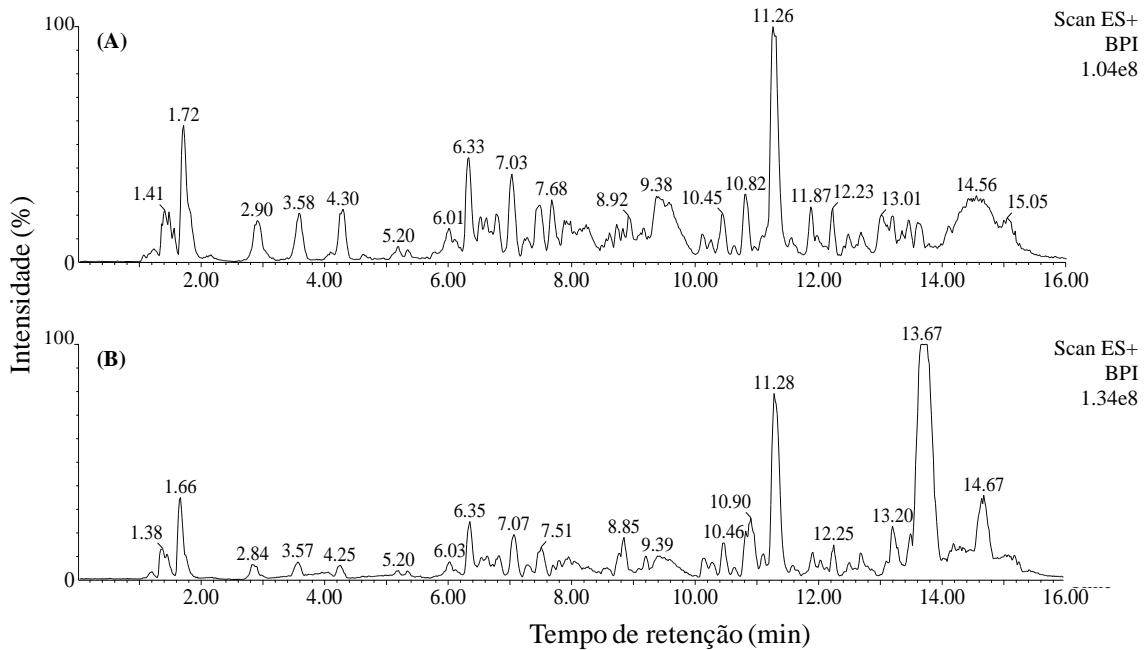


Figura 22. Cromatogramas dos extratos metanólicos do gengibre (A) e do óleo de canola com gengibre (B).

Visto essa semelhança nos cromatogramas, foram analisados os espectros de massas do pico com tempo de retenção de 7,27 minutos dos cromatogramas referentes ao orégano

(Figura 23), e do pico com tempo de retenção de 11,28 minutos dos cromatogramas referentes ao gengibre (Figura 24).

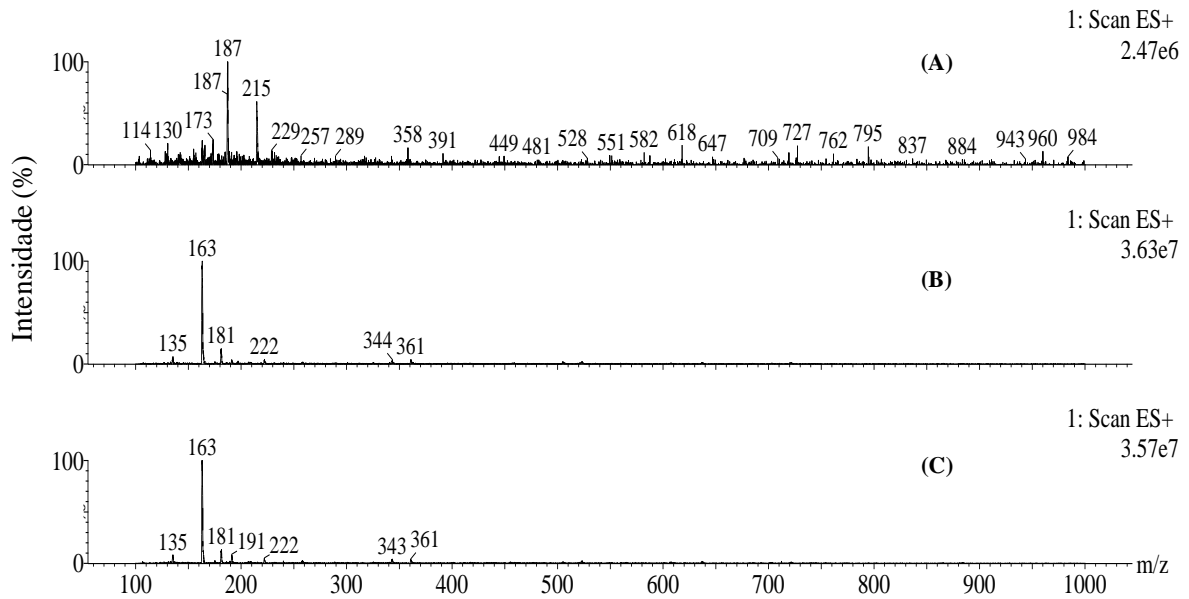


Figura 23. Espectros de massas do pico de tempo de retenção 7,27 minutos dos cromatogramas dos extratos metanólicos do óleo de canola bruto (A), do óleo contendo orégano (B) e do orégano (C).

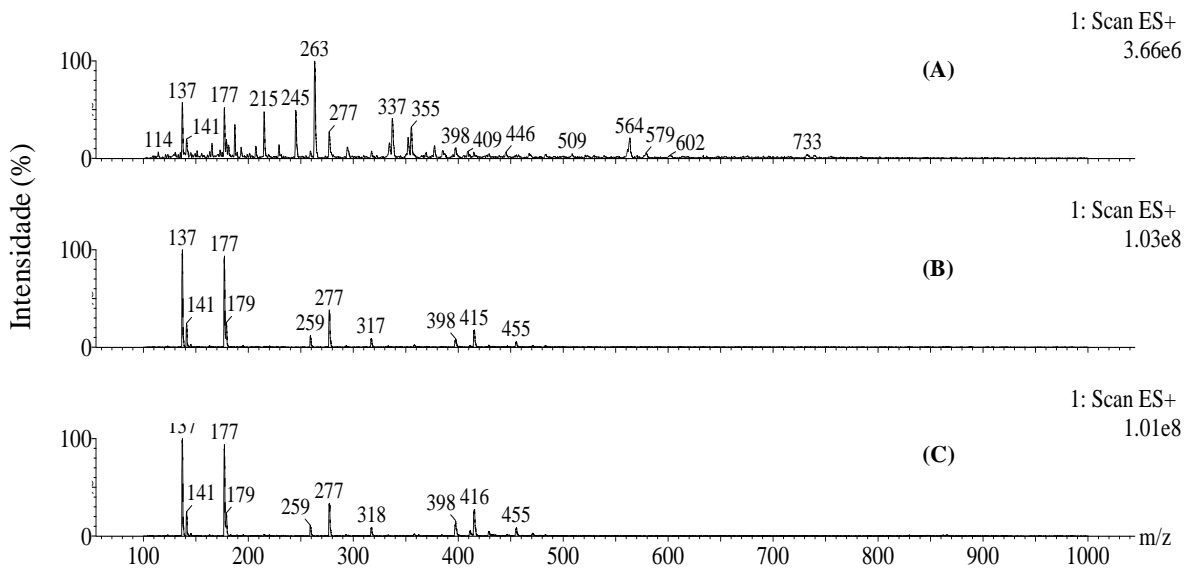


Figura 24. Espectros de massas do pico de tempo de retenção 11,28 minutos dos cromatogramas dos extratos metanólicos do óleo de canola bruto (A), do óleo contendo gengibre (B) e do gengibre (C).

Ao analisar as Figuras 23 e 24, é perceptível a semelhança entre os espectros de massas do extrato metanólico do óleo de canola contendo orégano com o extrato metanólico do orégano (Figura 23), assim como nos espectros de massas do extrato metanólico do óleo de canola contendo gengibre com o extrato metanólico do gengibre (Figura 24). Cabe também ressaltar que as intensidades dos íons nos espectros estão na mesma ordem de grandeza, logo, é possível afirmar que o óleo de canola se comporta como um bom solvente extrator para os antioxidantes presentes no orégano e no gengibre.

Além do perfil cromatográfico, as análises dos íons presentes nas amostras mostrou uma grande semelhança nos constituintes desses extratos. Estudos foram realizados para identificação dos antioxidantes provenientes do orégano e do gengibre, assim como suas fragmentações.

A figura 25 traz o cromatograma de corrente iônica e o espectro de fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 271, referente a Apigenina, presente nos extratos metanólicos do óleo de canola contendo orégano (Figura 25B) e do orégano puro (Figura 25C). O mesmo não é encontrado no extrato metanólico do óleo de canola bruto (Figura 25A).

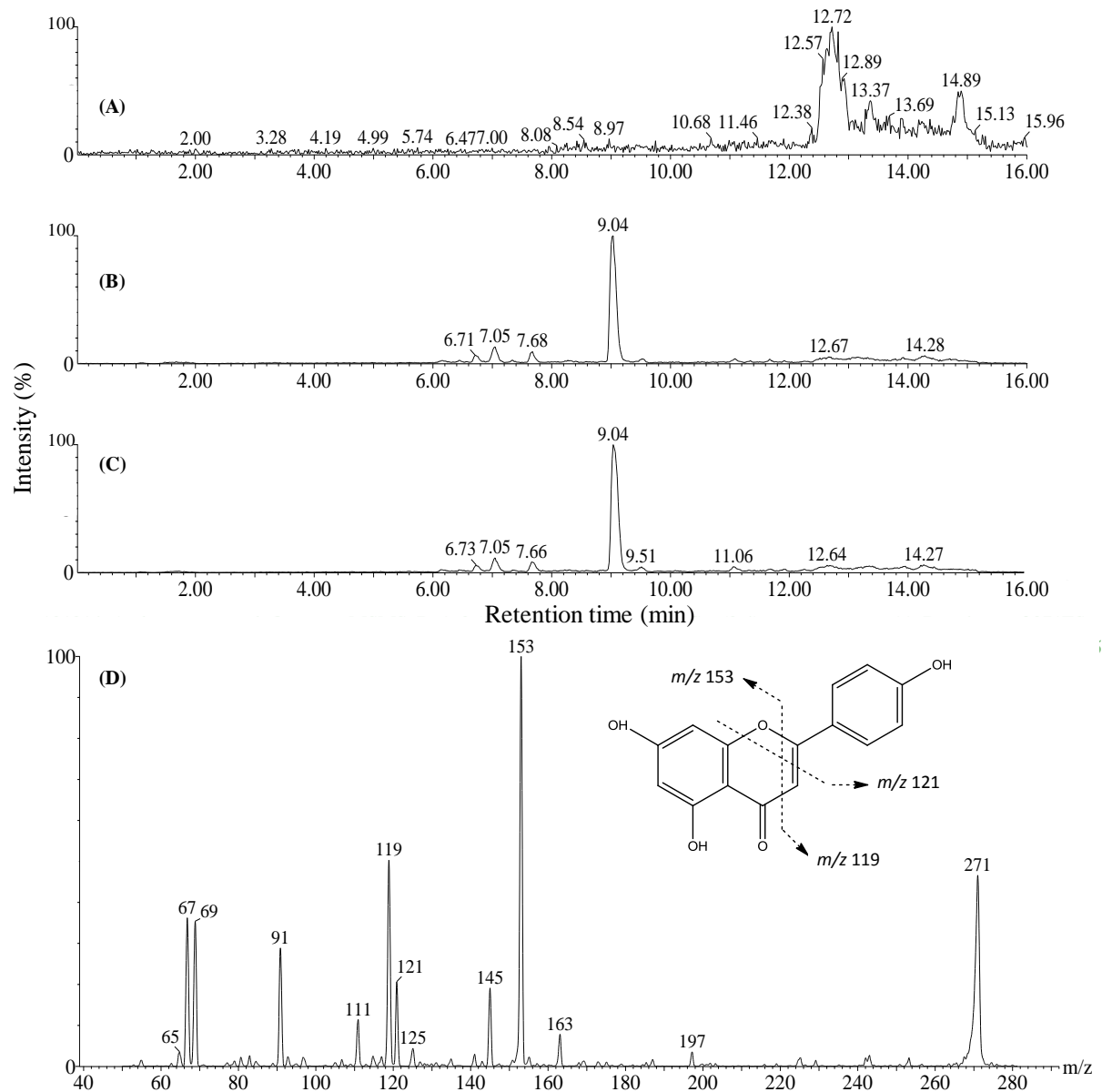


Figura 25. Cromatogramas da corrente iônica do íon $[M+H]^+$ m/z 271 dos extratos metanólicos do óleo de canola bruto (A), óleo de canola contendo orégano (B) e do orégano puro (C). Espectro de fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 271 referente a Apigenina (D).

Na Figura 26 encontram-se os cromatogramas de corrente iônica e o espectro de fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 277, referente ao 6-shogaol, presente no extratos metanólico do óleo de canola contendo gengibre (Figura 26B) e no extrato metanólico do gengibre (Figura 26C). O mesmo não é encontrado no extrato metanólico do óleo de canola bruto (Figura 26A).

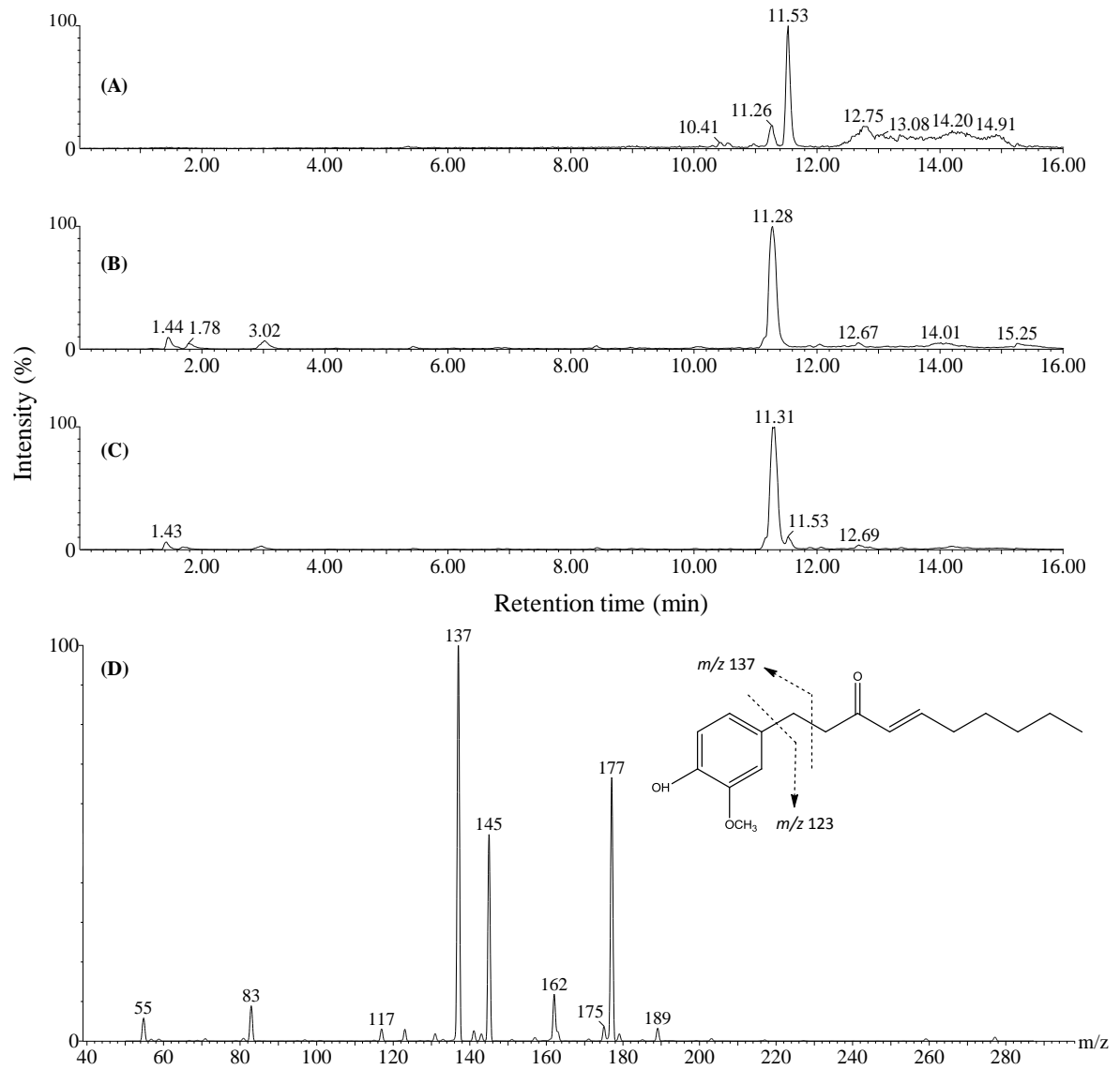


Figura 26. Cromatogramas de corrente iônica do íon $[M+H]^+$ m/z 277 dos extratos metanólicos do óleo de canola bruto (A), óleo de canola contendo gengibre (B) e do gengibre (C). Espectro de fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 277 referente 6-shogaol (D).

Após a análise de CLAE-EM, os compostos de interesse (íons majoritários) foram identificados por CLAE-EM/EM utilizando dados já publicados na literatura^{77,78,79,80,81}, como pode ser observado na Tabela 6. Essa identificação foi realizada através da fragmentação dos íons de interesse.

Tabela 6. Principais antioxidantes presentes no orégano e no gengibre.

		Composto	T_R*	[M+H]⁺	Íons Fragmentos
Orégano	1	Ácido Cafeico	7,3	181	163,145,135,117,107
	2	Apigenina	9,0	271	243, 163, 153, 145, 119, 91
	3	Naringenina	9,2	273	153, 147, 123, 119
	4	Luteolina	8,2	287	241, 153, 137, 135, 117
	5	Kaempferol	11,2	287	167, 147, 119, 91
Gengibre	6	6-shogaol	11,3	277	177, 137
	7	6-gingerdiol	10,8	297	177, 137
	8	8-shogaol	12,7	305	177, 137
	9	10-shogaol	13,5	333	177, 137

*Tempo de retenção em minutos.

Os antioxidantes identificados no gengibre são compostos pertencentes à família do gingerol. Compreendem distintos grupos de séries homologas, diferenciados pelo comprimento de suas cadeias alquilas não ramificadas⁶⁶. Já o orégano se destaca pela variedade de classes de antioxidantes que possui, dentre eles estão, ácido fenólico, flavona, flavonoides e flavonol.⁷⁹

5 CONCLUSÃO

Foi verificado que o orégano e o gengibre contêm alta concentração de compostos com capacidade antioxidante e, portanto, são ótimas fontes de antioxidantes.

A técnica ORAC foi muito eficiente para a quantificação da capacidade antioxidante do orégano e do gengibre, e esses dados juntamente com os resultados do Oxitest e do TBARS, é possível concluir a eficiência da utilização dos antioxidantes destas especiarias para inibir as etapas de degradação lipídica.

Os resultados obtidos utilizando a técnica de CLAE-EM e CLAE-EM/EM comprovam a eficiência da extração/incorporação direta dos antioxidantes no óleo de canola, utilizando um processo verde de extração e obtendo antioxidantes naturais de alta qualidade, inócuos e passíveis de ampla utilização como aditivos alimentares, contribuindo para a sustentabilidade ambiental e a ecoeficiência de processos industriais. Além disso, por meio dessa técnica foi possível caracterizar cinco compostos antioxidantes provenientes do orégano e quatro compostos antioxidantes provenientes do gengibre.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Grimaldi R.; Adequação tecnológica para extração e refino do óleo de canola/colza. Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos. Campinas **1994**.
- ² Tomm, G. O.; Canola: Planta que traz muitos benefícios à saúde humana, e cresce em importância no Brasil e no mundo. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/canola/aspectos_nutricionais.htm. Acesso em 26 de Janeiro de 2015.
- ³ Disponível em: <https://www.embrapa.br/web/portal/busca-de-noticias/-/noticia/1928940/evento-destaca-tecnologias-para-o-crescimento-da-canola-na-america-latina>. Acesso em 26 de Janeiro de 2015.
- ⁴ Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do149_3.htm#1. Acesso em 26 de Janeiro de 2015.
- ⁵ Disponível em: https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6/1galceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&p_r_p_76293187/sistemaProducaoId=3703&p_r_p_996514994_topicoId=3025. Acesso em 26 de Janeiro.
- ⁶ Luzia, D. M. M., Bertanha, B. J., Jorge, N. (2010). Sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.): potencial antioxidante e perfil de ácidos graxos. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 69, 175-180.
- ⁷ Silva, D. R. B.; Miranda, P. F.; Soares, E. A. (2007). A importância dos ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa na gestação e lactação. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.*, v. 7, n. 2, p. 123-133.
- ⁸ Perini, J. A. L.; Stevanato, F. B.; Sargi, S. C.; Visentainer, J. E. L.; Oliveira Dalalio, M. M. O.; Matshushita, M.; Souza, N. E.; Visentainer, J. V. (2010). Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Rev. Nutr.*, v. 23, n. 6, p.1075-1086.

-
- ⁹ D'Oliveira, P.S; Prado, I.N.; Santos, G.T. et al. (1997). Efeito da Substituição do farelo de soja pelo farelo de canola sobre o desempenho de novilhas Nelore confinadas. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.26, n.3, p.568-574.
- ¹⁰ Omid, H.; Tahmasebi, Z.; Badi, H. A. N.; Torabi, H.; Miransari, M. (2010). Fatty acid composition of canola (*Brassica napus* L.), as affected by agronomical, genotypic and environmental parameters. *Comptes Rendus Biologies*, v. 333, p. 248–254.
- ¹¹ Gillingham, L.G.; Gustafson, J.A.; Han, S. Y. (2011) High-oleic rapeseed (canola) and flaxseed oils modulate serum lipids and inflammatory biomarkers in hypercholesterolaemic subjects. *Br. J. Nutr.*, v. 105, p. 417–427.
- ¹² Palomäki, A.; Pohjantähti-Maaroos, H.; Wallenius, M. (2010). Effects of dietary coldpressed turnip rapeseed oil and butter on serum lipids, oxidized LDL and arterial elasticity in men with metabolic syndrome. *Lipids Health Dis*, v. 9, p. 137.
- ¹³ Iggman, D.; Gustafsson, I. B.; Berglund, L. (2011). Replacing dairy fat with rapeseed oil causes rapid improvement of hyperlipidaemia: a randomized controlled study. *J. Intern. Med.*, v. 270, p. 356–364.
- ¹⁴ Melo, E. A.; Maciel, M. I. S.; Lima, V. L. A. G.; Leal, F. L. L.; Caetano, A. C. S.; Nascimento, R. J. (2006) Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. *Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 26, 639-644.
- ¹⁵ Araújo, J.M.A.; Química de Alimentos: *Teoria e Prática*. 2a edição, Viçosa: Editora UFV, 2001.
- ¹⁶ Ramalho, V. C.; Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29, 755-760.
- ¹⁷ Fonseca, M.M.; Yoshida, M.I. (2009). Análise térmica do óleo de linhaça natural e oxidado. *Revista Vértices*, v. 11, n. 1/3, p. 61-65.
- ¹⁸ Bailey, A.E. *Bailey's Industrial Oil Fat Products*, 5th ed., John Wiley, New York, v.3, 1996.

-
- ¹⁹ Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/c1b3b50043d3e3be93b29367c8a2abfa/Categoria+2+%C3%93leos+e+gorduras.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 25 de Janeiro.
- ²⁰ Williams G. M.; Wang C. X.; Iatropoulos M. J. (1990). Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. II. Chronic feeding studies. *Food and Chemical Toxicology*, v. 28, p. 799-806.
- ²¹ Nakagawa, Y.; Moldéus, P.; Moore, G. A. (1996). Relationship between mitochondrial dysfunction and toxicity of propyl gallate in isolated rat hepatocytes. *Toxicology*, v. 114, n. 2, p. 135-145.
- ²² Zurita, J. L.; Jos, A.; Peso, A. Salguero, M.;López-Artíguez, M.; Repetto, G. (2007). Ecotoxicological effects of the antioxidant additive propyl gallate in five aquatic systems. *Water Research*, v. 41, n. 12, p. 2599-2611.
- ²³ Pitaro, S. P.; Fiorani, L. V.; Jorge, N. (2012) Potencial antioxidante dos extratos de manjeriço (*Ocimum basilicum* Lamiaceae) e orégano (*Origanum vulgare* Lamiaceae) em óleo de soja. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s. v. 14, n. 4, p. 686-691.
- ²⁴ Oliveira, A. C.; Valentim, I. B.; Goulart, M. O. F.; Silva, C. A.; Bechara, E. J. H.; Trevisan, M. T. S. (2009). Fontes Vegetais Naturais de Antioxidantes. *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 689-702.
- ²⁵ Olmedo, R.; Nepote, V.; Grosso, N. R., (2014). Antioxidant activity of fractions from oregano essential oils obtained by molecular distillation. *Food Chemistry*, v. 156, p. 212–219.
- ²⁶ Guinazi, M.; Milagres, R. C. R. M.; Pinheiro-Sant’Ana, H. M.; Chaves, J. B. (2009). Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Química Nova*, v. 32, n. 8, p. 2098-2103.
- ²⁷ Soares, S. E. (2002). Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev. Nutr.*, v. 15, n. 1, p. 71-81.
- ²⁸ Lenardão, E. J.; Freitag, R. A. (2003) "Green chemistry" - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 123-129.

-
- ²⁹ Bretherick L, ed., (1994). Hazards in the Chemical Laboratory. *Royal Society of Chemistry*, 6^a edição.
- ³⁰ Abdelhadi, M.; Meullemiestre, A.; Gelicus, A.; Hassani, A.; Rezzoug S. (2015). Intensification of *Hypericum perforatum* L. oil isolation by solvent-free microwave extraction. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 93, p. 621–631.
- ³¹ Ghorbani, M.; Shaterian, H. R.; Noura, S.; Khammar, F.; Behbodi, K.; Reisi, B.; Oftadeh, M. (2015). Effective preparation of hexahydroquinolines under ambient and solvent-free conditions. *Journal of Molecular Liquids*, v. 204, p. 15–20.
- ³² Disponível em: http://toxtown.nlm.nih.gov/text_version/chemicals.php?id=77. Acesso em 25 de Janeiro de 2015.
- ³³ Albuquerque, E. P.; Silva, J. C. L.; Costa, J. S.; Santos, S. M. (2013). Aspectos relativos à saúde e ao meio ambiente ligados ao consumo de alimentos orgânicos. *Rev. Adm. UFSM*, v. 6, Edição Especial, p. 295-312.
- ³⁴ Kintzios, S. E. Handbook of Herbs and Spices (2^a Edição), Volume 2, p. 417–436. 2012.
- ³⁵ Zheng, W.; Wang, S. Y. (2001). Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J. Agric. Food Chem.*, v. 49, p. 5165–5170.
- ³⁶ Lampe, J. W. (2003). Spicing up a vegetarian diet: Chemopreventive effects of phytochemicals. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 78, n.3, p. 579–583.
- ³⁷ Srinivasan, K. (2005). Spices as influencers of body metabolism: an overview of three decades of research. *Food Research International*, v. 38, n.1, p. 77–86.
- ³⁸ Del Ré, P.V.; Jorge, N.; (2012). Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v. 14, n. 2, p. 389-399.
- ³⁹ Vallverdu-Queralt, A.; Regueiro, J.; Martinez-Huelamo, M.; Alvarenga, J. F. R.; Leal, L. N.; Lamuela-Raventos, R. M. (2014) A comprehensive study on the phenolic profile of

widely used culinary herbs and spices: Rosemary, thyme, oregano, cinnamon, cumin and bay. *Food Chemistry*, v. 154, p. 299–307.

⁴⁰ Fukayama, E. H.; Bertechini, A. G.; Geraldo, A.; Kato, R. K.; Murgas, L. D. S., (2005). Extrato de Orégano como Aditivo em Rações para Frangos de Corte. *R. Bras. Zootec.*, v. 34, n. 6, p 2316-2326.

⁴¹ Asensio, C. M.; Grosso, N. R.; Juliani, H. R. (2015). Quality preservation of organic cottage cheese using oregano essential oils. *LWT - Food Science and Technology*, v. 60, p. 664-671.

⁴² Shukla, Y.; Singh, M. (2006). Cancer preventive properties of ginger: A brief review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, p. 683–690.

⁴³ Masuda, Y.; Kikuzaki, H.; Hisamoto, M.; Nakatani N., (2004). Antioxidant properties of gingerol related compounds from ginger. *BioFactors*, v. 21, p. 293-296.

⁴⁴ Gümüşay, O. A.; Borazan, A. A.; Ercal, N.; Demirkol, O., (2015). Drying effects on the antioxidant properties of tomatoes and ginger. *Food Chemistry*, v. 173, p. 156–162.

⁴⁵ Dabague, I.C.M.; Deschamps, C.;Mógor, A.F.; Scheer, A.P.;Côcco, L. (2011). Teor e composição de óleo essencial de rizomas de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) após diferentes períodos de secagem. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v. 13, n. 1, p. 79-84.

⁴⁶ Anum, Y.; Shahriza Z. A.; Looi, M. L.; Hanim, S.; Harlianshah, H.; Aini, N.; Suzana, M.; Zurinah, W. (2008). Ginger Extract (*Zingiber officinale* Roscoe) Triggers Apoptosis in Hepatocarcinogenesis Induced Rats. *Med & Health*, v. 3, n. 2, p. 263-274.

⁴⁷ Abdullah, S.; Abidin,S. A. Z.; Murad, N. A.; Makpol, S.; Ngah, W. Z. W.; Yusof, Y. A. M. (2010). Ginger extract (*Zingiber officinale*) triggers apoptosis and G₀/G₁ cells arrest in HCT 116 and HT 29 colon cancer cell lines. *African Journal of Biochemistry Research*, v. 4, n. 4, p. 134-142.

⁴⁸ Mahady, G. B.; Pendland, S. L.; Yun, G. S.; Lu, Z.; Stoia, A. (2003). Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and the Gingerols Inhibit the Growth of Cag A+ Strains of *Helicobacter pylori*. *Anticancer Res.*, v. 23, p. 3699–3702.

⁴⁹ Yeh, H.; Chuang, C.; Chen, H, Wan, C,; Chen, T.; Lin, L. (2014). Bioactive components analysis of two various gingers (*Zingiber officinale* Roscoe) and antioxidant effect of ginger extracts. *LWT - Food Science and Technology*, v. 55, p. 329-334.

⁵⁰ Prior, R. L.; Hoang, H.; Gu, L.; Wu X.; Bacchiocca, M.; Howard, L.; Hampsch, M.; Huang, D.; Ou, B.; Jacob, R. (2003). Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *J. Agric. Food Chem.*, v. 51, n. 11, p. 3273-3279.

⁵¹ Cao, G.; Alessio, H. M.; Cutler, R. G., (1993). Oxygen-Radical Absorbance Capacity - Assay For Antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 14, p. 303-311.

⁵² Huang, D.; Ou, B.; Prior R. L., (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, v. 53, n. 6, p. 1841-1856.

⁵³ Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Prior, R. L., (2004). Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 12, p. 4026-4037.

⁵⁴ Prior R., (2014). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. *Journal of Functional Foods*.

⁵⁵ Disponível em: <http://site.cqaquimica.com.br/equipamentos/vidautil/reator-para-estudo-de-estabilidade-de-oxidacao-oxitest-velp/>. Acesso em 13 de janeiro de 2015.

⁵⁶ Disponível em: http://www.velp.com/en/products/lines/1/family/54/shelf_life_investigations/95/oxidation_stability_reactor_oxitest. Acesso em 13 de Janeiro de 2015.

⁵⁷ Papastergiadis, A.; Mubiri, E.; Langenhove, H.; Meulenaer, B., (2012). Malondialdehyde Measurement in Oxidized Foods: Evaluation of the Spectrophotometric Thiobarbituric Acid

Reactive Substances (TBARS) Test in Various Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, p. 9589–9594.

⁵⁸ Osawa C. C.; Felício P. E.; Gonçalves L. A.G. (2005). Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. *Química Nova*, v. 28,n. , p. 655-663.

⁵⁹ Fluorometric Microplate Assay for 2-Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS). *Oxford Biomedical Research Inc.* (2012).

⁶⁰ Wang B.; Pace R. D.; Dessai A. P., Bovell-Benjamin A., Phillips B., (2002). Modified Extraction Method for Determining 2-Thiobarbituric Acid Values in Meat with Increased Specificity and Simplicity. *Journal of Food Science*, v. 67, n. 8, p. 2833.

⁶¹ Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S.; Fundamentos de Cromatografia – Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2006.

⁶² Disponível em: http://www.waters.com/waters/pt_BR/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27sGuide/nav.htm?/locale=pt_BR&cid=10048919. Acesso em 29 de Janeiro de 2015.

⁶³ Maldaner, L.; Jardim, I. C. S. F. (2009). O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Quim. Nova*, v. 32, n. 1, p. 214-222.

⁶⁴ Gross, J. H. *Mass Spectrometry: a textbook*. 2^o Edicao, Springer (2011).

⁶⁵ Pilau, E. J. (2010). *Desenvolvimentos Metodológicos em Proteômica Estrutural por Espectrometria de Massas*. Tese de Doutorado, Campinas – SP.

⁶⁶ Jiang, H.; Sólyom, A. M.; Timmermann, B. N.; Gang, D. R., (2005). Characterization of gingerol-related compounds in ginger rhizome (*Zingiber officinale* Rosc.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 19, p. 2957-2964.

-
- ⁶⁷ Khlifia, D.; El Hayouni, E. A.; Valentind, A.; Cazauxa, S.; Moukarzel, B.; Hamdi, M.; Bouajila, J. (2013). LC–MS analysis, anticancer, antioxidant and antimalarial activities of *Cynodon dactylon* L. extracts. *Industrial Crops and Products*, v. 45, p. 240–247.
- ⁶⁸ Liu, R.; Ruan, T.; Song, S.; Lin, Y.; Jiang, G. (2015). Determination of synthetic phenolic antioxidants and relative metabolites in sewage treatment plant and recipient river by high performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1381, p. 13–21.
- ⁶⁹ Boroski, M.; Aguiar, A. C.; Boeing, J. S.; Rotta, E. M.; Wibby, C. L.; Bonafé, E. G.; Souza, N. E.; Visentainer, J. V. (2011). Enhancement of pasta antioxidant activity with oregano and carrot leaf. *Food Chemistry*, v. 125, p. 696–700.
- ⁷⁰ Lawrence, R.; Lawrence, K. (2011). Antioxidant activity of garlic essential oil (*Allium Sativum*) grown in north Indian plains. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 1, n. 3, p. S51-S54.
- ⁷¹ Grzegorzcyk, I.; Matkowski, A.; Wysokin´ska, H. (2007). Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, v. 104, p. 536–541.
- ⁷² Santana-Méridas, O.; Polissiouc, M.; Izquierdo-Meleroa, M. E.; Astrakac, K.; Tarantilis, P. A.; Herraiz-Penalver, D.; Sánchez-Vioque, R. (2014). Polyphenol composition, antioxidant and bioplaguicide activities of the solid residue from hydrodistillation of *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, v. 59, p. 125–134.
- ⁷³ Kwee, E. M.; Niemeyer, E. D. (2011). Variations in phenolic composition and antioxidant properties among 15 basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivars. *Food Chemistry*, v. 128, p. 1044–1050.
- ⁷⁴ Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., Prior, R. L., (2004). Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, n. 12, p. 4026-4037.

⁷⁵ Verardo, V., Riciputi, Y., Sorrenti, G., Ornaghi, P., Marangoni, B., Caboni, M. F. (2013). Effect of nitrogen fertilisation rates on the content of fatty acids, sterols, tocopherols and phenolic compounds, and on the oxidative stability of walnuts. *LWT - Food Science and Technology*, v. 50, p. 732-738.

⁷⁶ Instituto Adolfo Lutz (1985). Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análise de alimento, 3ª edição, São Paulo: IMESP, v. 1, p. 533.

⁷⁷ Tsimogiannis, D.; Samiotaki, M.; Panayotou, G.; Oreopoulou, V. (2007). Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. *Molecules*, v. 12, p. 593-606.

⁷⁸ Sánchez-Rabeneda, F.; Jáuregui, O.; Casals, I., Andrés-Lacueva, C.; Izquierdo-Pulido, M.; Lamuela-Raventós, R. M. (2003). Liquid chromatographic/electrospray ionization tandem mass spectrometric study of the phenolic composition of cocoa (*Theobroma cacao*). *J. Mass Spectrom.*, v. 38, p. 35–42.

⁷⁹ Plazonić, A.; Bucar, F.; Maleš, Z.; Mornar, A.; Nigović, B.; Kujundžić, N. (2009). Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Molecules*, v.14, p. 2466-2490.

⁸⁰ Jolad, S. D.; R. Lantz, C. Solyom, A. M.; Chen, G. J.; Bates, R. B.; Timmermann, B. N. (2004). Fresh organically grown ginger (*Zingiber officinale*): composition and effects on LPS-induced PGE₂ production. *Phytochemistry*, v. 65, p. 1937–1954.

⁸¹ Tao, Y.; Li, W.; Liang, W.; Van Breemen, R. B. (2009). Identification and Quantification of Gingerols and Related Compounds in Ginger Dietary Supplements Using High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, v. 57, p. 10014–10021.