

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

DANIELE CRISTINA HASS SEREMETA

AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA  
QUERCETINA NO PROCESSO DE FOTODEGRADAÇÃO DO ÓLEO DE LINHAÇA.

PONTA GROSSA  
2014

DANIELE CRISTINA HASS SEREMETA

AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA  
QUERCETINA NO PROCESSO DE FOTODEGRADAÇÃO DO ÓLEO DE LINHAÇA.

Dissertação apresentada para a obtenção  
do título de Mestre em Química Aplicada no  
Programa de Pós-Graduação em Química  
Aplicada da Universidade Estadual de Ponta  
Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Jarem Raul Garcia  
Coorientador: Prof. Dr. Adriano Gonçalves Viana

PONTA GROSSA

2014

**Ficha Catalográfica**  
**Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG**

S483 Seremeta, Daniele Cristina Hass  
Avaliação da potencial atividade  
antioxidante da quercetina no processo de  
fotodegradação do óleo de linhaça/ Daniele  
Cristina Hass Seremeta. Ponta Grossa,  
2014.  
96f.

Dissertação (Mestrado em Química  
Aplicada - Área de Concentração: Química),  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.  
Orientador: Prof. Dr. Jarem Raul  
Garcia.  
Co-Orientador: Prof. Dr. Adriano  
Gonçalves Viana.

1. Óleo de linhaça. 2. Foto-oxidação.  
3. Agentes antioxidantes. I. Garcia, Jarem  
Raul. II. Viana, Adriano Gonçalves. III.  
Universidade Estadual de Ponta Grossa.  
Mestrado em Química Aplicada. IV. T.

CDD: 547

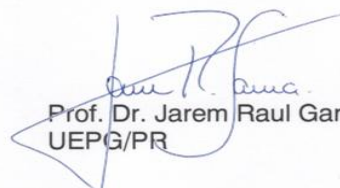
**TERMO DE APROVAÇÃO**

**DANIELE CRISTINA HASS SEREMETA**

**“AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA  
QUERCETINA NO PROCESSO DE FOTODEGRADAÇÃO DO  
ÓLEO DE LINHAÇA.”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora.

Orientador:

  
Prof. Dr. Jarem Raul Garcia  
UEPG/PR

  
Profa. Dra. Barbara Celânia Fiorin  
UEPG/PR

  
Profa. Dra. Patrícia Los Weinert  
UEPG/PR

**Ponta Grossa, 12 de março de 2014.**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, nosso Senhor, dono de toda sabedoria, pelos livramentos dos perigos da vida, pela força que me tem dado diariamente para não desistir, pela sua constante presença em todos os momentos de minha vida, pois me fez acreditar e concretizar mais esta importante etapa da minha vida acadêmica. Obrigada Senhor, por TUDO!

Aos meus queridos pais, Celso e Thelma, os quais sempre me incentivaram a estudar e nunca desistir dos meus sonhos. Os agradeço também, pela sincera confiança que em mim depositaram desde os primeiros anos de escola, sempre colocando os meus estudos, em primeiro lugar nas suas vidas. Finalmente, os agradeço por ter me dado à oportunidade de ter concluído minha graduação, oportunidade esta, que agora se reflete na conclusão da pós-graduação. Amo vocês!

Ao meu marido Taumy pelo apoio e incentivo para nunca desistir dos meus sonhos e objetivos. Obrigada por tudo, AMO VOCÊ!!

Aos profs. Dr. Adriano Gonçalves Viana e Dr. Jarem Raul Garcia, por acreditar em mim, sempre oferecer oportunidades de novos conhecimentos na vida acadêmica e pela disponibilidade de seus tempos. Obrigada por TUDO!

À profa. Dra Barbara Celânia Fiorin pelas contribuições na realização e interpretação das técnicas espectroscópicas.

À profa. Dra Juliana Inaba pelas contribuições na realização das análises de atividade antioxidante.

Aos professores Dr. Luis Antonio Pinheiro e Dra. Patrícia Los pelas contribuições das análises estatísticas.

Às minhas colegas de laboratório Larissa Sens e Rhayane Torrens, pelo companheirismo, apoio e ajuda constante.

À todas as minhas colegas que estiveram comigo nas horas mais difíceis.

À Simone e Bárbara (técnicas do CLABMU), por ter ajudado nos ensaios de Termogravimetria e Infravermelho.

A CAPES pelo suporte financeiro durante a realização deste trabalho.

*“Essa vitória custou-lhe momentos difíceis, noites de dúvidas,  
intermináveis dias de espera.  
Desde os tempos antigos, celebrar um triunfo faz parte do próprio  
ritual da vida: a comemoração é um rito de passagem.  
Celebrar hoje a sua vitória de ontem, para ter mais forças na batalha  
de amanhã”*

*Manual do Guerreiro da Luz*

*Paulo Coelho*

## RESUMO

O óleo extraído da linhaça, a semente do linho (*Linum usitatissimum*L.), contém elevado teor de ácidos graxos poliinsaturados (ácido oleico, linoleico e linolênico) os quais o torna susceptível à oxidação. Como a oxidação é um fator crítico inerente aos óleos vegetais, este trabalho visou contribuir com dados de estabilidade térmica e oxidativa do óleo de linhaça, aditivado ou não como antioxidante quercetina, submetido à foto-oxidação por um período de 15 dias. O processo oxidativo foi avaliado pelos parâmetros químicos índice de acidez e índice de peróxidos, assim como por espectroscopia UV-Vis, IV e RMN de <sup>1</sup>H. Os resultados mostraram que a metodologia adotada para a foto-oxidação em câmara clara (temperatura ambiente; 115,2 Lux; 15 dias) foi eficiente, pois o óleo apresentou sinais típicos de degradação, como a formação de ácidos graxos livres, peróxidos e dienos conjugados. A presença de compostos secundários de oxidação como os voláteis que geram o denominado de ranço e o processo de polimerização por formação de ligações cruzadas também foram observados. As análises estatísticas confirmaram que quanto maior o tempo de exposição, aliado à presença de luz, maior a facilidade de ocorrer degradação. Avaliou-se também o efeito protetor da adição de agentes antioxidantes (TBHQ e quercetina) no óleo durante a foto-oxidação. Os resultados indicaram que os mesmos não evitaram a formação de ácidos graxos livres, peróxidos e dienos conjugados, mas impediram a formação dos compostos secundários do ranço e o processo de polimerização.

**Palavras chave:** óleo de linhaça; foto-oxidação; agentes antioxidantes.

## ABSTRACT

The linseed oil, obtained from the flax's seed (*Linum usitatissimum* L.) contains high levels of polyunsaturated fatty acids as oleic, linoleic and linolenic acid, which makes it susceptible to oxidation. As oxidation is a critical factor inherent to vegetable oils, this study intends to contribute with data from thermal and oxidative stability of linseed oil, with and without the antioxidant quercetin subject photo-oxidation for a period of 15 days. The oxidative process was evaluated by chemical parameters acidity index (AI), peroxide index (IP) and spectroscopic UV-Vis, IR and <sup>1</sup>H NMR. The results showed that the methodology adopted for the photo-oxidation in light box (at room temperature; 115.2 Lux and 15 days) was effective because there was oil degradation. The statistical analyzes confirmed that the greater the exposure time, and this coupled with the presence of light, the more easily occurs the degradation process. Was also evaluated the effect of adding quercetin and TBHQ antioxidant in the oil during photo-oxidation. The results showed that they did not prevent the formation of free fatty acid, peroxides and conjugated dienes, but prevented the formation of secondary oxidation compounds as volatile generating the rancidity, and the polymerization characterized by crosslinking.

**Keywords** : linseed oil, photo-oxidation, antioxidant agents.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1**-Representação esquemática de um ácido graxo e o glicerol (A), Estrutura geral de um triacilglicerol ( $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$  = grupo alquil saturado ou insaturado; podendo ser igual ou diferente) (B). ..... 17
- Figura 2** - Reação de Esterificação do glicerol na reação direta e hidrólise do triglicerídeo podendo formar ácidos graxos na reação inversa. .... 17
- Figura 3**- Estrutura e classificação dos ácidos graxos linolênico, linoleico e oleico ..... 19
- Figura 4** - (a) Plantação da linhaça; (b) Linhaça após colheita; (c) Flores da linhaça; (d) Cápsula globulosa madura e (e) Sementes de linhaça marrom e dourada..... 20
- Figura 5** – As posições nas cadeias graxas mais propensas à oxidação apresentam-se marcadas com um círculo pontilhado. .... 23
- Figura 6** – Rota clássica da auto-oxidação ..... 24
- Figura 7**- Exemplo representativo do processo de auto-oxidação do ácido linoleico com formação de hidroperóxidos. .... 25
- Figura 8** - Ligações cruzadas (cross linking) ocorridas em óleos: unidade glicerol (G) e ácidos graxos (F) ..... 27
- Figura 9**- Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria alimentícia. .... 29
- Figura 10** - Estrutura do flavonoide quercetina um antioxidante natural encontrado em diversas fontes. .... 31
- Figura 11** - Esquema do reator (caixa) de fotodegradação com incidência de R-UV, com lâmpada ultravioleta, ventoinha, termômetro e com a amostra de óleo de linhaça puro..... 38
- Figura 12** - Espectro de UV-Vis do óleo de linhaça in natura, com absorção máxima em 238 nm. .... 43
- Figura 13** –Espectro de infravermelho do óleo de linhaça in natura, com os grupamentos característicos de ácidos graxos..... 45
- Figura 14** – (1) Estrutura de um ácido graxo (2) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  tipicamente obtido para uma amostra de óleo vegetal (3) expansão dos picos a e b. .... 47
- Figura 15** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do óleo de linhaça in natura, mostrando todos os picos característicos de óleos vegetais. .... 48
- Figura 16** – Índice de acidez do óleo de linhaça foto-oxidado, com os controles natural e escuro..... 50

<b>Figura 17</b> – Índice de peróxidos do óleo de linhaça foto-oxidado, juntamente com os controles natural e escuro. ....	53
<b>Figura 18</b> – Espectro UV-Vis dos óleos de linhaça foto-oxidado no primeiro dia da foto-oxidação, juntamente com o controle do óleo in natura, escuro e natural.....	54
<b>Figura 19</b> – Espectro UV-Vis do óleo de linhaça foto-oxidado na câmara clara no 1°, 5°, 10° e 15° dia de experimento. ....	55
<b>Figura 20</b> - Espectro IR das amostras do óleo de linhaça foto-oxidado, juntamente com o controle do óleo in natura, escuro e natural: (a) foto-oxidação ocorrida no óleo de linhaça do primeiro ao quinto dia, (b) comportamento do óleo do sexto ao décimo dia e (c) do décimo primeiro ao último dia da oxidação. ....	56
<b>Figura 21</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do óleo de linhaça no terceiro dia da foto-oxidação, com pontilhado na região do aparecimento do pico em 3,7 ppm.....	58
<b>Figura 22</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do óleo de linhaça no sétimo dia da foto-oxidação, com pontilhado nas regiões do aparecimento de picos em 1,05; 3,7 e 4,05 ppm.....	59
<b>Figura 23</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do óleo de linhaça no décimo dia da foto-oxidação, com pontilhado nas regiões do aparecimento dos picos em 1,4; 3,7 e 4,8 ppm.....	60
<b>Figura 24</b> – Estrutura do hidroperoxi-epidioxido derivado da trilinolenina.....	61
<b>Figura 25</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do óleo de linhaça no oitavo dia da foto-oxidação, com pontilhado nas regiões do aparecimento dos picos em 1,05; 3,7 e 4,8 ppm.....	61
<b>Figura 26</b> - Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do óleo de linhaça no décimo dia da foto-oxidação, com pontilhado nas regiões do aparecimento dos picos em 3,7 e 4,05 ppm.....	62
<b>Figura 27</b> – Fragmento insaturado de um ácido graxo mostrando as posições alílicas (E), vinílicas (V), dialílicas (G) e a fração residual desses hidrogênios após foto-oxidação. ....	63
<b>Figura 28</b> – Gráfico dos escores de Factor 1 <i>versus</i> Factor 2 das 45 amostras de óleo de linhaça submetido à foto-oxidação. ....	65
<b>Figura 29</b> - Formas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH.....	66
<b>Figura 30</b> – Percentual de inibição do radical livre DPPH pelos antioxidantes TBHQ e Quercetina.....	67
<b>Figura 31</b> – Índice de acidez da foto-oxidação do óleo de linhaça na presença e ausência antioxidantes TBHQ e Quercetina em sistema claro durante 15 dias. ....	69
<b>Figura 32</b> - Índice de peróxidos da foto-oxidação do óleo de linhaça na presença e ausência de antioxidantes TBHQ e Quercetina. ....	70
<b>Figura 33</b> – Espectro UV-Vis do primeiro dia da foto-oxidação do óleo de linhaça na presença e ausência de antioxidantes TBHQ e Quercetina. ....	71

<b>Figura 34</b> - Espectro UV-Vis do segundo ao sexto dia da foto-oxidação do óleo de linhaça.. .....	72
<b>Figura 35</b> - Espectro UV-Vis do sétimo ao último dia da foto-oxidação do óleo de linhaça... .....	72
<b>Figura 36</b> – Espectro IR do óleo de linhaça na presença e ausência de antioxidantes durante o processo de foto-oxidação (a), primeiro dia, (b) do 2º ao 10º dia e (c) do 11º ao último dia de oxidação.....	73
<b>Figura 37</b> - Espectro de RMN de 1H do óleo de linhaça com a utilização dos antioxidantes no décimo dia da foto-oxidação, com pontilhado na região do aparecimento do pico em 2,9 e 3,7 ppm (mesmo comportamento para os três sistemas). .....	76
<b>Figura 38</b> – Estrutura do mono hidroperóxido derivado da trilinolenina.....	76
<b>Figura 39</b> - Espectro de RMN de 1H do óleo de linhaça com a utilização dos antioxidantes no décimo terceiro dia da foto-oxidação, com pontilhado na região do aparecimento do pico em 2,9; 6,1 e 6,6 ppm (mesmo comportamento para os sistemas que contém antioxidantes). .....	77
<b>Figura 40</b> – Gráfico dos escores de Factor 1 <i>versus</i> Factor 2 das 45 amostras de óleo de linhaça submetido à foto-oxidação com adição dos antioxidantes TBHQ e Quercetina.....	79
<b>Figura 41</b> – Curvas TG/DTG do óleo de linhaça in natura. ....	81

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Simbologia, nomenclatura e estrutura molecular dos principais ácidos graxos presentes na composição dos óleos vegetais. ....	18
<b>Tabela 2</b> - Composição de ácidos graxos (% em massa) de alguns óleos vegetais. ....	18
<b>Tabela 3</b> - Produtos de oxidação secundários dos ácidos oleico, linoleico e linolênico. ....	26
<b>Tabela 4</b> - Resultados parciais e referências para as análises físico-químicas do óleo de linhaça.....	40
<b>Tabela 5</b> – Grupos cromóforos de produtos de oxidação e regiões de absorção no espectro de ultravioleta. ....	43
<b>Tabela 6</b> –Bandas de absorção dos principais grupos funcionais de ácidos graxos insaturados de cadeia longa (PAVIA et al, 2012).....	44
<b>Tabela 7</b> – Especificações das bandas significativas do espectro de infravermelho do óleo em estudo.....	45
<b>Tabela 8</b> – Índice de acidez e índice de peróxidos do óleo de linhaça foto-oxidado por 15 dias, juntamente com os controles escuro e natural.....	50
<b>Tabela 9</b> - Análise de variância por regressão múltipla.....	52
<b>Tabela 10</b> – Resultados obtidos por RMN de <sup>1</sup> H, e parâmetros PM, II, Roa e %Ln calculados conforme metodologia descrita por BELESKI-CARNEIRO, REDA E CARNEIRO, 2005...	57
<b>Tabela 11</b> – Índice de acidez e peróxidos do óleo de linhaça na ausência e presença de antioxidantes monitorado por 15 dias.....	68
<b>Tabela 12</b> – Resultados obtidos pela RMN de <sup>1</sup> H com a utilização de antioxidantes TBHQ e Quercetina.....	74

## LISTA DE EQUAÇÕES

<b>EQUAÇÃO 1</b> – Índice de acidez.....	35
<b>EQUAÇÃO 2</b> – Índice de peróxidos.....	36
<b>EQUAÇÃO 3</b> – Cálculo da massa molecular por RMN de $^1\text{H}$ .....	37
<b>EQUAÇÃO 4</b> – Cálculo do índice de iodo por RMN de $^1\text{H}$ .....	37
<b>EQUAÇÃO 5</b> – Cálculo do Roa por RMN de $^1\text{H}$ .....	37
<b>EQUAÇÃO 6</b> – Capacidade de inativação do radical DPPH.....	39
<b>EQUAÇÃO 7</b> – Reações envolvidas na determinação do índice de peróxidos.....	41
<b>EQUAÇÃO 8</b> – Reação de hidrólise do TAG.....	51

## LISTA DE SIGLAS

**AG** – Ácido graxo

**AGL** – Ácido graxo livre

**AH** – Antioxidante

**ANOVA** – Análise de variância

**BHA** – Butilhidroxianisol

**BHT** – Butilhidroxitolueno

**DC** – Dieno Conjugado

**DPPH** – 2,2-difenil-1-picrilidrazil do inglês (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)

**DTA** – Análise Térmica Diferencial

**DTG** – Termogravimetria Derivada

**EP** – Erro puro

**FAJ** – Falta de ajuste

**FTIR** – Espectrometria Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier do inglês (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)

**IA** – Índice de Acidez

**IP** – Índice de Peróxidos

**MQ** – Média quadrática

**ORAC** – Capacidade de absorção de radicais de oxigênio do inglês (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

**PCA** – Análise de componentes principais do inglês (Principal component analysis)

**PG** – Propil Galato

**REGR** – Regressão

**RES** - Resíduos

**RH** – Ácido graxo insaturado

**RMN** – Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear

**R-UV** – radiação ultravioleta

**SQ** – Soma quadrática

**TAG** – Triacilgliceróis

**TBHQ** – Terc-butil hidroquinona

**TC** – Trieno Conjugado

**TG** – Termogravimetria

**UV-Vis** – Espectroscopia de Ultravioleta Visível

## **LISTA DE ANEXOS**

**ANEXO A** – Estatística do IA para foto-oxidação durante 15 dias.

**ANEXO B** – Estatística do IP para foto-oxidação durante 15 dias.

**ANEXO C** – Estatística do IA para foto-oxidação durante 15 dias utilizando antioxidantes.

**ANEXO D** - Estatística do IP para foto-oxidação durante 15 dias utilizando antioxidantes.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1 Justificativa.....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Óleos Vegetais.....	16
2.1.1 Definição.....	16
2.1.2 Composição e Estrutura.....	16
2.1.3 Óleos Vegetais e a Saúde Humana.....	19
2.2 Linhaça ( <i>Linum usitatissimum</i> L.).....	19
2.3 Processos de deterioração de óleos vegetais.....	22
2.3.1 Autoxidação.....	22
2.3.2 Fotoxidação.....	26
2.4 Antioxidantes.....	28
2.4.1. Quercetina.....	31
2.5 Estado da arte.....	32
3. OBJETIVOS.....	34
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos Específicos.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Materiais.....	35
4.2 Métodos.....	35
4.2.1 Técnicas de Caracterização.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
5.1 Caracterização inicial do óleo.....	40
5.2 Ensaio de foto-oxidação.....	48
5.3 Atividade Inibitória de Radicais Livres (DPPH).....	65
5.4 Ensaio de foto-oxidação utilizando antioxidantes.....	68
5.5 Análise térmica.....	79
6. CONCLUSÕES.....	82
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
8. ANEXOS.....	93



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Justificativa

O Brasil é um país que possui uma extensa área territorial, além de clima tropical e subtropical, o que favorece o plantio de uma ampla diversidade de espécies produtoras de óleo vegetal.

Os óleos vegetais são matérias primas renováveis e apresentam diversas aplicações pelo fato de possuírem ampla disponibilidade, baixo custo, facilidade de processamento, baixa toxicidade, baixo índice de formação de resíduos durante a produção e, sobretudo, pela possibilidade de serem biodegradáveis, acarretando em uma menor geração de resíduos para o meio ambiente.

O óleo de linhaça (*Linum usitatissimum* L.) é um dos mais empregados na indústria por apresentar ampla aplicação: é considerado um dos mais importantes óleos secantes pois apresenta em sua composição elevado índice de insaturação que lhe confere alta reatividade química, principalmente com o oxigênio do ar, garantindo assim um melhor desempenho no que diz respeito à preparação de resinas, vernizes e polímeros quando comparado à outros óleos, além de ser usado na indústria de alimentos, na formulação de tintas, sabões e cremes. Contudo a presença de agentes oxidantes como O<sub>2</sub>, luz e calor no ambiente pode interferir na composição do óleo de linhaça, tornando-o vulnerável a sofrer processos de degradação (auto-oxidação, foto-oxidação e termo-oxidação). Para avaliar o processo degradativo são utilizadas técnicas titulométricas que além de serem limitadas, são trabalhosas e demoradas, e técnicas espectroscópicas que são mais rápidas, precisas e geram um grande número de informações sobre a estrutura da molécula em um curto período de tempo e fornecem resultados confiáveis sobre o real estado oxidativo dos óleos vegetais. A adição de antioxidantes nos óleos vegetais se torna necessária para prolongar a vida-de-prateleira dos mesmos, portanto ao adicioná-los pode-se promover uma proteção efetiva no sistema. As análises estatísticas, ajudam a interpretar os dados e demonstrar quais são os fatores que realmente produzem efeitos significativos nas respostas de um sistema.

Neste contexto este trabalho tem como objetivo avaliar a qualidade do óleo de linhaça submetido a foto-oxidação, na presença e ausência de quercetina que é um agente antioxidante natural, por técnicas físico-químicas e espectroscópicas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Óleos Vegetais**

#### **2.1.1 Definição**

Os óleos vegetais são extraídos de diferentes plantas oleaginosas e são utilizados principalmente como fonte de alimento e na produção de cosméticos, lubrificantes, tintas, fármacos e biodiesel, entre outros. Juntamente com as proteínas e os carboidratos, são fontes de energia, apresentando grande importância para a indústria, na produção de ácidos graxos, glicerina, lubrificantes, carburantes, biodiesel, além de inúmeras outras aplicações (REDA & CARNEIRO, 2007).

Óleos e gorduras juntamente com as ceras são compostos que fazem parte da família dos lipídios, os quais constituem um grupo quimicamente heterogêneo de substâncias insolúveis em água (hidrofóbicas), mas solúveis em solventes apolares (LEHNINGER et al, 1995).

Os óleos além de triacilgliceróis (TAGs), contêm vários componentes em menores proporções, como mono e diglicerídeos (importantes como emulsionantes); ácidos graxos livres; tocoferóis (importantes antioxidantes); proteínas, esteróis e vitaminas (FARIA et al, 2002).

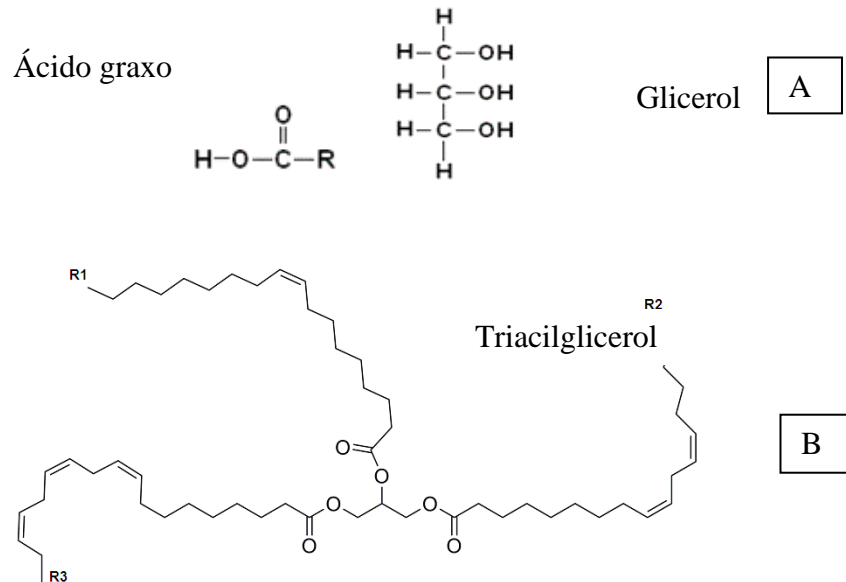
Segundo a Resolução RDC nº 270, de 22 de setembro de 2005, óleos e gorduras vegetais são os produtos constituídos principalmente de glicerídeos de ácidos graxos de espécie(s) vegetal(is) e que podem conter pequenas quantidades de outros lipídeos como fosfolipídeos, constituintes insaponificáveis e ácidos graxos livres naturalmente presentes no óleo ou na gordura. A diferença entre óleos e gorduras é que os óleos vegetais se apresentam na forma líquida à temperatura de 25°C e as gorduras vegetais se apresentam na forma sólida ou pastosa à temperatura de 25°C (ANVISA, 2005).

#### **2.1.2 Composição e Estrutura**

Os óleos vegetais são constituídos majoritariamente por triacilgliceróis, que são compostos por três fragmentos de ácidos graxos idênticos ou diferentes- AG (ácidos carboxílicos) unidos por ligação éster com uma molécula de glicerol (LEHNINGER et al, 1995). Cada um destes ácidos graxos pode conter diferentes números de átomos de carbono, bem como diferentes graus de insaturação (duplas ligações) (MORETTO; FETT, 1998). Os ácidos graxos contribuem de 94 a 96% do peso total de uma molécula de triglicerídeo no óleo (MAYES, 1994 apud MOREIRA, 1999).

A Figura 1 apresenta esquematicamente um ácido graxo (onde R representa a cadeia carbônica), o glicerol e a estrutura geral de um triglicerídeo.

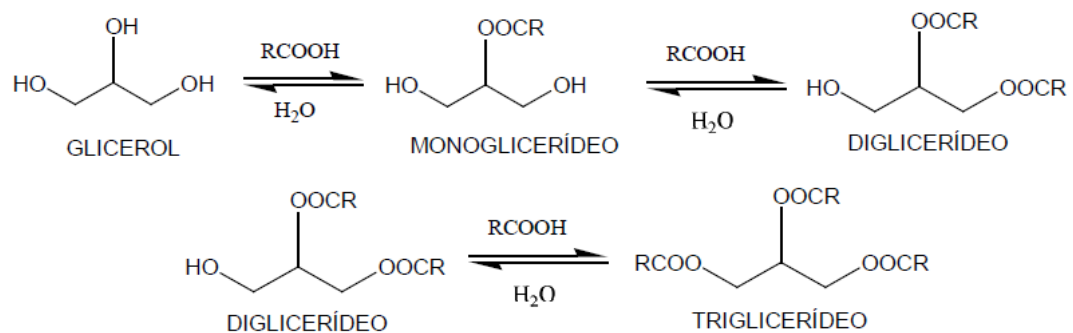
**Figura 1-** Representação esquemática de um ácido graxo e o glicerol (A), Estrutura geral de um triacilglicerol (R1, R2, R3 = grupo alquil saturado ou insaturado; podendo ser igual ou diferente) (B).



Fonte: MAYES, 1994 apud MOREIRA, 1999.

Na Figura 2 estão representados os produtos da reação de uma molécula de glicerol (glicerina) com até 3 moléculas de ácidos graxos. A reação no sentido direto ( $\rightarrow$ ) é chamada “reação de esterificação”. Os glicerídeos são ésteres de glicerol. No sentido inverso ( $\leftarrow$ ) a reação é dita “reação de hidrólise”. Assim, os ácidos graxos podem ser obtidos pela hidrólise dos glicerídeos (RODRIGUES, 2008).

**Figura 2 -** Reação de Esterificação do glicerol na reação direta e Hidrólise do triglicerídeo podendo formar ácidos graxos na reação inversa.

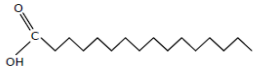
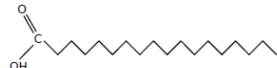
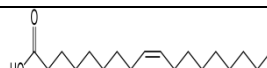
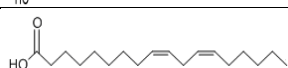
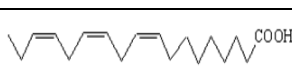


Fonte: RODRIGUES, 2008.

Os AGs são geralmente representados pelo símbolo  $\text{C}_x:\text{y}(\text{z})$ , em que  $\text{C}_x$  indica o número de átomos de carbono que forma a cadeia linear; y e z indicam a quantidade de duplas

ligações existentes na molécula e sua(s) posições, respectivamente (MAHAN & ESCOTT-STUMP, 2010 apud FASSINA 2011). A Tabela 1 mostra alguns dos principais ácidos graxos presentes na composição dos óleos vegetais.

**Tabela 1** - Simbologia, nomenclatura e estrutura molecular dos principais ácidos graxos presentes na composição dos óleos vegetais.

<b>Símbolo [Cx:y(z)]</b>	<b>Nomenclatura sistemática/usual</b>	<b>Estrutura molecular</b>
<b>16:0</b>	Hexadecanóico/ Ácido palmítico	
<b>18:0</b>	Octadecanóico/ Ácido esteárico	
<b>18:1 (9)</b>	Cis 9- Octadecanóico/ Ácido oleico	
<b>18:2 (9,12)</b>	Cis, cis 9,12 – Octadecadienóico/ Ácido linoleico	
<b>18:3 (9,12,15)</b>	Cis, cis, cis 9, 12, 15- Octadecatrienóico/ Ácido linolênico	

Fonte: LOPES, 2009.

A Tabela 2 apresenta alguns óleos vegetais comuns e as percentagens respectivas dos ácidos graxos que os compõem, incluindo o óleo de linhaça.

**Tabela 2** - Composição de ácidos graxos (% em massa) de alguns óleos vegetais.

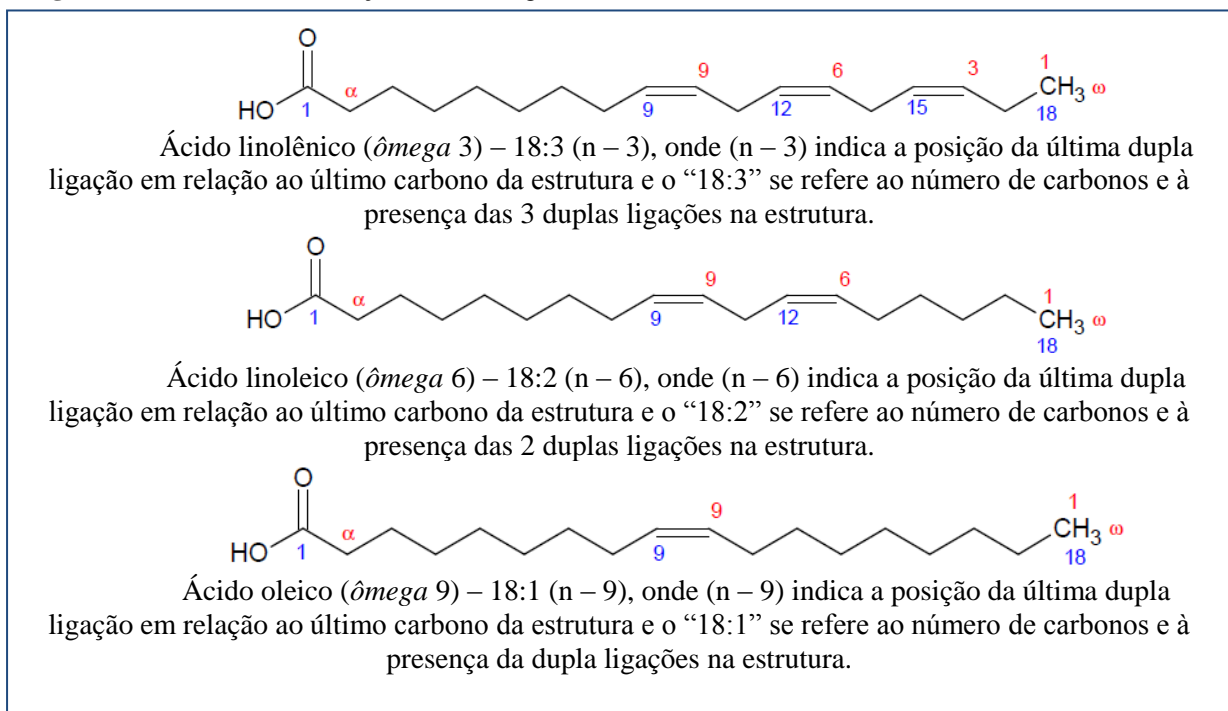
<b>Ácidos Graxos</b>	<b>Estrutura</b>	<b>Óleo de Mamona (%)*</b>	<b>Óleo de Linhaça (%)**</b>	<b>Óleo de Palma (%)</b>	<b>Óleo de Soja (%)</b>	<b>Óleo de Girassol (%)</b>
<b>Ácido palmítico</b>	C16:0	1 – 2	4 - 10	39	12	6
<b>Ácido esteárico</b>	C18:0	0,9 - 2	2 – 8	5	4	4
<b>Ácido oleico</b>	C18:1	2,9 - 6	10 – 24	45	24	17
<b>Ácido linoleico</b>	C18:2	3 - 5	12 – 19	9	53	73
<b>Ácido linolênico</b>	C18:3	0 - 0,5	48 – 60	-	7	-
<b>Ácido ricinoleico</b>	C18:1	88	-	-	-	-

Fonte: MARQUETTI et al, 2007\* Segundo Campestre, \*\* segundo Mills & White (1994), apud Fonseca (2009)

### 2.1.3 Óleos Vegetais e a Saúde Humana

Segundo Sizer e Whitney (2003) e Olszewer e Naveira (1997), os ácidos graxos linolênico, linoleico e oleico, são agrupados em famílias conhecidas como ômega, pertencendo à famílias ômega 3, ômega 6 e ômega 9, respectivamente. Essas famílias ômega são gorduras poliinsaturadas que fazem parte de um grupo de ácidos graxos essenciais à vida por ajudarem na redução dos níveis de colesterol no sangue e desempenharem funções fisiológicas fundamentais nos seres vivos. Como não são produzidos pelo corpo humano devem ser supridos pela dieta. A Figura 3 representa a estrutura química e a classificação dos ácidos graxos linolênico, linoleico e oleico respectivamente ácidos ômega 3, 6 e 9.

**Figura 3** -Estrutura e classificação dos ácidos graxos linolênico, linoleico e oleico



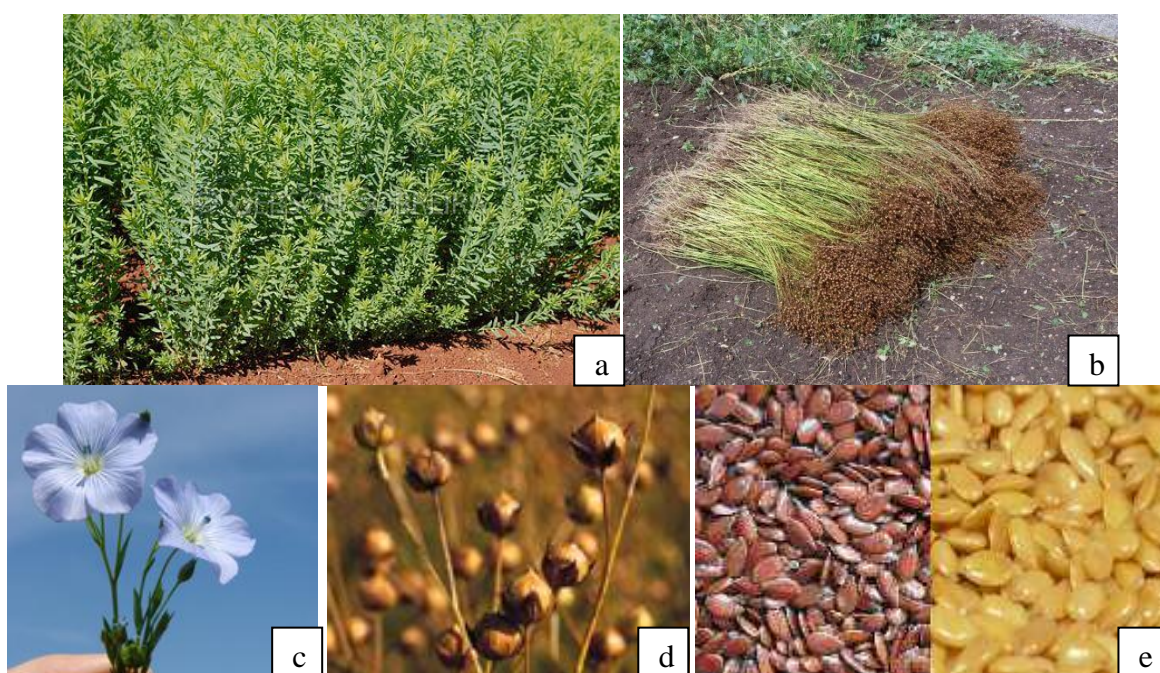
Fonte: FASSINA, 2011.

### 2.2 Linhaça (*Linum usitatissimum* L.)

De origem asiática, o *Linum usitatissimum* L., que pertence à família das *Lináceas*, é uma das herbáceas mais antigas da história da humanidade e deriva da semente do linho (REDA & CARNEIRO, 2007; LOPES, 2009). Há aproximadamente 7.000 anos era cultivada na Babilônia, Mesopotâmia e Egito e, desde então, vem sendo cultivada em quase todos os lugares do mundo, crescendo em climas tropicais, mas, principalmente, em climas temperados (LOPES, 2009).

A planta da linhaça é caracterizada por apresentar uma altura entre 40 e 80 cm, caule reto, folhas alongadas e estreitas (Figuras 4a e 4b) e flores de coloração azul-claro com cinco pétalas (Figura 4c). O fruto é uma cápsula globulosa de coloração marrom (Figura 4d), também conhecida como cachopa, que contém de sete a onze sementes. A semente da linhaça (Figura 4e) é pequena, plana e oval e com borda pontiaguda (GALVÃO, 2009). Apresenta textura lisa e brilhante e, um sabor levemente amargo. Sua cor pode variar de marrom-avermelhado ao amarelo brilhante, em função do teor de pigmento de cada variedade. Excetuando-se o teor de pigmentos, não há, contudo, diferenças significativas entre as composições dos dois tipos de sementes (linhaça marrom x dourada), pois ambas contêm os mesmos nutrientes e mantêm o mesmo potencial funcional (LOPES, 2009).

**Figura 4** - (a) Plantação da linhaça; (b) Linhaça após colheita; (c) Flores da linhaça; (d) Cápsula globulosa madura e (e) Sementes de linhaça marrom e dourada.



Fonte: GALVÃO, 2009.

A linhaça é classificada como uma semente oleaginosa em virtude de seu elevado teor de lipídios (36 a 42%). Esse óleo constitui uma das maiores fontes de ácido linolênico (18:3) cerca de 48 a 60%, seguida do ácido oleico (18:1) com valores de 10 a 24%, o ácido linoleico (18:2) variando de 12 a 19%, além de frações minoritárias de outros ácidos graxos como palmítico (4 a 10%) e esteárico (2 a 8%) como mostrado na Tabela 2 (GALVÃO, 2009).

Além de ácidos graxos, a linhaça apresenta fibras solúveis e insolúveis, das quais se destaca a lignana, um fitoestrógeno com ação benéfica semelhante ao do hormônio feminino

estrogênio (GALVÃO, 2009). O conteúdo de proteínas na semente seca pode variar de 21 a 26% (sendo a albumina e a globulina as principais proteínas). Apresenta ainda vitaminas hidrossolúveis e lipossolúveis, com destaque para a vitamina E, que na linhaça está presente primariamente como gama-tocoferol (TRUCOM, 2006). A vitamina E atua na linhaça como um antioxidante biológico de forma a prevenir a degradação dos ácidos graxos poliinsaturados presentes no óleo (BOZAN e TEMELLI, 2008).

O óleo de linhaça tem uma coloração amarelo-dourado, marrom ou âmbar, e deve ser prensado a frio, pois a temperatura é uma variável determinante para acelerar o processo de oxidação do óleo obtido. Além disso, observa-se que com a prensagem na faixa de temperatura de 40 a 45 °C é possível obter rendimentos maiores em termos de quantidades de óleo, comparado à prensagem a 25 °C (TRUCOM, 2006).

Desde o início do século XV, o óleo de linhaça tem sido utilizado como óleo secativo em tintas artísticas, esta característica está diretamente relacionada às insaturações que lhes conferem reatividade química, principalmente com o oxigênio do ar (auto-oxidação) e capacidade de polimerização, portanto ele apresenta bom desempenho na preparação de resinas e vernizes (DERKSEN et al, 1996).

A produção mundial de linhaça encontra-se entre 2.300.000 e 2.500.000 toneladas anuais. O Canadá destaca-se com a maior produção até dezembro de 2009 (FLAX COUNCILOF CANADÁ, 2010), seguido pelos Estados Unidos, Índia, China, Ucrânia, Rússia, Bélgica, França e Alemanha (TRUCOM, 2006). Na América do Sul, os maiores produtores são a Argentina, com cerca de 80.000 ton/ano e o Brasil, que apresenta baixa produção, com cerca de 21.000 ton/ano (JACINTO,2007). No Brasil, o plantio ocorre no outono, período compreendido entre os meses de abril a junho, principalmente no Rio Grande do Sul, sendo que a colheita se dá na primavera e no verão (LOPES, 2009).

Na indústria, a linhaça desempenha um papel muito importante. As fibras retiradas do caule são utilizadas na produção de um tecido muito valorizado no mercado, o linho (RENNEBAUM et al. 2002). As sementes podem ser utilizadas para produção de óleo e farelo, sendo utilizado como suplemento alimentar, adicionada em pães, bolos e biscoitos, ou ainda cruas aos cereais, proporcionando equilíbrio nutricional (LOPES, 2009). O farelo pode ser produzido para o consumo humano ou mais comumente, ser utilizado como matéria-prima para produção de rações animais (GALVÃO, 2009). Medicinalmente, são utilizadas na prevenção de distúrbios gástricos, indigestão, úlceras duodenais, atuando também como laxante suave (LOPES, 2009).

O óleo pode ser encontrado encapsulado ou engarrafado para fins alimentícios e também é vendido como matéria-prima para empresas produtoras de sabões, cosméticos, tintas, vernizes, resinas, materiais poliméricos e outros fins industriais (BICKERT, LÜHS e FRIEDT, 1994).

### **2.3 Processos de deterioração de óleos vegetais**

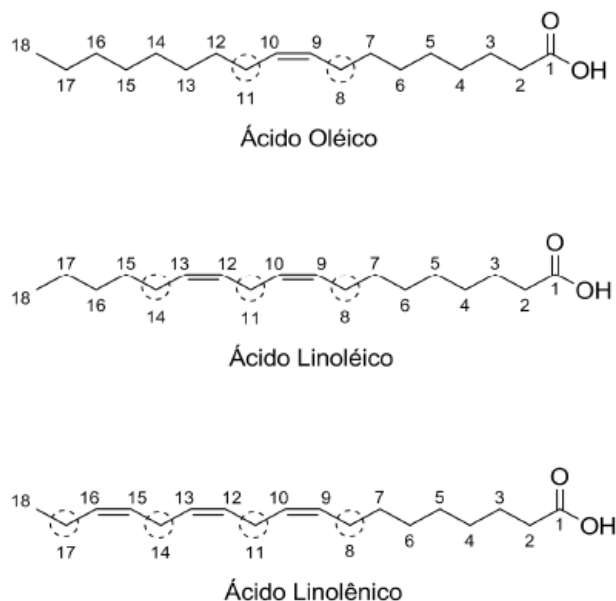
A oxidação é a reação mais importante do ponto de vista da qualidade de óleos e gorduras e pode ocorrer durante a estocagem da matéria prima, processamento, tratamento térmico e estocagem do ponto final, quando esses são expostos a fatores ambientais como ar, luz e temperaturas elevadas (MORETTO & FETT, 1998). Os processos de oxidação de substâncias orgânicas são uma das principais causas de redução do prazo de validade dos produtos alimentícios industrializados bem como das matérias-primas em geral, alterando não somente a qualidade nutricional, mas também a integridade e segurança dos alimentos tornando-os impróprios para o consumo devido a formação de substâncias potencialmente tóxicas (BOBBIO & BOBBIO, 1992 apud DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004; NAWAR apud FENNEMA, 1996). Diferentes mecanismos químicos são responsáveis pela oxidação dos óleos vegetais, dependendo do tipo de oxigênio que reage com esses óleos. O oxigênio atmosférico ( $^3\text{O}_2$ ), chamado de triplete, reage com radicais lipídicos e promove a auto-oxidação, que é uma reação em cadeia via radicais livres. A foto-oxidação é promovido pela luz na presença de sensibilizadores como a clorofila, no qual estes absorvem energia e transferem para o oxigênio triplete ( $^3\text{O}_2$ ), convertendo-o em oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) que reage diretamente com as duplas ligações.

#### **2.3.1 Auto-oxidação**

É o principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras. A auto-oxidação é uma reação em cadeia envolvendo o oxigênio triplete ( $^3\text{O}_2$ ) que ocorre em três estágios: iniciação, propagação e terminação. As razões para ocorrer este processo estão relacionadas a presença de ligações duplas nas cadeias de várias substâncias graxas, temperatura, íons metálicos e radicais livres (FREEDMAN & BAGBY, 1989). Os pontos mais propensos a oxidação nos ácidos graxos insaturados, podem ser visualizados na Figura 5.



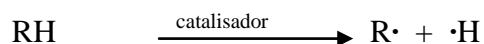
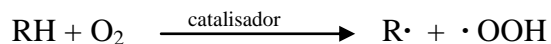
**Figura 5** – As posições nas cadeias graxas mais propensas à oxidação apresentam-se marcadas com um círculo pontilhado.



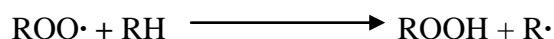
Fonte: DANTAS, 2010.

As posições alílicas, em relação às duplas ligações presentes nas cadeias dos ácidos graxos, são efetivamente susceptíveis à oxidação. No entanto, as posições bis-alílicas em ácidos graxos poli-insaturados de ocorrência natural, tais como os ácidos linoleico (duplas ligações em C9 e C12, gerando uma posição bis-alílica em C-11) e linolênico (duplas ligações em C9, C12 e C15, gerando duas posições bis-alílicas em C-11 e C-14) são ainda mais susceptíveis a auto-oxidação, isto ocorre devido à facilidade de abstração de hidrogênio e consequente formação de radicais nestas posições, que são ainda confirmadas pelas energias de dissociação da ligação C-H, sendo 96, 85, e 76 Kcal/mol, para o monoinsaturado, di-insaturado (uma posição bis-alílica - C11) e tri-insaturado (duas posições bis-alílicas - C11 e C14), respectivamente. As energias tendem a decrescer à medida que se formam intermediários de reação mais estáveis (KNOTHE, 2005; MCCORMICK e WESTBROOK, 2010 apud DANTAS, 2010).

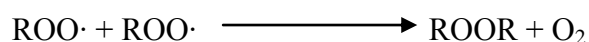
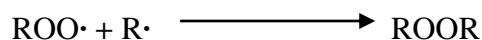
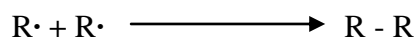
Assim a ocorrência da etapa de iniciação e propagação depende da facilidade que os hidrogênios alílicos e/ou bis-alílicos podem ser removidos das cadeias dos ácidos graxos. Moretto & Fett (1998) propuseram uma seqüência de reações inter relacionadas para explicar o processo de autoxidacão dos lipídios demonstrada na Figura 6.

**Figura 6**–Rota clássica da auto-oxidação**Primeira etapa – Iniciação**

Catalisadores: fontes externas de energia; íons metálicos; metaloproteínas.

**Segunda etapa – Propagação**

Nesta etapa ocorre reação em cadeia, com alto consumo de oxigênio, e há um rápido aumento do índice de peróxido.

**Terceira etapa – Terminação**

Nesta etapa ocorre formação de produtos estáveis como polímeros, aldeído, éter, alceno, cetona, ácido graxo de cadeia curta.

Onde: RH – Ácido graxo insaturado

R· - Radical alquil

ROO· - Radical alquilperoxil

ROOH – Hidroperóxido de alquila

Fonte: MORETTO; FETT, 1998.

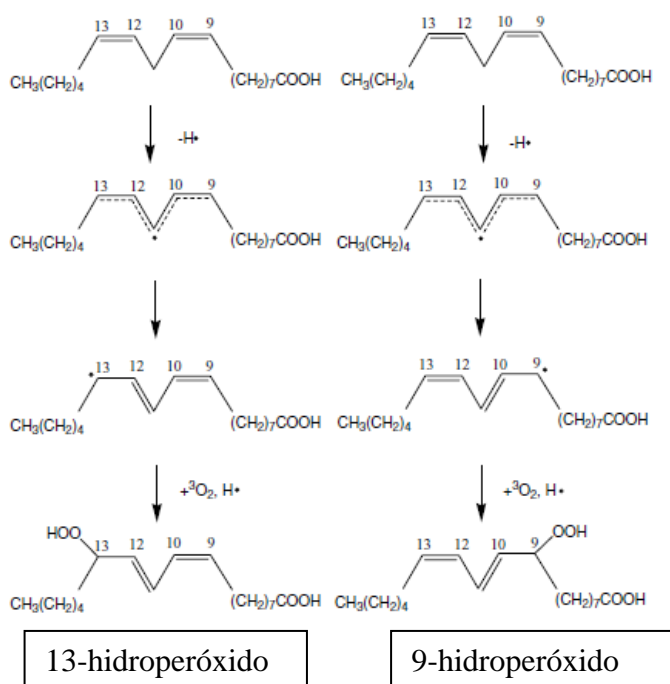
Como mostrado na Figura 6 na etapa de Iniciação ocorre a formação dos radicais livres do ácido graxo devido à retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo. A formação dos primeiros radicais livres pode ser explicada pela ação da luz sobre o hidrogênio alílico, pela catálise de cátions de metais e pelo ataque do oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) diretamente a dupla ligação (KNOTHE, 2005; BOBBIO e BOBBIO, 2001).

Na Propagação os radicais livres que são prontamente susceptíveis ao ataque do oxigênio atmosférico, são convertidos em outros radicais, aparecendo os produtos primários de oxidação (peróxidos e hidroperóxidos) cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes (TOLEDO et al, 1985). A quantidade de peróxidos e os produtos decorrentes da peroxidação aumentam rapidamente nesta fase, tornando assim a etapa mais importante do processo (BOBBIO e BOBBIO, 2001; OZAWA e GONÇALVES, 2006).

Na etapa de Terminação dois radicais livres combinam-se levando a formação de outros produtos mais estáveis obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (epóxidos, compostos voláteis e não voláteis). A terminação caracteriza-se por odor e sabor fortes, alterações da cor, da viscosidade e da composição do óleo e gordura (BOBBIO & BOBBIO, 2001).

A Figura 7 exemplifica o processo de auto-oxidação do ácido linoleico. Os átomos de hidrogênio do grupo  $-\text{CH}_2-$  localizados entre as duas ligações duplas do éster linoleico são susceptíveis à abstração por radicais. A reação é iniciada pelo ataque de um radical em um dos átomos de hidrogênio do grupo  $-\text{CH}_2-$  entre as duas ligações duplas; essa abstração de hidrogênio produz um radical que é um híbrido de ressonância. A seguir esse radical reage com o oxigênio, para formar um hidroperóxido (SOLOMONS &FRYHLE, 2006).

**Figura 7-** Exemplo representativo do processo de auto-oxidação do ácido linoleico com formação de hidroperóxidos.



Fonte: CHOE; MIN, 2006.

Durante o processo de auto-oxidação são formados, simultaneamente, compostos voláteis de baixa massa molar e compostos com alta massa molar (FORTES, 1994). Os mais voláteis são facilmente identificados pelo odor liberado durante a queima (VAN DEN BERG et al., 2002). A maioria dos compostos voláteis é perdida por evaporação (GARCIA et al., 2004), contudo os compostos mais polares e de cadeia curta podem ser retidos no material oxidado, transformando-se em ácidos carboxílicos ou diácidos pela continuidade dos processos oxidativos na matriz (MILLS & WHITE, 1994 apud FONSECA, 2009). A Tabela 3 mostra os produtos de oxidação secundários dos ácidos oleico, linoleico e linolênico.

**Tabela 3-** Produtos de oxidação secundários dos ácidos oleico, linoleico e linolênico.

Classe	Ácido Oleico	Ácido Linoleico	Ácido Linolênico
<b>Aldeídos</b>	Octanal, Nonanal, Decanal, 2-Decenal	Pentanal, Hexanal, 2-Octenal, 2,4-Decadienal	Propanal, Butanal, 2-Hexanal, 3,6-Nonadienal
<b>Ácido Carboxílico</b>	Metil Heptanoato, Metil Octanoato, Metil 10-oxodecanoato	Metil Heptanoato, Metil Octanoato, Metil 8-oxooctanoato	Metil Heptanoato, Metil Octanoato, Metil 9-oxononanoato
<b>Álcool</b>	1-Heptanol	1-Pentanol, 1 Octene-3-ol	
<b>Hidrocarbonetos</b>	Heptano, Octano	Pentano	Etano, Pentano

Fonte: CHOE; MIN, 2006.

Para evitar a auto-oxidação de óleos e gorduras há a necessidade de diminuir a incidência de todos os fatores que a favorecem, mantendo ao mínimo os níveis de energia (temperatura e luz) que são responsáveis pelo desencadeamento do processo de formação de radicais livres, evitando a presença de traços de metais no óleo, evitando ao máximo o contato com oxigênio e bloqueando a formação de radicais livres por meio de antioxidantes, os quais, em pequenas quantidades, atuam interferindo nos processos de oxidação de lipídios (JORGE & GONÇALVES, 1998).

### 2.3.2 Foto-oxidação

O mecanismo de foto-oxidação de gorduras insaturadas é promovido essencialmente pela radiação ultravioleta (UV) em presença de fotossensibilizadores como clorofila, riboflavina, dentre outros que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transferem para o oxigênio triplete ( $^3\text{O}_2$ ), gerando o estado singlete ( $^1\text{O}_2$ ). O oxigênio singlete reage diretamente com as ligações duplas por adição formando hidroperóxidos diferentes dos que se observam na ausência de luz e de sensibilizadores, e que

por degradação posterior originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos (MELO & GUERRA, 2002).

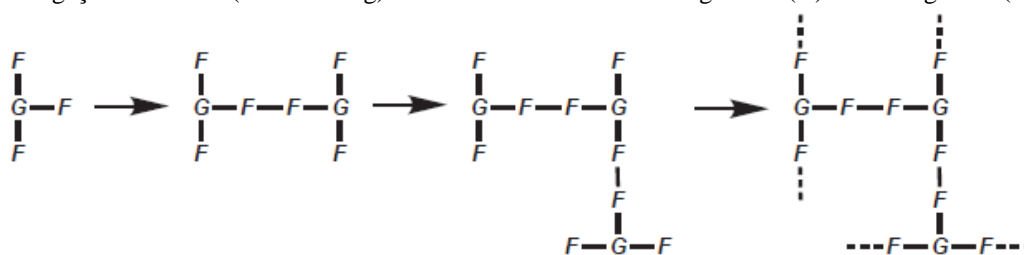
De modo geral, no estado fundamental a molécula de oxigênio apresenta-se no estado eletrônico tripleto [ $^3\text{O}_2$ ], tendo os dois elétrons de maior energia com spins paralelos  $\uparrow$   $\uparrow$  em orbitais moleculares diferentes. Em presença de radiação ultravioleta ou de molécula sensibilizadora no estado excitado, recebe energia levando a formação do oxigênio no estado singlete [ $^1\text{O}_2$ ], que é uma forma altamente reativa por apresentar os dois elétrons de maior energia alinhados de forma antiparalela  $\uparrow$   $\downarrow$ , podendo ocupar o mesmo orbital molecular  $\downarrow\uparrow$  (MELO, 2010).

A facilidade com que o oxigênio singlete reage com substâncias de alta densidade eletrônica, a exemplo dos ácidos graxos insaturados, chega a ser 1500 vezes mais rápido que a forma tripleto (FRANKEL, 1991; NAMIKI, 1990).

Conforme Gunstone (2007) na foto-oxidação, a reatividade está relacionada ao número de duplas ligações na cadeia, ou seja, a velocidade de oxidação depende diretamente do grau de insaturação do ácido graxo correspondente. Sendo que, em geral a velocidade de oxidação do ácido graxo linoleico (18:2) é 10, ou mais vezes maior do que o ácido graxo oleico (18:1). Enquanto que, o ácido graxo linolênico (18:3) é duas vezes maior do que o ácido graxo linoleico. A formação de hidroperóxidos durante a foto-oxidação é cerca de 10 a 30 vezes maior que na auto-oxidação, pois não há período de indução (ROVELLINI et al, 1997 apud TOLENTINO, 2008). A degradação posterior dos hidroperóxidos leva a formação de aldeídos, cetonas, alcoóis, e hidrocarbonetos (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Segundo Oliveira (2003), os ácidos graxos insaturados ao sofrer os processos oxidativos (foto ou auto-oxidação), geram primeiramente os compostos primários da oxidação que são principalmente os hidroperóxidos, ao continuar o processo pode-se gerar compostos voláteis como hidrocarbonetos, aldeídos, cetonas, furanos, ácidos carboxílicos e os não voláteis tais como monômeros cíclicos e não cíclicos, dímeros, trímeros e compostos de alta massa molecular através de ligações cruzadas como mostra a Figura 8 abaixo.

**Figura 8** - Ligações cruzadas (cross linking) ocorridas em óleos: unidade glicerol (G) e ácidos graxos (F)



Fonte: PARKINSON, 2000.

A auto-oxidação e a foto-oxidação ocorrem através de mecanismos distintos produzindo diferentes quantidades de hidroperóxidos. Desta maneira, o produto primário da foto-oxidação é o hidroperóxido e sua velocidade de formação é de 10 a 30 vezes maior que na auto-oxidação, pois não há período de indução (ROVELLINI et al., 1997). A foto-oxidação é uma reação mais rápida que a auto-oxidação pois o oxigênio singlete reage 1500 vezes mais rápido que o oxigênio normal (GUNSTONE, 2007; ROVELLINI et al., 1997). Na auto-oxidação, o mecanismo se dá via formação de radicais livres onde um grupamento metílico associado a uma dupla ligação é mais reativo que uma simples insaturação. Já na foto-oxidação, o mecanismo envolve a ação direta do oxigênio singlete nas duplas ligações na cadeia (GUNSTONE, 2007).

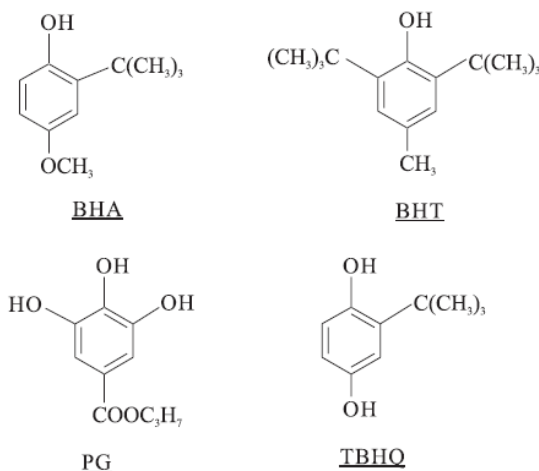
## **2.4 Antioxidantes**

Segundo a ANVISA, antioxidantes são substâncias que retardam o aparecimento de reações oxidativas nos alimentos, o processo de deteriorização e rancidez. Os mesmos reduzem a formação de hidroperóxidos e previnem sabores estranhos em óleos comestíveis, pois aumentam o período de indução das reações oxidativas (SHYAMALA et al., 2005).

Os antioxidantes interferem de forma eficiente no processo de auto-oxidação doando hidrogênios, regenerando a molécula do acilglicerol e interrompendo o mecanismo de oxidação (MADSEN; BERTELSEN; SKIBSTED apud RISCH, 1997). Sua eficiência está relacionada principalmente à sua capacidade em capturar radicais livres (VICETTI et al., 2005).

Em relação aos mecanismos de ação, os antioxidantes são classificados em primários e secundários. Os primários atuam interrompendo a cadeia de reação através da doação de hidrogênio aos radicais livres, convertendo-o em produtos mais estáveis ou reagindo com os radicais livres (GORDON, 2001). Normalmente, compostos fenólicos são os mais utilizados na indústria de alimentos: butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), propil galato (PG) e terc butil hidroquinona (TBHQ) (Figura 9), todos sintéticos pois são mais efetivos e baratos do que os antioxidantes naturais (RAMALHO; JORGE, 2006). Os antioxidantes secundários agem por vários mecanismos de ação como ligação com metais, remoção do oxigênio, conversão de hidroperóxidos em espécies não-radicaís, absorvendo a radiação UV ou desativando o oxigênio singlete. Exemplos desse tipo de antioxidante são os agentes quelantes, como o ácido cítrico (GORDON, 2001).

**Figura 9** - Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria alimentícia.



Fonte: RAMALHO; JORGE, 2006.

BHA é um antioxidante mais efetivo na supressão da oxidação em gorduras animais que em óleos vegetais. Como a maior parte dos antioxidantes fenólicos, sua eficiência é limitada em óleos insaturados de vegetais ou sementes. Apresenta pouca estabilidade frente a elevadas temperaturas, mas é particularmente efetivo no controle de oxidação de ácidos graxos de cadeia curta, como aqueles contidos em óleo de coco e palma. O BHT tem propriedades similares ao BHA (BAILEY, 1996 apud MELO, 2010).

PG é um éster do 3,4,5 ácido trihidroxibenzóico; tem uma concentração ótima de atividade como antioxidante e tem poder para estabilizar alimentos fritos, massas assadas e biscoitos preparados com gorduras é baixo (BAILEY, 1996 apud MELO, 2010).

TBHQ é um pó cristalino branco e brilhoso, moderadamente solúvel em óleos e gorduras (MADHAVI & SALUNKHE, 1995). É considerado um dos melhores antioxidantes para óleos, porque é resistente ao calor, inclusive de fritura, proporcionando uma excelente estabilidade para os produtos em que é utilizado (não confere cores anômalas e é muito eficiente no armazenamento de óleos refinados e desodorizados) (DZIEZAK, 1986; ORDÓÑEZ et al, 2005).

Siqueira (1998) em seu estudo sobre a estabilidade oxidativa de óleos de soja, milho e canola, verificou que o antioxidante TBHQ demonstrou ser mais eficiente que o BHA e o BHT, em ensaios de foto-oxidação acelerada em todas as amostras.

Oliveira (2003) observou que o TBHQ demonstrou ter efeito protetor sobre o óleo de milho e de canola contra a oxidação tanto acelerada (termo e foto-oxidação) como em temperatura ambiente.

O uso de antioxidantes sintéticos é regulado pelos governos através do controle de aditivos alimentares, em virtude de possíveis efeitos indesejáveis à saúde que esses compostos podem promover. No Brasil, a Resolução CNS/MS (Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde) N.º 04, de 24 de Novembro de 1988 estabelece que o limite máximo para utilização de antioxidantes em óleos e gorduras é de 0,02g/100g óleo no caso do BHA e TBHQ e de 0,01g/100 g óleo para o BHT e PG, sendo que o ácido cítrico pode ser adicionado na quantidade necessária ao produto (ANVISA, 1988) devido aos efeitos toxicológicos ocasionados por esses aditivos.

Vários estudos apontam que o emprego de antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos tem sido alvo de questionamentos quanto à sua inocuidade por apresentarem possíveis efeitos tóxicos, mutagênicos e carcinogênicos em experimentos com animais (PITARO; JORGE; FIORANI, 2009; BOTTERWECK et al, 2000). Estudos de laboratório demonstraram danos à saúde de animais, o BHA pode induzir a atividade hepática, aumento do fígado, redução do crescimento e formação de carcinoma (CRUCES-BLANCO et al, 1999). BHT foi tóxico para o fígado, rins e pulmões, houve redução de peso, entre outros efeitos observados em animais (ALMEIDA-DORIA; REGITANO-D'ARC, 2000). A redução do nível de hemoglobina e a hiperplasia de células basais foram atribuídas ao uso de TBHQ (MADHAVI & SALUNKHE, 1995).

Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, pesquisas têm sido dirigidas no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos (SOARES, 2002).

Apesar de existir um alto custo (principalmente em relação à extração e purificação) e menor eficiência dos antioxidantes naturais, há vantagem no nível preservacionista, na medida em que as indústrias alimentícias produzem resíduos que poderiam ter um destino muito mais benéfico, favorecendo o homem e o meio ambiente (OLIVEIRA et al, 2009).

Entre os antioxidantes naturais mais utilizados na indústria alimentícia podem ser citados o ácido ascórbico, ácido cítrico, tocoferóis, compostos fenólicos e extratos de plantas tendo vários estudos com alecrim, sálvia e orégano (RAMALHO & JORGE, 2006). Os tocoferóis como por exemplo a vitamina E tem a capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos, interrompendo a propagação em cadeia. Os compostos fenólicos (por exemplo, flavonoides) funcionam como seqüestradores de radicais e, algumas

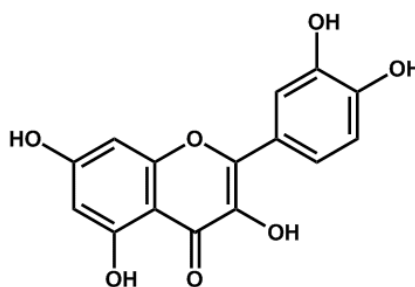


vezes, como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (RAMALHO & JORGE, 2006).

#### 2.4.1. Quercetina

A quercetina (3,5,7,3'-4'- pentahidroxi flavona) é o principal flavonoide presente na dieta humana e representa cerca de 95% do total dos flavonoides ingeridos. Apresenta grande potencial antioxidante. Tem como fontes específicas: vinho tinto, chá preto, cerveja, frutas (maçã, uva, morango), vegetais (cebola, couve, vagem, brócolis, pimentões), grãos, nozes, sementes e especiarias. Sendo a cebola, maçã e brócolis as fontes majoritárias da quercetina (NIJVELDT, R.J et al., 2001).

**Figura 10:** Estrutura do flavonoide quercetina um antioxidante natural encontrado em diversas fontes.



Fonte: <http://qnint.sqb.org.br>

Os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos e possuem atividade antioxidante efetiva devido à suas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos, protegendo assim os tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica. A propriedade antioxidante é direcionada sobre o radical hidroxil ( $\cdot\text{OH}$ ) e o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), que são espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica (KANDASWAMI & MIDDLETON, 1994).

Particularmente, a quercetina sequestra radicais de oxigênio como ( $\cdot\text{OH}$  e  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e inibe a peroxidação lipídica. Além de possuir propriedades quelante e estabilizadora do ferro (KAHRAMAN et al., 2003). A quercetina pode inibir o processo de formação de radicais livres em três etapas diferentes, na iniciação (pela interação com íons superóxido), na formação de radicais hidroxil (por quelar íons de ferro) e na peroxidação lipídica (por reagir com radicais peroxil de lipídeos) (AFANAS'EV, et al, 1989).

A quercetina também é conhecida por seus efeitos terapêuticos, especificamente, a alta ingestão de quercetina está relacionada com a baixa incidência de doença cardiovascular, câncer de pulmão em homens, de mama em mulheres, risco de desenvolver diabetes tipo 2 e asma. Ajuda na preservação da integridade histológica renal com diminuição do dano tubular

e da inflamação intersticial, além de proteger o fígado contra a falência (BEHLING et al, 2004).

## 2.5 Estado da arte

Oliveira (2003), submeteu os óleos de milho e canola à foto-oxidação acelerada durante um período de 168 horas, com adição do antioxidante TBHQ. As análises de UV-Vis e índice de peróxidos, confirmaram que o TBHQ exerceu efeito protetor no óleo, mesmo em quantidades inferiores ao limite estipulado.

No estudo realizado por Tolentino (2008), avaliou-se a estabilidade dos óleos de soja, canola, milho e girassol submetidos a foto-oxidação por 60 dias, e verificou-se que o óleo de canola é o mais resistente ao processo e o de girassol menos resistente, isto justificado pela composição de ácidos graxos dos mesmos, sendo o último, composto majoritariamente por ácido linolênico, que possui três insaturações, tornando-se mais susceptível à degradação. Os dados de UV-Vis indicaram a eficiência dos antioxidantes na proteção dos óleos, sendo o propil galato (PG), mais eficiente, seguido do TBHQ, BHT, BHA e ácido cítrico. Mostrou também que as técnicas de UV-Vis e RMN de  $^1\text{H}$ , são eficazes para monitorar os efeitos de antioxidantes e alterações oxidativas dos óleos.

O processo de degradação e secagem oxidativa do óleo de linhaça foi acompanhado por Lazzari & Chiantore (1999) utilizando Espectrometria Vibracional na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TG) e Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), que confirmaram alguns estágios no processo de oxidação dos TAG, concluindo que os mesmos ocorrem com a conjugação de insaturações nos ácidos graxos e desenvolvimento de extensivas ligações cruzadas.

Gambarra Neto (2008) em sua dissertação de mestrado realizou uma PCA em um conjunto de 114 amostras de óleo vegetal para avaliar possíveis sobreposições entre as classes e avaliar se as amostras estavam ou não vencidas. Essa análise mostrou uma separação em dois grandes grupos, onde os escores mais negativos em PC1 pertencem às amostras da classe vencidos, enquanto que os mais positivos correspondem às amostras não vencidas. Em seguida ele aplicou novamente o PCA somente nas amostras não vencidas para classificar os tipos de óleos, verificando novamente dois grupos, um constituído pelas classes Canola e Milho e o outro formado por Soja e Girassol, sendo que estes foram agrupados juntos devido as suas semelhanças com relação à composição de ácidos graxos.

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo aplicar o antioxidante quercetina no óleo de linhaça submetido à processo fotoxidativo, avaliando sua potencial atividade na qualidade do óleo através de técnicas físico-químicas e espectroscópicas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a estabilidade do óleo de linhaça in natura, e em condições aceleradas pela presença de radiação ultravioleta, contando com a presença de antioxidante natural e sintético utilizando-se de métodos físico-químicos e espectroscópicos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar por métodos físico-químicos (índice de acidez e índice de peróxidos) e espectroscópicos (UV-Vis, Infravermelho e RMN  $^1\text{H}$ ) o óleo de linhaça in natura.
- Avaliar por métodos físico-químicos (índice de acidez e índice de peróxidos) e espectroscópicos (UV-Vis, Infravermelho e RMN  $^1\text{H}$ ) o óleo de linhaça submetido à oxidação acelerada por incidência de radiação ultravioleta (foto-oxidação) na ausência e presença de quercetina.
- Verificar o comportamento do óleo de linhaça in natura através de análise térmica (TG - Termogravimetria, DTG – Termogravimetria Derivada).
- Verificar a significância estatística do processo de foto-oxidação e o uso de antioxidantes.
- Aplicar PCA visando separar as classes no processo de degradação e proteção do óleo.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

O óleo de linhaça utilizado foi adquirido comercialmente pela empresa General Iron Fittings e os reagentes utilizados foram de grau analítico. Os antioxidantes utilizados foram terc-butilhidroquinona (TBHQ) e quercetina (obtida comercialmente).

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Técnicas de Caracterização

##### 4.2.1.1 Análises Físico-Químicas dos Óleos Vegetais

As análises para obtenção dos índices de acidez e índice de peróxido dos óleos, foram realizadas de acordo com metodologias descritas para óleos e gorduras pelo American Oil Chemists' Society – AOCS (1990).

##### 4.2.1.1.1 Índice de Acidez

Realizou-se o índice de acidez das amostras seguindo-se a metodologia da AOCS (AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY) Ca 5a-40 (1990) modificada. Pesou-se 0,5 gramas da amostra e dissolveu-se em 15 mL de álcool isopropílico com 4 gotas de fenolftaleína. Titulou-se com KOH 0,1 M até aparecimento da coloração rosa. O volume de hidróxido de potássio gasto indica o teor de ácidos graxos livres. O índice de acidez é expresso em % de ácido oleico/ 100 g de óleo, conforme Equação 1.

$$IA = V \times 100 \times 0,0282/m \quad \text{Eq. 1}$$

onde:

IA = índice de acidez

V= volume gasto de KOH 0,1M

m = massa da amostra

##### 4.2.1.1.2 Índice de Peróxidos

Determinou-se o índice de peróxidos seguindo a metodologia da AOCS (AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY) Cd 8-53 (1990). Em 0,5 g da amostra adicionou-se 15 ml de solução de ácido acético-clorofórmio (3:2) seguido de agitação até a dissolução da amostra. Em seguida, adicionou-se 0,5 ml de solução saturada de iodeto de potássio (60%), que permaneceu em repouso, ao abrigo da luz por 1 minuto, e observou-se o surgimento de uma coloração amarela. Acrescentou-se então 30 ml de água destilada e titulou-se com

solução de tiosulfato de sódio 0,01 M até quase completa descoloração da amostra. Na sequência adicionou-se 0,5 ml de solução indicadora de amido e titulou-se até o completo desaparecimento da coloração azul. Preparou-se uma prova em branco, nas mesmas condições e titulou-se. O índice de peróxidos é então determinado pela Equação 2 e expresso em mmol de peróxido por quilo de amostra.

$$IP = (A - B) \times M \times 1000/m \quad \text{Eq. 2}$$

onde:

IP = índice de peróxido (mmol de peróxido por kg da amostra)

A = n.º de ml da solução de tiosulfato de sódio 0,01M gasto na titulação da amostra.

B = n.º de ml da solução de tiosulfato de sódio 0,01M gasto na titulação do branco.

M = molaridade da solução de tiosulfato de sódio.

m = massa da amostra

## 4.2.2 Análises Espectroscópicas

### 4.2.2.1 Ultravioleta

Realizou-se as análises de ultravioleta com as amostras solubilizadas em isopropanol (diluição 1:1000), utilizando cubetas de quartzo de 1 cm. Levou-se as amostras ao espectrofotômetro Varian modelo Cary Bio 50 de feixe simples e realizou-se a varredura na região de 200-800 nm (REDA et al, 2005).

### 4.2.2.2 Infravermelho

Para as análises de infravermelho, prensou-se 5 µl das amostras de cada óleo em pastilhas de KBr (100 mg) e realizou-se leitura dos espectros em espectrofotômetro Shimadzu, modelo IR Prestige-21, operando no modo FT (REDA, 2004).

### 4.2.2.3 RMN de <sup>1</sup>H

As análises de RMN de <sup>1</sup>H foram realizadas em espectrômetro Bruker Avance III-400 MHz, operando no modo FT a temperatura ambiente. A concentração das amostras para as análises é de aproximadamente 10 a 20 mg do óleo em 0,7 mL de CDCl<sub>3</sub>, contendo traços de TMS como referência interna, em tubos de RMN de 5 mm de diâmetro. Os espectros de <sup>1</sup>H foram obtidos utilizando 16K de pontos dados, largura espectral de 14 ppm, tempo de aquisição 3,6 s, tempo de relaxação 1,3 s, largura de pulso 45°, número de varreduras 16 e tempo total de aproximadamente 90s (CARNEIRO, BELESKI-CARNEIRO, REDA, 2005). Para determinação da massa molecular (MM), índice de iodo (II) e relação de hidrogênios

olefínicos e alifáticos (Roa) a partir dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ , seguiu-se a mesma metodologia utilizada por CARNEIRO, BELESKI-CARNEIRO E REDA (2005), cujas equações estão descritas abaixo:

$$\text{MM} = 119,7 + 7,035 \text{ T} + 5,983 \text{ V} \quad \text{Eq.3}$$

Onde T = total de hidrogênios

V = Total de hidrogênios vinílicos

$$\text{V} = \text{E}/2 + \text{G}$$

$$\text{II} = [ 126,91 \times 100 \cdot \text{V} ] / \text{MM} \quad \text{Eq. 4}$$

$$\text{Roa} = \text{V} / [\text{A} + \text{B}] \quad \text{Eq. 5}$$

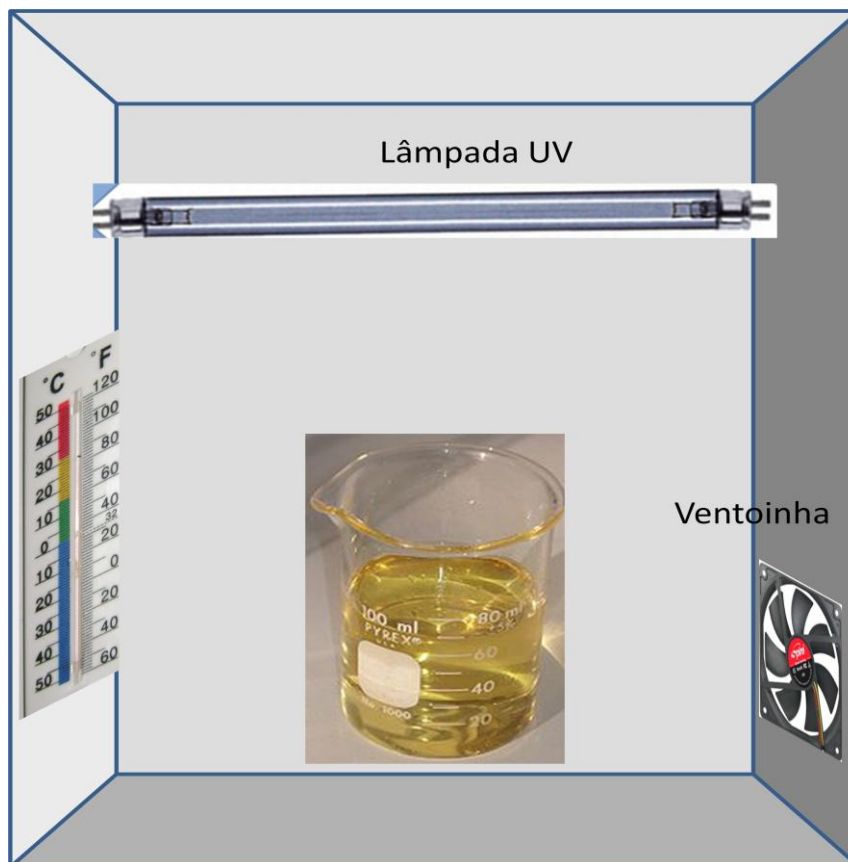
#### 4.2.2.4 Análise Térmica TG e DTG

A análise térmica foi realizada no TA Instruments modelo SDT 2960, com sistema de registro de curvas TG/DTG/DTA simultâneos. Utilizou-se cadinho de alumina como porta-amostra e realizou-se as análises sob atmosfera dinâmica de nitrogênio ( $\text{N}_2$ ), à razão de aquecimento de  $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ , da temperatura ambiente até  $750 \text{ }^\circ\text{C}$ ; e com fluxo dos gases de  $100 \text{ mL min}^{-1}$ . Utilizou-se a massa de amostra de aproximadamente  $10 \text{ mg}$  (FONSECA, 2009).

#### 4.2.3 Ensaios de degradação

Realizou-se primeiramente o ensaio em três ambientes: no escuro (em uma caixa de madeira retangular de dimensões  $100 \times 80 \times 80 \text{ cm}$  sem presença de luz), na bancada (condição ambiente) e no sistema denominado claro que envolve a incidência de R-UV - uma caixa retangular de mesma dimensão que do sistema escuro porém toda recoberta com papel alumínio para refletir a luz em todo sistema, com a presença de 1 lâmpada ultravioleta com  $15 \text{ W}$  de potência, uma ventoinha de PC para manter a temperatura do sistema próxima a ambiente, e um termômetro para controlar a temperatura. A intensidade luminosa da câmara foi medida por Luxímetro de Marca: Minipa MLM-1332 Digital Luz Meter. O esquema do reator em sistema claro é mostrado na Figura 11 a seguir:

**Figura 11:** Esquema do reator (caixa) de fotodegradação com incidência de R-UV, com lâmpada ultravioleta, ventoinha, termômetro e com a amostra de óleo de linhaça puro.



Fonte: A autora

Nos três ambientes adicionou-se de cerca de 80 mL do óleo de linhaça puro em béqueres (vidro de borossilicato) de 200 mL sem tampa, deixando-os nestes sistemas durante um período de 15 dias. No decorrer desse processo, foram retiradas alíquotas (5 mL) diariamente e realizadas as análises (físico-químicas, espectroscópicas) para acompanhar o processo de degradação.

Repetiu-se o procedimento adicionando-se os antioxidantes TBHQ e quercetina em quantidades condizentes com o máximo previsto na literatura (0,02g/100 óleo) nos óleos presentes nos sistemas claro e escuro, monitorando diariamente o processo durante o período de 15 dias.

#### 4.2.4 Atividade Inibitória de Radicais Livres (DPPH)

A atividade antioxidante das amostras foi avaliada quanto à capacidade de doação de hidrogênios, ou seja, inativação de radicais livres, através do método do radical estável DPPH descrito por BRAND-WILLIAMS et al., 1995 e adaptada ao sistema utilizado neste trabalho.



Em uma placa de poliestireno de 96 micropoços, 22 µL de amostra nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,05; 0,10 e 0,20g/100 mL, foram misturados a 200 µL de uma solução de DPPH (25 mg/L), recém preparada ao ensaio. Devido às amostras terem cor, foi preparado um branco da amostra com 22 µL da amostra e 200 µL de solvente (etanol). A leitura das absorbâncias foi feita em leitor de microplaca ELISA SINERGY H1 marca BIOTEC a 515 nm. Também foi preparado um branco do DPPH (200 µL de DPPH e 22 µL de solvente somente). A capacidade de inativação do radical DPPH foi calculada através da Equação 6:

$$I (\%) = \frac{[(A0)-(A1-A2)]*100}{A0} \quad \text{Eq.6}$$

Onde,

I: Inativação do radical DPPH

A0: Absorbância do branco do DPPH

A1: Absorbância na presença das amostras

A2: Absorbância do branco da amostra

#### 4.2.5 Análise Estatística

As regressões lineares múltiplas foram realizadas utilizando-se o programa Microsoft Excel 2007, na qual as avaliações de significância para os coeficientes foram realizadas empregando o teste *t* (*distribuição de Student*), e para a regressão e falta de ajuste empregou-se a *distribuição F*.

A análise dos componentes principais (PCA) foi realizada utilizando o programa Pirouette 4.0 da Empresa Infometrix.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Caracterização inicial do óleo

O óleo de linhaça foi inicialmente caracterizado físico-quimicamente por análises de índice de acidez e índice de peróxidos cujos resultados estão apresentados na Tabela 4 juntamente com valores de referência.

**Tabela 4-** Resultados obtidos e referências para as análises físico-químicas do óleo de linhaça.

Propriedades físico químicas	Derksen et al (1996)	CAMPESTRE (2009)	OLVEPIN (2009)	Resultados
Índice de acidez (g ácido oleico/100g)	-	Max 3	Max 3	0,451
Índice de peróxidos (mmol peróxido/kg)	Max 10	Max 10	-	2,034

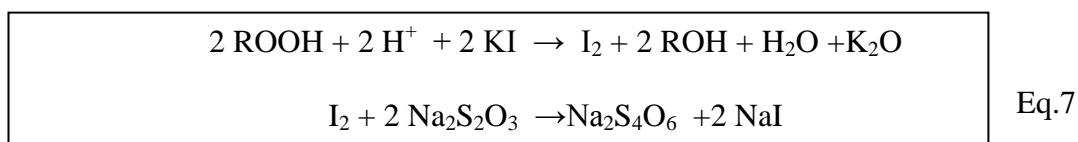
O índice de acidez, segundo Mendonça et al (2008) é um parâmetro de valiosa importância para avaliação da natureza e qualidade da matéria prima, além das condições de conservação e grau de pureza do óleo ou gordura. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação, foto-oxidação, termo-oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons hidrogênio aumentando a acidez do sistema e conseqüentemente gera ácidos graxos livres (AGL). Segundo a literatura utilizada (referenciada na Tabela 4) o índice de acidez não deve ultrapassar 3 g ácido oleico/100g, o que foi confirmado pela análise realizada pois o valor estabelecido experimentalmente foi 0,451 g ácido oleico/100g, indicando que o mesmo encontra-se dentro do valor exigido, verificando que não houve deteriorização do óleo e não há uma quantidade significativa de ácidos graxos livres que dificultem a neutralização do óleo para fins comerciais, bem como não está impróprio para consumo na alimentação (DANTAS, 2006).

O índice ou teor de peróxidos é um indicador muito sensível no estágio inicial da oxidação do óleo ou gordura e a sua presença é indício de deterioração, que poderá ser verificada com a mudança do sabor e do odor característicos dos óleos (REDA, 2004). No entanto, um nível baixo de peróxidos na amostra não constitui uma garantia de boa estabilidade oxidativa, podendo, pelo contrário, ser sinônimo de alteração pronunciada (SILVA et al, 1999).

A determinação do índice de peróxidos ocorre pela adição de solução de iodeto de potássio saturada à amostra. Os íons iodeto reagem com os peróxidos, produzindo  $I_2$ . A quantidade de iodo ( $I_2$ ) liberada é proporcional à concentração de peróxido presente. O  $I_2$

liberado é determinado por titulação pelo uso de solução de tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) padronizada e amido como indicador que na presença de  $\text{I}_2$  ficará azul (BACCAN et al., 2003).

As equações representadas no quadro abaixo mostram as reações químicas envolvidas na determinação do índice de peróxido (IP) (JEFFERY et al, 1992).



Este método determina todas as substâncias, em termos de milimol (ou miliequivalente) de peróxido por 1000 g de amostra, que oxidam o iodeto de potássio. Essas substâncias são geralmente consideradas como peróxidos ou outros produtos similares resultantes da oxidação de lipídios, conforme Mendonça et al (2008).

Quando a concentração de peróxidos atinge determinado nível, mudanças complexas ocorrem na estrutura molecular do óleo vegetal, formando compostos de baixo peso molecular. Estes compostos, aldeídos, cetonas, ácidos, alcoóis e hidrocarbonetos, são os responsáveis pelo sabor e odor característicos de produtos (MENDONÇA et al, 2008).

Ao efetuar esta determinação deve ser levado em consideração que: a) o iodo liberado pode fixar-se às duplas ligações dos ácidos graxos insaturados, dando um valor menor para o índice de peróxido; b) o oxigênio presente no meio pode levar à liberação de iodo e dar origem a um valor errôneo de índice de peróxido por excesso, sendo, portanto, aconselhável efetuar a desaeração prévia do meio, bem como evitar a agitação no curso da reação; c) a determinação do ponto final da titulação é difícil quando o nível de peróxido é baixo (0,06 - 20,00 mmol/Kg), mesmo tendo o amido como indicador (BERSET & CUVELIER, 1996 apud MELO, 2010). Devido à dificuldade na visualização do ponto final de titulação, a determinação deste índice limita-se aos estágios iniciais de oxidação por causa de sua natureza transitória (GRAY, 1978).

Entre as vantagens em utilizar tal técnica estão a rapidez, a simplicidade e o baixo custo dos equipamentos utilizados. Dependendo das condições do procedimento e tipo do óleo, o IP é razoavelmente exato, resultando em um coeficiente de variação menor que 1% (JEFFERY et al, 1992).

A presença de peróxidos não é desejável em óleos e gorduras, pois pressupõe processos degradativos. Mesmo assim a Resolução ANVISA nº 270, de 22 de setembro de 2005, estabelece valores limites para alguns óleos comestíveis, sendo considerado bom para o

consumo, aqueles que apresentem um valor máximo de 10 mmol peróxidos/kg de óleo ou gordura, a exemplo dos óleos de amendoim, linhaça, babaçu, dendê, semente de uva, dentre outros e 15 mmol peróxidos/kg para óleos prensados a frio e não refinados. Na amostra em estudo obteve-se um índice de peróxidos com valor 2,034 mmol/kg, estando portanto dentro do estabelecido pela ANVISA, indicando que o mesmo possui baixo processo oxidativo e conseqüentemente pouca formação de peróxidos, confirmando que o óleo não está deteriorado.

A espectroscopia de ultravioleta visível é uma técnica muito utilizada para caracterização de óleos e outros compostos orgânicos, devido à presença de insaturações e, portanto, ligações do tipo  $\pi$  (duplas e triplas) cujos elétrons são excitados ao serem incididos pela radiação ultravioleta (SILVERSTEIN et al 1991; REDA, 2004).

A oxidação de ácidos graxos poliinsaturados pode ser analisada pelo aumento da absorvidade na faixa do espectro ultravioleta. A oxidação de lipídios, térmica ou fotooxidativa, gera compostos conjugados devido à abstração dos hidrogênios alílicos e dialílicos da molécula do ácido graxo insaturado e deslocamento da dupla ligação formando conjugação. A formação de dienos e trienos é proporcional ao ganho de oxigênio e à formação de peróxidos durante os estágios iniciais de oxidação, favorecendo o aumento da absorção na região do ultravioleta. Os dienos conjugados formados pela oxidação dos ácidos graxos insaturados com duas ou mais insaturações tornam a molécula mais estável, diminuindo a energia de absorção e, portanto deslocando o comprimento de onda da absorção para valores maiores, na direção do visível (deslocamento batocrômico) ocasionando também um aumento na intensidade de absorção (SMITH; KING; MIN, 2007). Existe uma regra geral que afirma que quanto maior o número de ligações múltiplas conjugadas que um composto contém, maior será o comprimento de onda no qual o composto absorve luz (SOLOMONS & FRYHLE, 2006).

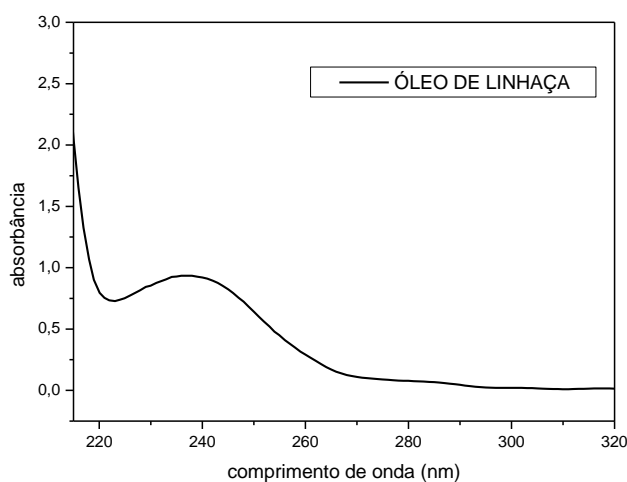
A Tabela 5 apresenta a absorção máxima dos principais cromóforos de produtos de oxidação.

**Tabela 5** – Grupos cromóforos de produtos de oxidação e regiões de absorção no espectro de ultravioleta.

PRODUTOS	ABSORÇÃO MÁXIMA (nm)
Monoenos	190
Dienos	220 - 230
Trienos	265 - 270
Tetraenos	310 - 320
Aldeído Cetônico	265 – 280
$\alpha$ – dicetonas	280
$\alpha$ – cetoaldeído	282
$\beta$ - dicetonas	274
Ácido $\alpha$ – cetônico	210

Fonte: ROVELLINI; CORTESI; FEDELI, 1997 apud TOLENTINO, 2008.

Quando um óleo é oxidado, o espectro gerado mostra um deslocamento de bandas e aumento da intensidade dos sinais de absorção (A), acusando de imediato que o óleo não está no seu estado mais puro (REDA, 2004). A Figura 12 mostra o espectro UV-Vis do óleo de linhaça in natura.

**Figura 12** - Espectro de UV-Vis do óleo de linhaça in natura, com absorção máxima em 238 nm.

Fonte: A autora

Pode-se observar no espectro de UV-Vis do óleo de linhaça uma banda larga de absorção em 238 nm, que é característica de óleos não aquecidos em geral. A absorção nesta região é devido às duplas ligações carbono-carbono presentes nos ácidos oleico, linoleico e linolênico (alto grau de insaturação dos óleos) presentes na amostra, indicando que o óleo encontra-se preservado sem nenhum processo oxidativo.

A espectroscopia de infravermelho (FTIR) utiliza radiação de frequência de maior comprimento de onda (menor energia). Esta radiação de baixa energia provoca vibrações

entre as ligações de átomos nas moléculas da amostra sob análise, na faixa de número de onda de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Estas vibrações correspondem aos estiramentos (simétricos e assimétricos) e dobramentos (no plano e fora do plano). Estas alterações nas ligações químicas são captadas pelo equipamento, que gera um gráfico (espectro em bandas) de transmitância ou absorbância (intensidade da absorção) pelo número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ), em concordância com a presença de grupos funcionais na amostra. O espectro infravermelho dá informações sobre grupos funcionais da composição dos óleos bem como a vizinhança dos mesmos e até a geometria de duplas ligações, avaliando a presença de ligações trans quando estas estão presentes (REDA, 2004; TELES, 2009). A análise por espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) permite identificar os sinais relativos aos diferentes grupamentos da longa cadeia dos ésteres de ácidos graxos, como mostra a Tabela 6 (PAVIA et al, 2012).

**Tabela 6** – Bandas de absorção dos principais grupos funcionais de ácidos graxos insaturados de cadeia longa (PAVIA et al, 2012).

ATRIBUIÇÃO	Nº DE ONDA ( $\text{cm}^{-1}$ )
Estiramento O-H	3400-2400
Estiramento C $\text{sp}^2$ -H (C=C)	3000-3100
Estiramento C-H	3000-2850
Estiramento C =O (éster)	1750-1730
Estiramento C=C	1660-1600
Dobrimento $\text{CH}_3$	1450-1375
Dobrimento $\text{CH}_2$	1465
Dobrimento C-O	1300-1100
Dobrimento C=C cis	700
Dobrimento C=C trans	970

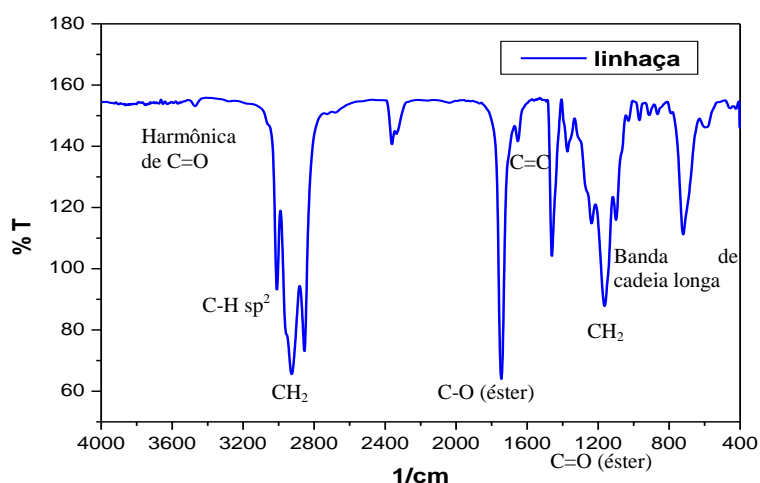
Fonte: PAVIA et al, 2012

Os óleos vegetais são sensíveis a este tipo de análise por possuírem grupos funcionais possíveis de serem analisados no infravermelho (REDA, 2004). Este método é utilizado na avaliação do ranço, desempenhando um papel particularmente importante no reconhecimento de grupos funcionais não característicos e de compostos contendo duplas ligações com configuração trans. O aparecimento de bandas próximo dos 3410  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à formação de hidroperóxidos, enquanto que o desaparecimento da banda próximo dos 3125  $\text{cm}^{-1}$  é indicativo da substituição de um hidrogênio de uma dupla ligação por um radical livre. Por outro lado, um aumento da banda de absorção a 970  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à formação de duplas ligações com configuração trans (provavelmente devido a dano oxidativo), enquanto que o aparecimento de bandas adicionais próximo dos 1750  $\text{cm}^{-1}$

(devido ao estiramento da ligação C=O) é um indício da formação de aldeídos, cetonas ou ácidos, de acordo com Silva et al (1999).

Empregou-se a espectroscopia na região do infravermelho para descrever melhor os constituintes do óleo de linhaça, cujo espectro está ilustrado na Figura 13 e suas bandas mais significativas encontram-se descritas na Tabela 7.

**Figura 13** – Espectro de infravermelho do óleo de linhaça in natura, com os grupamentos característicos de ácidos graxos.



Fonte: A autora

**Tabela 7**– Especificações das bandas significativas do espectro de infravermelho do óleo em estudo.

ATRIBUIÇÃO	Nº DE ONDA (cm <sup>-1</sup> )
Harmônica de C=O	3469 <i>f</i>
Estiramento C sp <sup>2</sup> -H	3015 <i>f</i>
Estiramento CH <sub>2</sub> assimétrico	2925 <i>F</i>
Estiramento CH <sub>2</sub> simétrico	2852 <i>m</i>
Estiramento C=O (éster)	1742 <i>F</i>
Estiramento C=C	1645 <i>f</i>
Dobramento CH <sub>2</sub>	1466 <i>F</i>
Dobramento CH <sub>3</sub>	1369 <i>f</i>
Estiramento C-O (éster)	1166 <i>F</i>
Rocking CH <sub>2</sub> cadeia longa	720 <i>m</i>

Legenda: *F* = forte, *m* = médio, *f* = fraco

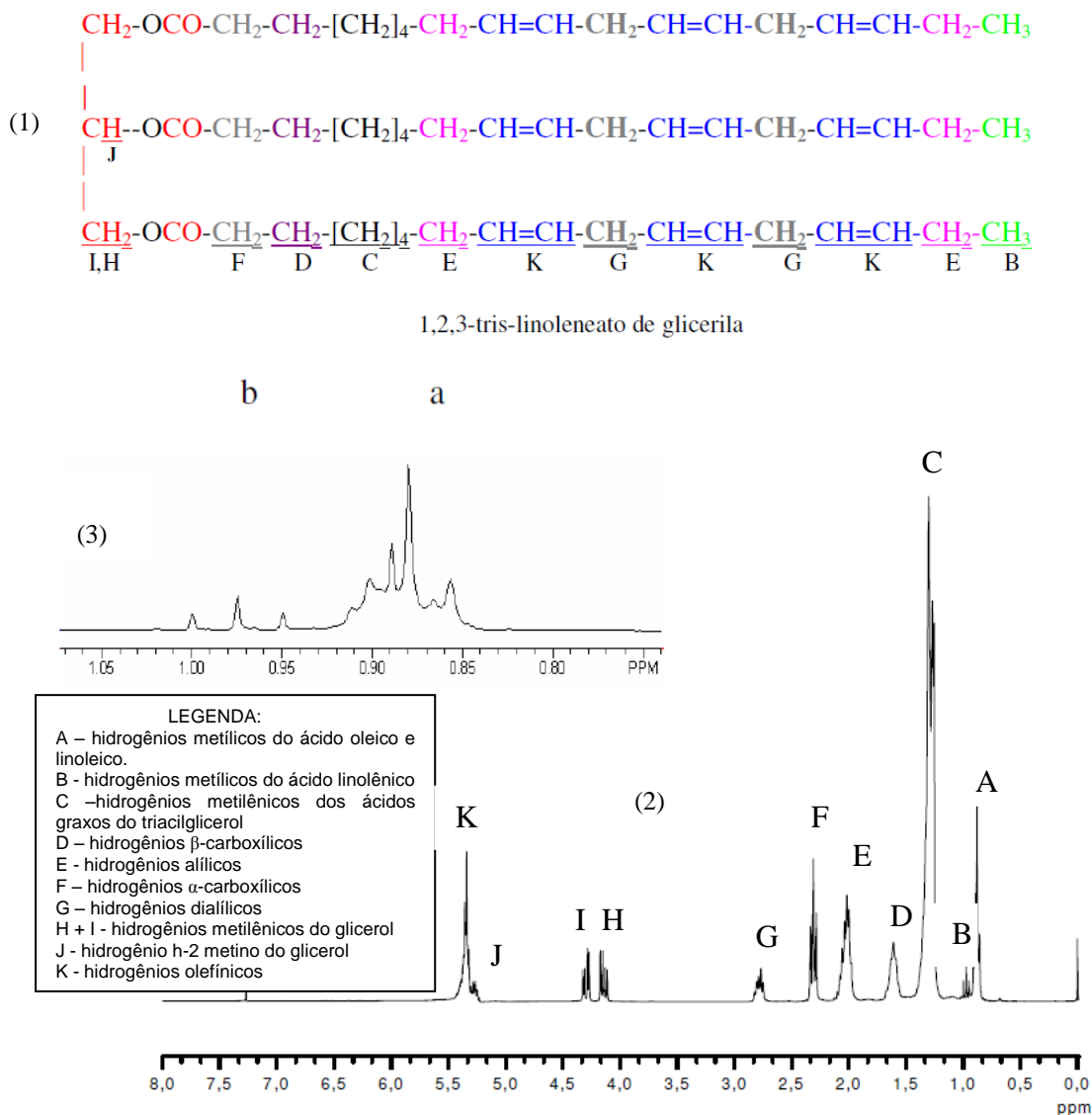
É observado, nesse espectro, algumas absorções típicas dos triacilgliceróis, como a intensa absorção do estiramento da carbonila C=O entre 1750 e 1740 cm<sup>-1</sup> e o sinal de forte intensidade, entre 1300 e 1000 cm<sup>-1</sup>, característico do estiramento C-O do éster. Observam-se ainda duas bandas de cadeia alquílica entre 3000 e 2840 cm<sup>-1</sup>, referentes ao estiramento C-H de alcano, reforçada pela absorção em torno de 1370 cm<sup>-1</sup>, relacionada ao dobramento de

CH<sub>3</sub>, além da absorção em torno de 1465, referente à dobramento de CH<sub>2</sub> da cadeia alquílica. São perceptíveis ainda bandas entre 3100 e 3000 cm<sup>-1</sup> e entre 1680 e 1620 cm<sup>-1</sup>, referentes, respectivamente, ao estiramento C sp<sup>2</sup>-H e ao estiramento C=C de alcenos, além de uma absorção em aproximadamente 720 cm<sup>-1</sup> que é uma banda referente a cadeias longas, que são facilmente encontradas nos triacilgliceróis (SILVERSTEIN,1991).

Na Figura 14, é mostrado o espectro de RMN de <sup>1</sup>H simulado de um óleo vegetal. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H é bem resolvido, observando-se sinais distintos, característicos, para os prótons olefínicos, do glicerol e alquílicos, que mostram absorção em regiões diferentes do espectro. Os hidrogênios olefínicos (aqueles conectados diretamente nos carbonos das ligações duplas carbono-carbono) são observados em (δ) 5,26 – 5,40 ppm (K), os hidrogênios metilênicos do glicerol em (δ) 4,10 – 4,32 ppm (I + H) [H-1 e H-3]; H-2 o hidrogênio metino em (δ) 5,25 ppm (J). Os hidrogênios metílicos (parte saturada da molécula) são observados em (δ) 0,80 – 1,00 ppm (A,B). Somente os hidrogênios metílicos do ácido linolênico são observados em (δ) 0,98 ppm (B) e sua concentração pode ser diretamente medida a partir do valor da curva de integração. Hidrogênios dialílicos são observados em (δ) 2,90 – 2,70 ppm (G). Os hidrogênios alílicos são observados em (δ) 2,10 – 1,90 ppm (E). Hidrogênios α-carboxílicos são observados em (δ) 2,34 – 2,22 ppm (F). Os hidrogênios β-carboxílicos são observados em (δ) 1,70 – 1,50 ppm (D). Um conjunto de picos sobrepostos em (δ) 1,40 – 1,15 ppm e centrado em (δ) 1,20 ppm (C) corresponde aos demais hidrogênios metilênicos dos ácidos graxos presentes no triacilglicerol (VIGLI et al, 2003).



**Figura 14** – (1) Estrutura de um ácido graxo (2) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  tipicamente obtido para uma amostra de óleo vegetal (3) expansão dos picos a e b.



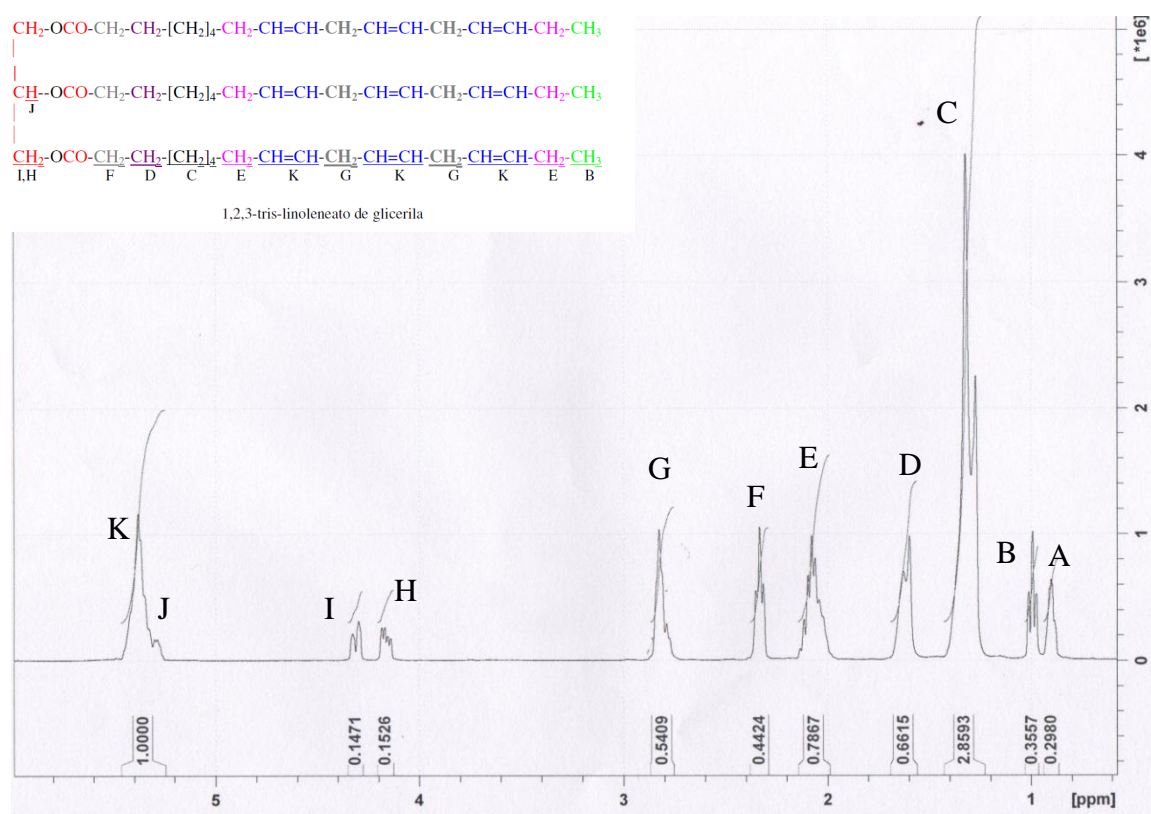
Fonte: VOIGT, 2009.

Do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  integrado, obtém-se a medida direta do grau de insaturação de modo preciso. Todos os hidrogênios olefínicos mostram deslocamento químico entre 5,40 - 5,26 ppm. Todos os hidrogênios metílicos mostram deslocamento químico entre 0,80 e 1,00 ppm (a+b). Portanto o número total de insaturação, é a medida direta da área dos picos normatizados e integrados, dos hidrogênios que geraram aqueles sinais, naquelas regiões do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (MANNINA et al, 2003). Os experimentos de RMN  $^1\text{H}$  ainda podem fornecer informações relativas a: peso molecular médio, índice de iodo, índice de saponificação, índice de acidez, teor de ácidos graxos saturados, perfil de ácidos graxos insaturados ou grau de insaturação, conteúdo de ácido linolênico, linoleico e oleico e a relação

de hidrogênios olefínicos e alifáticos ( $R_{OA}$ ), o qual indica precisamente o estado de oxidação do óleo vegetal (REDA et al, 2005).

A fim de confirmar a integridade do óleo de linhaça, utilizou-se a RMN de  $^1H$ . Ao comparar o espectro obtido com o apresentado pela literatura (VOIGT, 2009), observa-se o mesmo comportamento, porém os sinais apresentam intensidades diferentes devido à composição dos ácidos graxos, mas o espectro é bem resolvido, apresentando sinais distintos e característicos para cada tipo de hidrogênio existente no triacilglicerol como mostra a Figura 15.

**Figura 15** – Espectro de RMN de  $^1H$  do óleo de linhaça in natura, mostrando todos os picos característicos de óleos vegetais.



Fonte: A autora

Os dados de UV-Vis, infravermelho e RMN de  $^1H$  corroboram as análises físico-químicas indicando que o óleo de linhaça não apresenta indícios de processo oxidativo, sendo então satisfatório como substrato para experimentos de degradação.

## 5.2 Ensaios de foto-oxidação

Para se avaliar a estabilidade oxidativa ou a sua suscetibilidade à oxidação, o óleo ou gordura é submetido a teste de oxidação acelerada, nos quais as amostras são adicionadas a

condições extremas de degradação para que seja avaliada de forma rápida sua estabilidade e para prever a vida-de-prateleira. Além disso, possibilita a avaliação rápida de diferentes técnicas analíticas e verificação da eficácia de antioxidantes. Com isso, eles se tornaram rotineiros no controle de qualidade de indústrias, principalmente de óleos vegetais, que necessitam de resultados eficientes de uma forma mais rápida, pois o processo de oxidação a condições ambientes é muito lento. Para se acelerar a oxidação, os testes incluem elevação de temperatura, adição de metais, aumento da pressão de oxigênio, estocagem sob luz e agitação. O aquecimento é o meio mais utilizado e eficiente. A luz acelera a oxidação e apresenta os produtos de degradação similares ao obtido pela temperatura ambiente (ANTONIASSI, 2001).

No teste de Schall, por exemplo, as amostras são colocadas em estufa à temperatura de 60 a 70°C, onde foi observado que 1 dia de estocagem em estufa a 65°C é equivalente a 1 mês de estocagem a temperatura ambiente (25°C) (ABOU-GHARBIA et al., 1996).

Os raios ultravioletas podem causar reações de oxidação nos óleos e gorduras, com consequentes alterações organolépticas, como mudanças na cor, no sabor, na consistência e no odor, pois os mesmos favorecem a formação de radicais livres, acelerando as reações de decomposição (BARUFFALDI & OLIVEIRA, 1998).

Lugasi et al., (1995 apud Oliveira, 2003) expuseram os óleos de soja, girassol, oliva, margarina e banha à luz ultravioleta, por períodos de 20 minutos a 6 horas, onde no maior tempo de exposição houve um aumento significativo do índice de peróxidos confirmando que a presença de luz acelera a peroxidação lipídica.

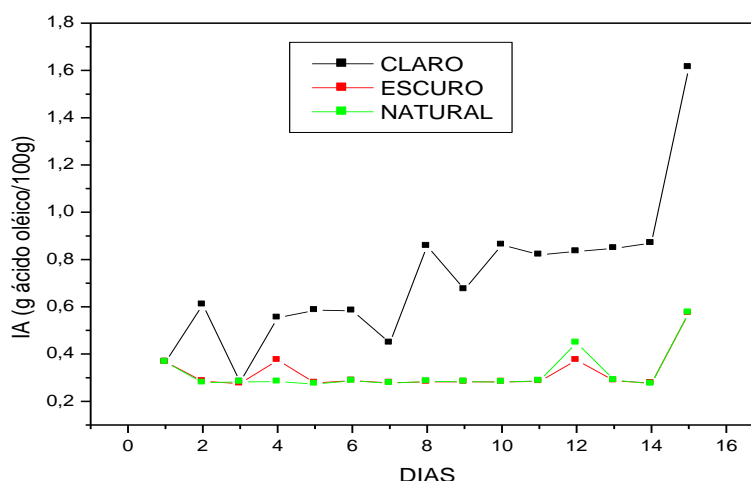
No intuito de se investigar o processo de foto-oxidação do óleo de linhaça realizou-se o ensaio em três ambientes: no escuro, natural e claro. O sistema escuro é aquele que não há incidência de luz, utilizado como controle negativo (-). O sistema natural é a condição ambiente sujeita a oxidação por fatores externos como luz e oxigênio, utilizada como controle central (0), e o sistema claro envolve a incidência de R-UV, utilizado como controle positivo (+) e é denominado de teste acelerado pois possibilita avaliar a estabilidade de forma rápida, pois o processo de oxidação em condições ambiente é muito lento. A intensidade luminosa da câmara clara foi de 115,2 Lux e a temperatura nesse sistema foi de aproximadamente 24°C, ou seja ocorreu a temperatura ambiente evitando o processo de termo-oxidação. O processo foi monitorado durante um período de 15 dias, com retirada diária de amostras, sendo que as análises IA, IP, RMN de <sup>1</sup>H, UV-Vis e FTIR foram realizadas em triplicata, cujos resultados das análises físico-químicas são apresentados como a média aritmética dos valores na Tabela 8.

**Tabela 8** – Índice de acidez e índice de peróxidos do óleo de linhaça foto-oxidado por 15 dias, juntamente com os controles escuro e natural.

DIAS	IA (g ácido oleico/100g)			IP (mmol peróxido/kg)		
	ESCURO	NATURAL	CLARO	ESCURO	NATURAL	CLARO
1	0,367	0,367	0,367	47,062	47,062	47,062
2	0,285	0,278	0,609	45,801	55,374	83,320
3	0,275	0,282	0,282	50,288	56,836	81,818
4	0,374	0,283	0,553	57,692	75,623	124,452
5	0,278	0,273	0,585	58,791	74,941	165,498
6	0,287	0,286	0,583	61,023	79,982	298,229
7	0,278	0,276	0,448	59,199	67,557	338,335
8	0,282	0,284	0,857	78,057	91,173	362,879
9	0,282	0,283	0,673	83,468	91,554	364,019
10	0,282	0,281	0,861	100,958	123,580	441,230
11	0,284	0,286	0,820	103,310	121,422	475,143
12	0,374	0,447	0,834	97,178	103,106	650,316
13	0,287	0,290	0,846	109,049	131,546	698,443
14	0,276	0,274	0,869	105,353	167,919	765,964
15	0,573	0,575	1,613	100,377	138,756	1030,94

Para melhor visualizar o comportamento do óleo em relação aos parâmetros físico-químicos estudados, durante o período de exposição, estão representados abaixo os gráficos de índice de acidez (Figura 16) e índice de peróxidos (Figura 17) em relação aos dias considerados.

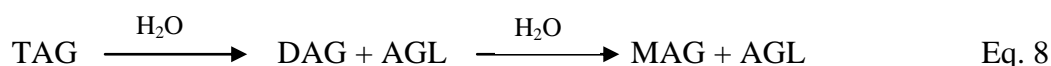
**Figura 16** – Índice de acidez do óleo de linhaça foto-oxidado, com os controles natural e escuro.



Fonte: A autora

Como mostrado na Tabela 8 e na Figura 16, observa-se que o óleo degradado em ambiente natural e escuro apresentam o mesmo comportamento em relação ao índice de

acidez, não havendo diferença significativa em armazenar o óleo em um sistema totalmente vedado. Já o sistema claro, apresentou um aumento gradativo deste índice pois, a decomposição dos glicerídeos é acelerada pela luz, sendo a rancidez quase sempre acompanhada da formação de ácido graxo livre. Um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação, foto-oxidação, termoxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons hidrogênio e o aumento da acidez indica o desenvolvimento de reações hidrolíticas, com a consequente produção de ácidos graxos livres (AGL). A literatura estabelece que o índice de acidez não deve ultrapassar 3 g ácido oleico/100g e durante o período estudado, o valor máximo encontrado foi 1,6137 g ácido oleico/100g no último dia de foto-oxidação, indicando que o mesmo ainda encontra-se abaixo do valor exigido. Sabe-se agora que no sistema tem-se: TAG, DAG ( diacilglicerol) + AGL, MAG (monoacilglicerol) + 2 AGL, como mostra a equação de hidrólise do TAG abaixo, confirmando que o óleo não foi totalmente deteriorado, mas houve aumento da concentração de AGL no sistema (DANTAS, 2006).



### *Análise de Variância (ANOVA)*

Na literatura há diferentes métodos para se avaliar efeitos e coeficientes significativos; entre os mais usados destaca-se a análise de variância (ANOVA) esta é utilizada para aceitar ou rejeitar, estatisticamente, as hipóteses investigadas com os experimentos. O objetivo dessa técnica é analisar a variação média dos resultados dos testes e demonstrar quais são os fatores que realmente produzem efeitos (principais e de interação) significativos nas respostas de um sistema (GALDÁMEZ, 2002).

O artigo de divulgação de Teófilo & Ferreira, (2006) mostra detalhadamente todos os cálculos da análise por regressão múltipla, e a Tabela 9 descreve resumidamente os fatores obtidos pela análise de variância (ANOVA), e que serão utilizados posteriormente (BARROS NETO et al, 2002).

**Tabela 9:** Análise de variância por regressão múltipla.

Fonte de variação	SQ	Nº graus de liberdade	MQ	F
Regressão (regr)	$SQ_{regr}$	p-1	$MQ_{regr}$	$MQ_{regr}/MQ_{res}$
Resíduos (res)	$SQ_{res}$	n-p	$MQ_{res}$	
Falta de ajuste (faj)	$SQ_{faj}$	m-p	$MQ_{faj}$	$MQ_{faj}/MQ_{ep}$
Erro puro (ep)	$SQ_{ep}$	n-m	$MQ_{ep}$	
Total	$SQ_{total}$	n-1		

SQ: soma quadrática, MQ: média quadrática, F: distribuição F, p: nº parâmetros da equação, n: nº total de experimentos, m: nº níveis de cada variável

Fonte: BARROS NETO et al, 2002.

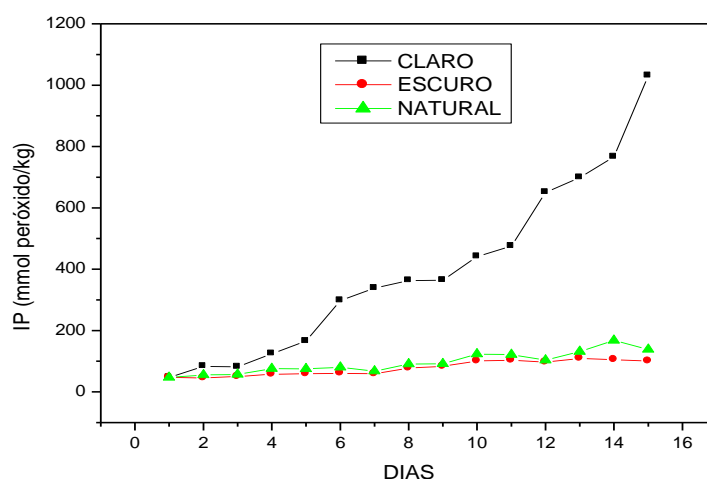
Dos experimentos realizados nesta dissertação, as avaliações de significância para os coeficientes foram realizadas empregando o teste *t* (*distribuição de Student*), e para a regressão e falta de ajuste (desvio entre a média das triplicatas e o valor calculado pela regressão) empregou-se a *distribuição F*. O teste *t* será significativo dentro de um intervalo de confiança se  $t_{calc} \geq t_{\alpha}$  ( $t_{\alpha}$ : erro padrão) para o número de graus de liberdade em questão. A distribuição F será significativa se  $F_{calc}/F_{tabelado} \geq 10$ . (F tabelado: considerar o intervalo de confiança e graus de liberdade) (TEÓFILO & FERREIRA, 2006). Além destes, calcula-se o coeficiente de correlação  $r^2$  que é um parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximos de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados. A ANVISA (2003) recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99 e o INMETRO (2003) um valor acima de 0,90.

Na análise estatística do IA mostrado detalhadamente no Anexo A, há uma significância da fotodegradação, ou seja ao realizar o processo de oxidação em 15 dias, há uma variação significativa dos valores de IA ao comparar o primeiro e o último dia de experimento, isto é confirmando pelo teste *t* no qual observa-se que o parâmetro *dias* foi o mais influente no processo de degradação, seguido da interação *dias versus luz*, confirmando que quanto maior o tempo de exposição, e este aliado à presença de luz, maior o IA e consequentemente maior o processo degradativo, pois ocorre um aumento na concentração de AGL no sistema. Observou-se também o valor de  $r^2 = 0,795$ , que apesar de apresentar um valor baixo (pois o ideal é  $r^2 = 1$ ), não possui falta de ajuste ou seja houve um pequeno desvio dos valores obtidos da média das replicatas com o valor estipulado pela regressão linear, portanto dando confiança nos dados obtidos experimentalmente. Além disso, o significado da regressão foi testado (95% confiança), proporcionando um valor de 38,29 (10 vezes maior que

o tabelado) provando ser estatisticamente significativo, confirmando que o método de degradação em câmara clara foi eficiente.

A Figura 17 apresenta o efeito da foto-oxidação no índice de peróxidos das amostras, durante os mesmos 15 dias de experimento.

**Figura 17** – Índice de peróxidos do óleo de linhaça foto-oxidado, juntamente com os controles natural e escuro.



Fonte: A autora

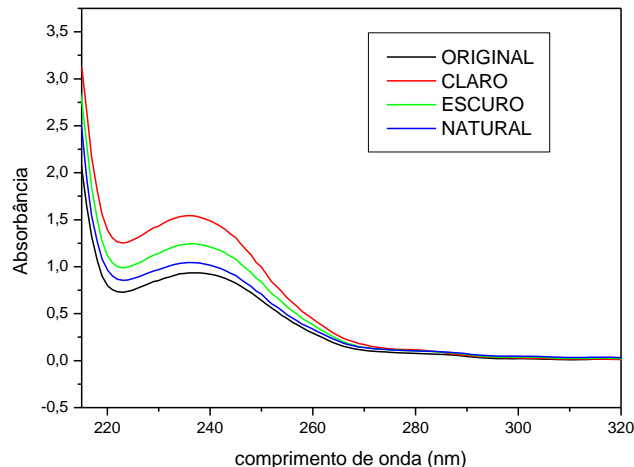
A determinação do índice de peróxido em óleos vegetais é um dos métodos mais utilizados para medir o estado de oxidação dos óleos e gorduras, pois as substâncias lipídicas oxidam-se na presença do oxigênio, e formam inicialmente os peróxidos. A presença de peróxidos não é desejável em óleos e gorduras, pois pressupõe processos degradativos. Mesmo assim a Resolução ANVISA nº 270, de 22 de setembro de 2005, estabelece valores limites para alguns óleos comestíveis, sendo considerado bom para o consumo, aqueles que apresentem um valor máximo de 10 mmol peróxidos/kg de óleo ou gordura, a exemplo dos óleos de amendoim, linhaça, babaçu, dendê, semente de uva, dentre outros e 15 mmol/kg para óleos prensados a frio e não refinados. Na amostra em estudo observa-se novamente o mesmo comportamento dos sistemas escuro e natural, que oxidam com o tempo como visto nos valores de IP de 100,37 e 138,75 mmol/kg respectivamente, porém a oxidação se dá numa escala inferior ao sistema claro, que no último dia analisado obteve-se um valor de 1030,94 mmol/kg, indicando que o óleo sofreu processo oxidativo, com formação de peróxidos, confirmando alteração pronunciada.

Na análise estatística do IP mostrado detalhadamente no Anexo B, também observa-se uma significância estatística do processo de fotodegradação, pois ao realizar o processo de

oxidação em 15 dias, há uma variação significativa dos valores de IP ao comparar o primeiro e o último dia de experimento, isto é confirmando pelo *teste t* no qual observa-se que o parâmetro *luz* foi o mais influente no processo de degradação, seguido da interação *dias versus luz*, confirmando que a presença da luz, acelera a formação de peróxidos, e além disso quanto maior o tempo de exposição, e este aliado à presença de luz, maior o IP e consequentemente maior o processo degradativo, pois ocorre um aumento na concentração de peróxidos no sistema. Observou-se também o valor de  $r^2 = 0,97$ , (ideal é  $r^2 = 1$ ), portanto pode-se ter confiança nos dados obtidos experimentalmente. Além disso o significado da regressão foi testado (95% confiança), proporcionando um valor de 321,7 (10 vezes maior) provando ser estatisticamente significativo, confirmando que o método de degradação em câmara clara foi eficiente.

O espectro de UV-Vis dos óleos (original, escuro, natural e claro) no primeiro dia da foto-oxidação, é apresentado na Figura 18 e pode indicar uma medida relativa da degradação oxidativa do mesmo.

**Figura 18** – Espectro UV-Vis dos óleos de linhaça foto-oxidado no primeiro dia da foto-oxidação, juntamente com o controle do óleo in natura, escuro e natural.



Fonte: A autora

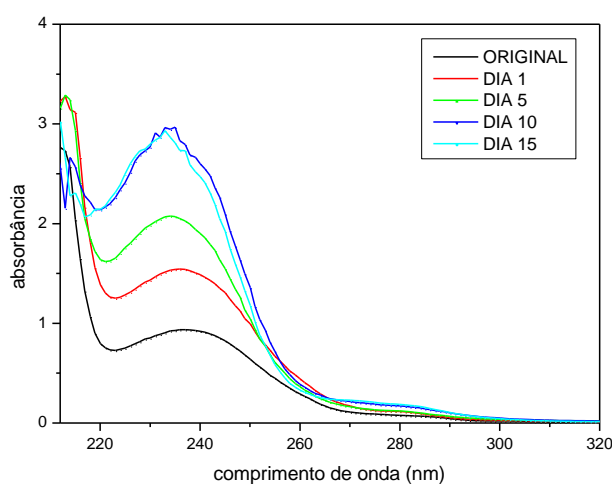
Observa-se que há um aumento progressivo da absorbância em 235 nm dos óleos a medida que tornam-se mais degradados, ou seja, quanto maior a incidência da radiação. Este comportamento é visto do primeiro ao último dia da foto-oxidação, no qual a amostra original, apresenta uma menor absorbância em relação às foto-oxidadas, devido à integridade da amostra, e a amostra do sistema claro possui a maior absorbância. Ao submeter o óleo a um processo oxidativo, é observado um leve aumento na intensidade da absorção devido à



geração de compostos conjugados através da abstração dos hidrogênios alílicos e dialílicos da molécula do ácido graxo insaturado.

A Figura 19 mostra o espectro UV-Vis do óleo de linhaça no sistema claro, o qual apresenta maior diferença nas absorbâncias com o passar nos dias, mas vale lembrar que apesar de pouca diferença encontrada entre os valores das absorbâncias dos sistemas escuro e natural, eles seguem o mesmo comportamento do sistema claro, ou seja, quanto maior o tempo de exposição maior a absorbância das amostras.

**Figura 19** – Espectro UV-Vis do óleo de linhaça foto-oxidado na câmara clara no 1º, 5º, 10º e 15º dia de experimento.

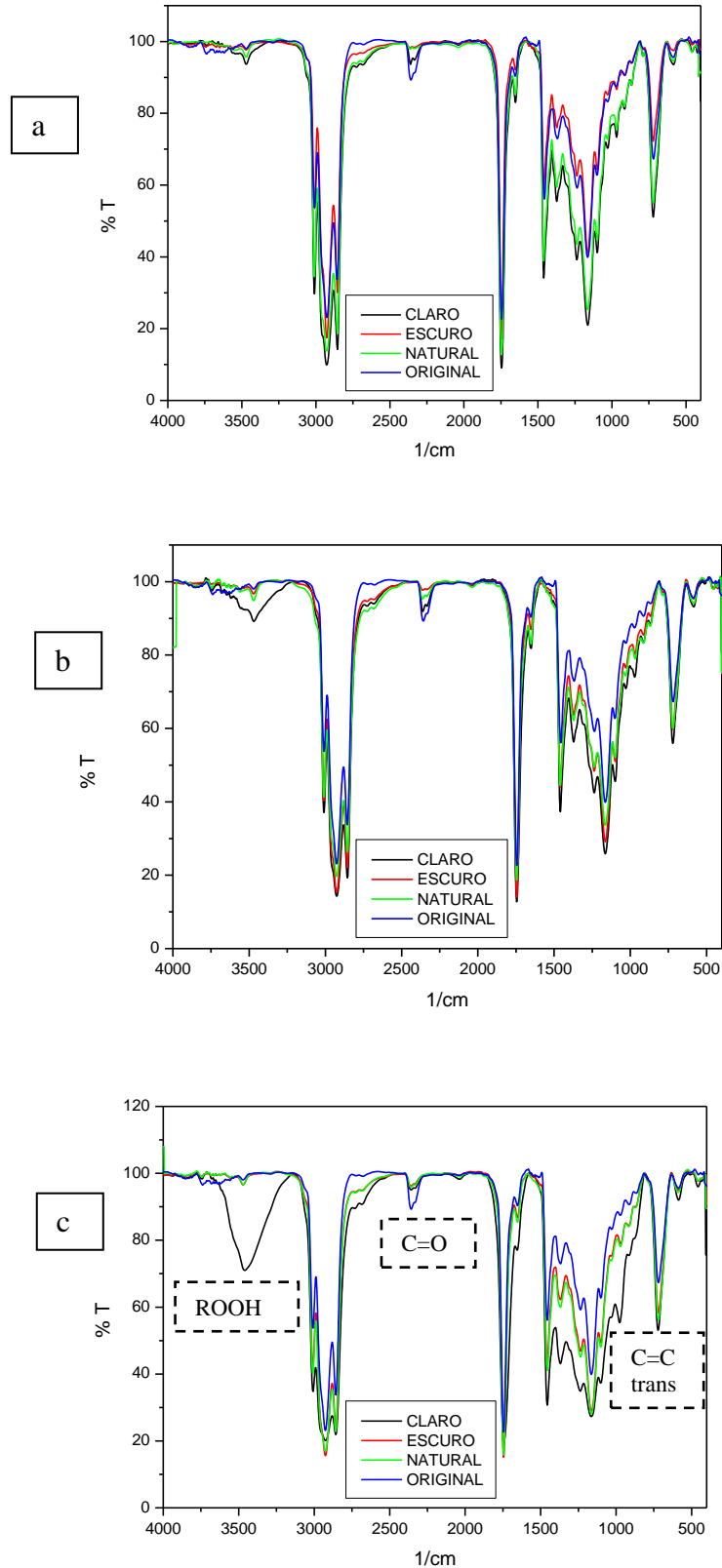


Fonte: A autora

Como visto na Figura 19, tem-se que quanto maior o tempo de exposição a radiação ultravioleta, maior é a absorbância do sistema devido a formação dos compostos conjugados, confirmando que houve oxidação no sistema.

Nas Figuras 20 a), b) e c) estão apresentados os espectros de infravermelho das amostras de óleo foto-oxidadas (a), foto-oxidação ocorrida no óleo de linhaça do primeiro ao quinto dia, a 20 (b) mostra o comportamento do óleo do sexto ao décimo dia, e a 20 (c) do décimo primeiro ao último dia da oxidação.

**Figura 20-** Espectro IR das amostras do óleo de linhaça foto-oxidado, juntamente com o controle do óleo in natura, escuro e natural, (a), foto-oxidação ocorrida no óleo de linhaça do primeiro ao quinto dia, (b) comportamento do óleo do sexto ao décimo dia, e (c) do décimo primeiro ao último dia da oxidação.



Até o quinto dia a degradação se dá de uma maneira branda, não surgindo nenhum novo grupamento. O segundo momento da oxidação observa-se que no sistema claro ocorre o aparecimento de uma banda próximo a  $3450\text{ cm}^{-1}$  correspondente à formação de hidroperóxidos, e o mesmo fica mais evidente nos últimos dias da degradação, indicando processo oxidativo. O aparecimento de bandas adicionais próximo dos  $1750\text{ cm}^{-1}$  (devido ao estiramento da ligação C=O), é um indício da formação de aldeídos, cetonas ou ácidos, caracterizando a formação de compostos voláteis no sistema que são alguns dos produtos da oxidação de ácidos graxos insaturados.

A Tabela 10 apresenta os dados obtidos dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos óleos estudados.

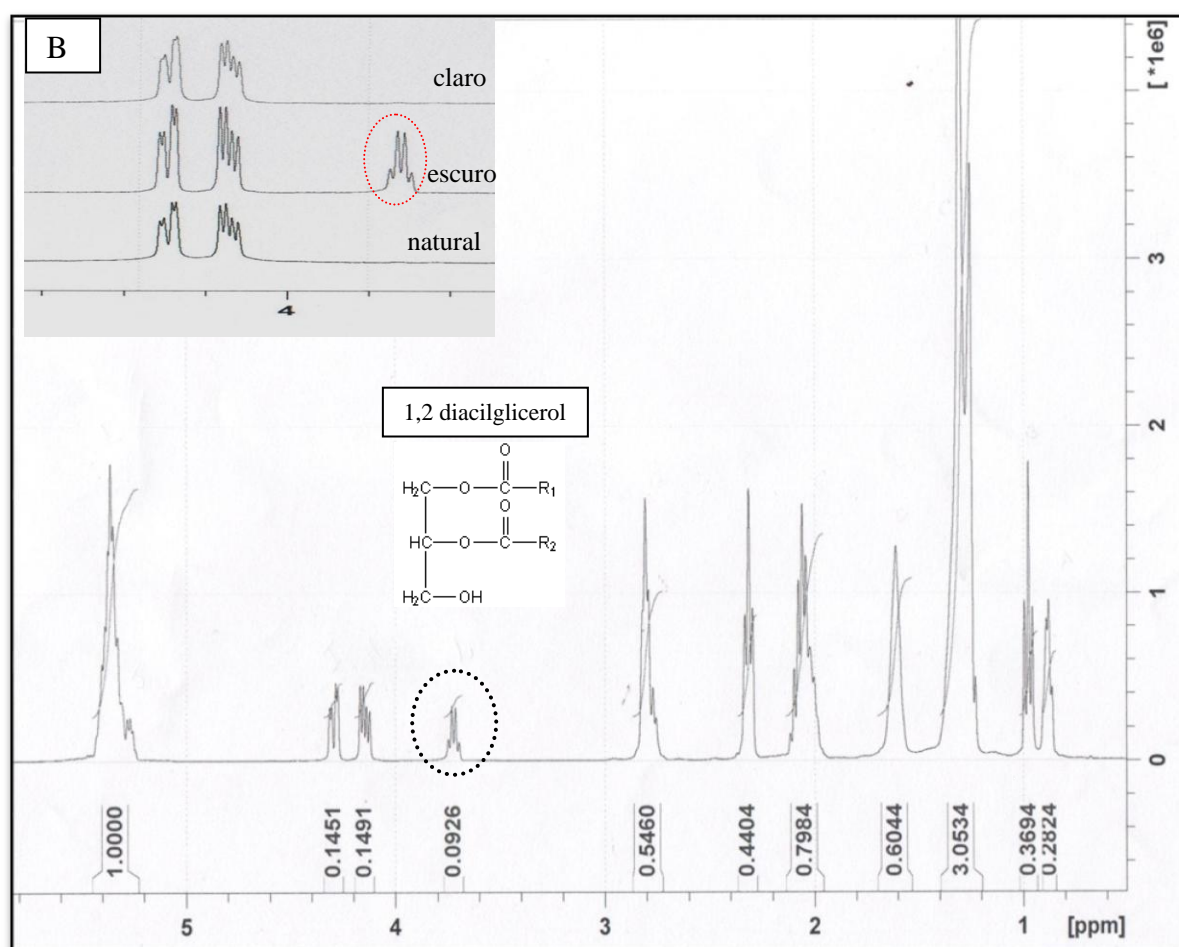
**Tabela 10** – Resultados obtidos por RMN de  $^1\text{H}$ , e parâmetros PM, II, Roa e %Ln calculados conforme metodologia descrita por BELESKI-CARNEIRO, REDA E CARNEIRO, 2005.

	Dias	V	E	G	PM	II	Roa	%Ln
Claro	Orig	12,82	10,9	7,5	840,2	193,7	8,17	54,91
	1	12,80	11,0	7,5	840,8	193,2	8,12	54,90
	2	12,79	11,0	7,5	840,7	193,0	8,20	55,24
	3	12,58	11,1	7,4	842,2	189,6	8,12	55,12
	4	12,58	10,9	7,4	839,3	190,2	8,05	54,96
	5	12,06	10,5	7,2	838,5	182,6	7,90	55,20
	6	12,39	10,8	7,2	839,4	187,4	7,94	54,25
	7	12,17	10,7	7,1	838,3	184,2	7,74	53,68
	8	7,78	7,1	4,6	776,0	127,2	6,01	53,41
	9	11,63	10,4	6,7	837,5	176,2	7,68	54,29
	10	9,99	9,1	5,9	825,4	153,6	6,58	50,38
	11	11,57	10,2	6,5	837,5	175,4	7,53	52,50
	12	11,44	10,3	6,4	836,1	173,6	7,37	51,55
	13	11,03	10,2	6,2	834,9	167,6	7,28	51,28
	14	10,52	10,0	5,8	833,7	160,2	7,06	50,42
15	9,96	9,4	5,3	832,4	151,8	6,56	47,63	
Escuro/Natural		V	E	G	PM	II	Roa	%Ln
	Orig	12,82	10,9	7,5	840,2	193,7	8,17	54,91
	1	12,81	11,0	7,6	840,4	193,4	8,18	55,26
	2	12,99	11,1	7,5	840,5	196,2	8,31	55,67
	3	12,37	10,7	7,3	832,5	188,5	8,21	56,67
	4	12,58	10,8	7,4	840,1	190,0	8,15	55,92
	5	12,63	10,9	7,5	840,2	190,9	8,08	55,08
	6	12,63	11,0	7,4	840,1	190,8	8,16	55,52
	7	10,41	9,1	6,2	824,7	160,2	7,25	55,25
	8	12,51	10,8	7,4	840,9	188,8	8,09	55,51
	9	12,61	10,9	7,5	841,0	190,2	8,09	55,38
	10	10,80	9,4	6,5	827,3	165,7	7,38	55,15
	11	12,86	11,0	7,5	840,8	194,0	8,21	55,20
	12	12,97	11,1	7,7	840,6	195,8	8,34	55,79
	13	12,89	11,1	7,6	839,9	194,8	7,81	53,21
14	12,88	11,1	7,7	840,2	194,5	8,15	54,87	
15	12,71	11,0	7,5	840,5	191,9	8,21	55,76	

Os parâmetros estruturais foram obtidos dos espectros integrados de RMN de  $^1\text{H}$  e calculados conforme descrito por BELESKI-CARNEIRO, REDA E CARNEIRO, 2005. V= hidrogênios vinílicos (olefínicos); G= hidrogênios dialfílicos; E = hidrogênios alifílicos; PM = peso molecular; II=índice de iodo; Roa= razão entre hidrogênios olefínicos e alifílicos; %Ln = concentração de ácido linolênico.

Devido aos sistemas escuro/natural apresentarem as mesmas características, os mesmos foram representados unicamente na Tabela 10. Observou-se que nestes sistemas, ocorreram três evidências de degradação, primeiramente no terceiro dia, cujo espectro está representado na Figura 21.

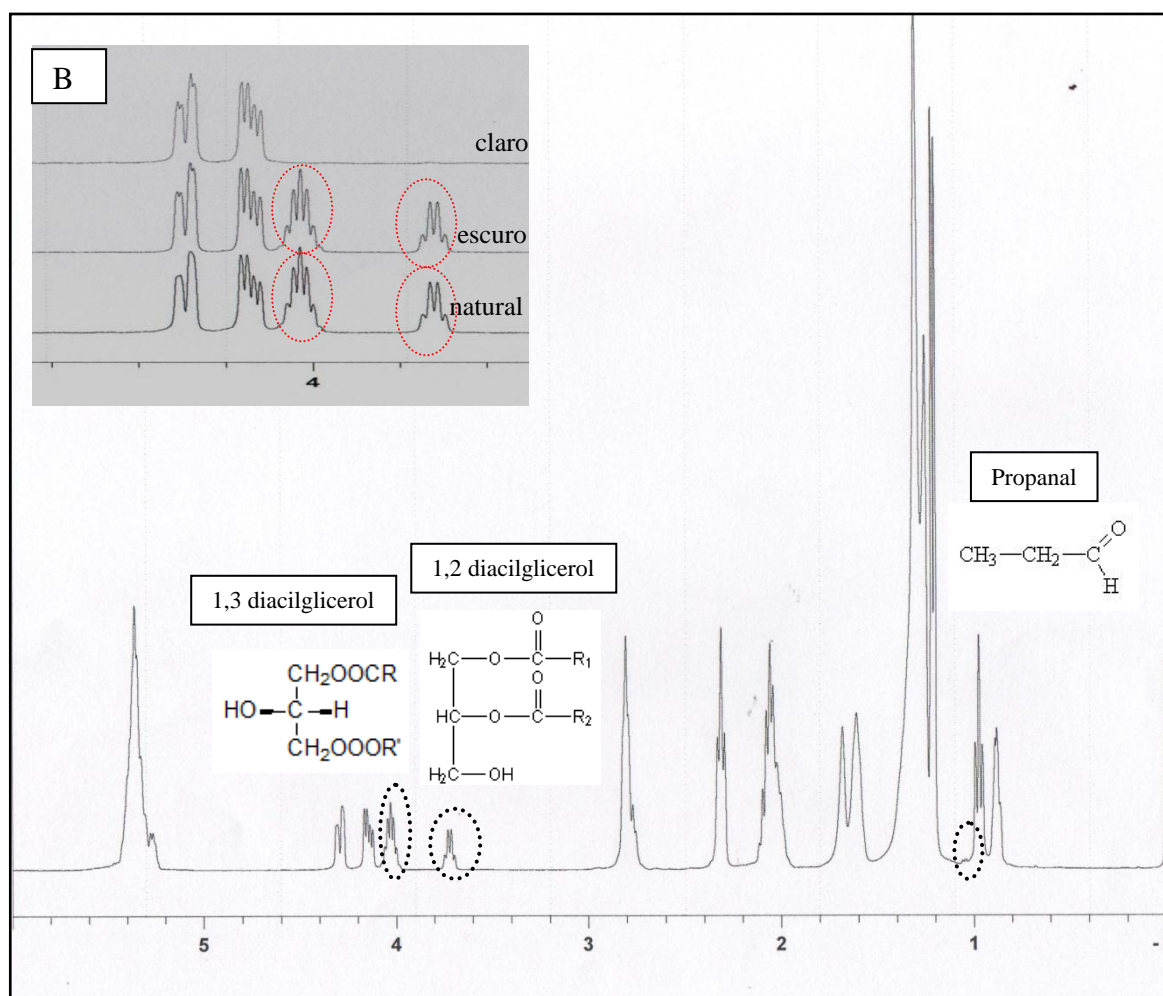
**Figura 21** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do óleo de linhaça no **terceiro dia** da foto-oxidação, com pontilhado na região do aparecimento do pico em 3,7 ppm B) sobreposição dos espectros dos 3 sistemas com expansão na região entre 3,5 a 4,6 ppm evidenciando que no **sistema escuro** ocorre o aparecimento do pico .



Fonte: A autora

Observa-se no espectro, o aparecimento de um novo pico em 3,7 ppm, que segundo GUILLÉN & RUIZ (2001), representa os prótons do 1,2 diacilglicerol ( $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ) isso é confirmado pela diminuição do PM de 840,3 para 832,5, pois o TAG hidrolisa e forma TAG + DAG. A segunda evidência ocorre no sétimo dia de oxidação, como mostra a Figura 22.

**Figura 22** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do óleo de linhaça no **sétimo dia** da foto-oxidação, com pontilhado nas regiões do aparecimento de picos em 1,05; 3,7 e 4,05 ppm B) sobreposição dos espectros dos 3 sistemas com expansão na região entre 3,5 a 4,6 ppm evidenciando que os picos surgem nos **sistemas escuro e natural**.

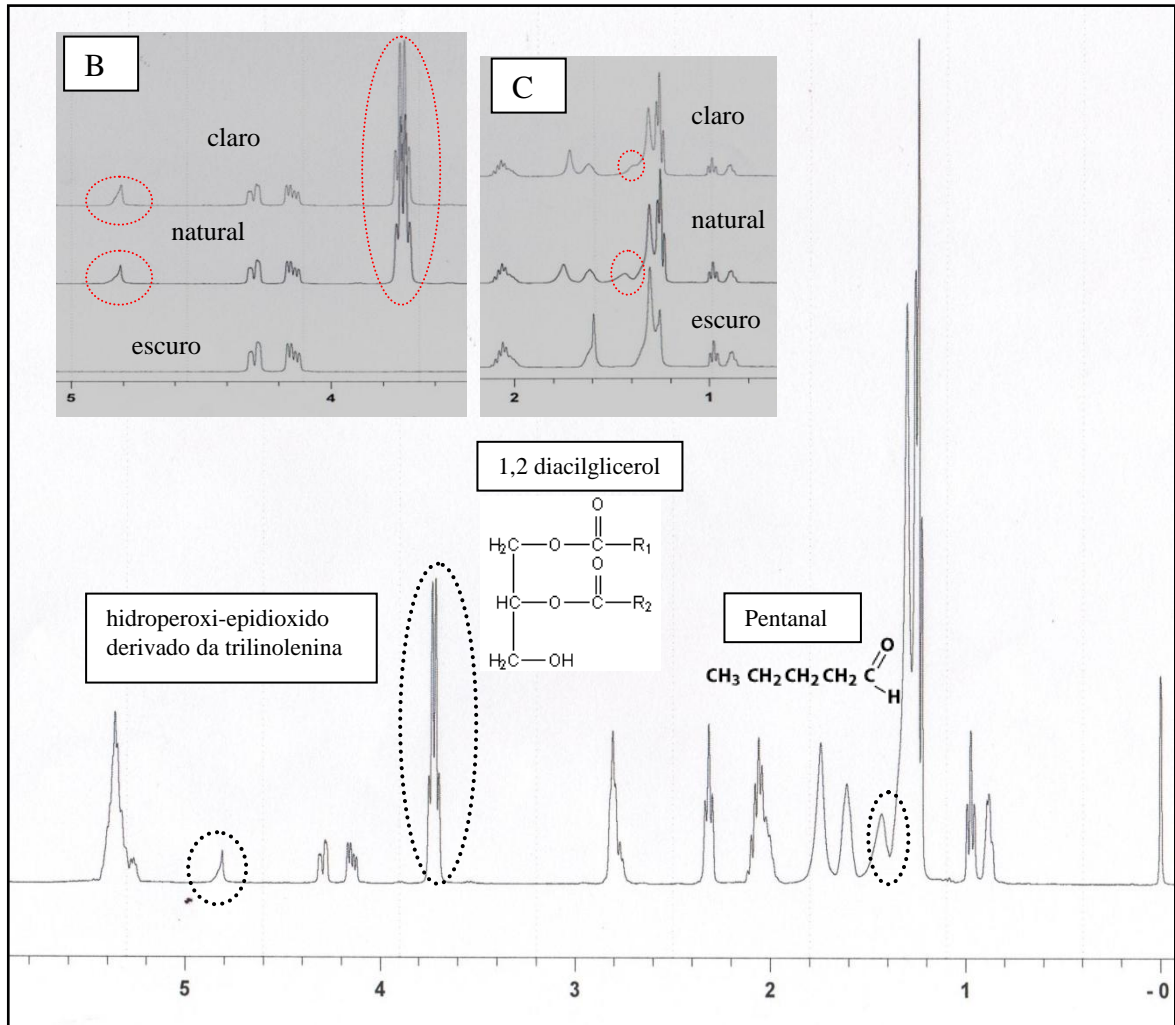


Fonte: A autora

No sétimo dia surgem três novos picos no espectro, um em 1,05 ppm que SACCHI et al (1996) sugerem que seja a formação do volátil propanal, outro em 3,7 ppm representado pelos prótons do 1,2 diacilglicerol ( $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ) e outro em 4,05 ppm que GUILLÉN & RUIZ (2001) diz ser referente ao próton do 1,3 diacilglicerol ( $-\text{CH-OH}$ ), o surgimento destes compostos confirma as mudanças ocorridas em todos parâmetros encontrados na Tabela 10, pois são exatamente as posições vinílicas, dialílicas e alílicas as mais propensas a sofrer ataque portanto ao oxidar, estes parâmetros juntamente com a Roa, II e PM irão diminuir. O PM tende a diminuir pois o TAG hidrolisa formando DAG e voláteis, e o II refere-se à reatividade das duplas ligações, quanto maior o número de duplas ligações, maior o II, e Roa é razão existente entre hidrogênios vinílicos e alifáticos (das duplas e da cadeia alifática), ou seja ao quebrar as ligações duplas, maior é a degradação e o Roa tende a diminuir. A terceira

evidência de oxidação ocorre no décimo dia, com o surgimento de três novos picos no espectro como mostra a Figura 23.

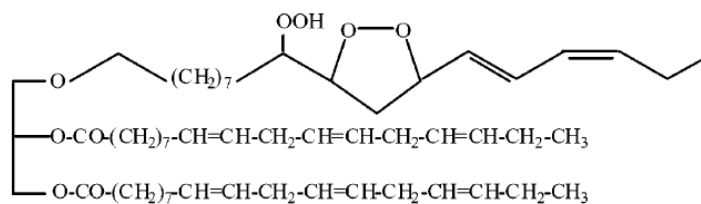
**Figura 23** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do óleo de linhaça no **décimo dia** da foto-oxidação, com pontilhado nas regiões do aparecimento dos picos em 1,4; 3,7 e 4,8 ppm. B) sobreposição dos espectros dos 3 sistemas com expansão na região entre 3,5 a 5 ppm e C) expansão da região entre 1 e 2 ppm evidenciando que os picos surgem nos **sistemas claro e natural**.



Fonte: A autora

O primeiro pico aparece em 1,4 ppm que SACCHI et al (1996) sugerem ser a formação do volátil pentanal, um sinal em 3,7 ppm representado pelos prótons do 1,2 diacilglicerol ( $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ) e outro em 4,8 ppm que segundo GUILLÉN & RUIZ (2001), refere-se a formação de hidroperoxi-epidioxido derivado da trilinolenina (Figura 24), estes compostos também refletem na diminuição do PM, II e Roa, bem como dos hidrogênios V, G e E.

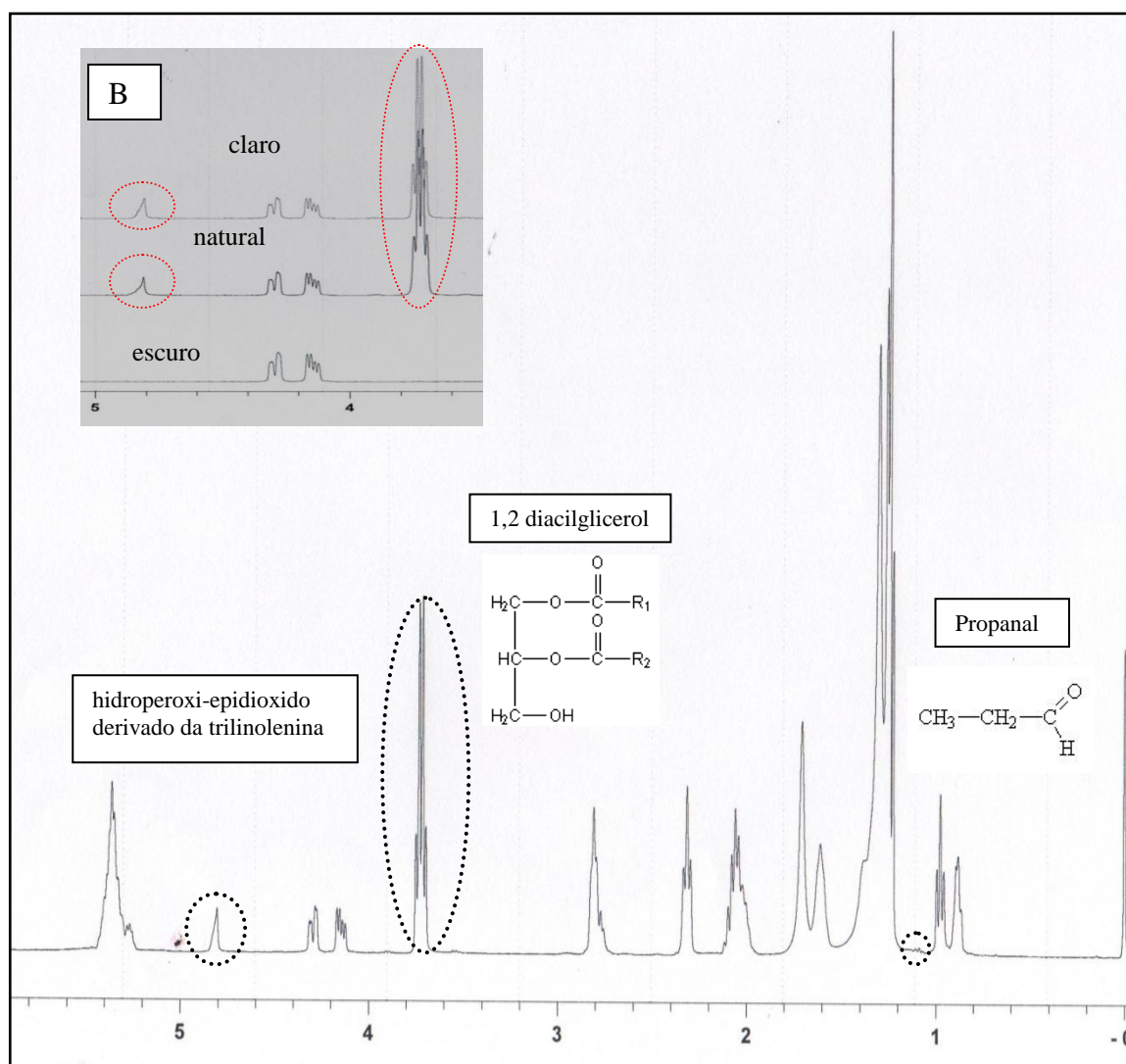
**Figura 24** – Estrutura do hidroperoxi-epidioxido derivado da trilinolenina



Fonte: GUILLÉN & RUIZ (2001)

No sistema claro ocorreram duas evidências de oxidação, um no oitavo e outro no décimo dia. O espectro do oitavo dia aparece na Figura 25.

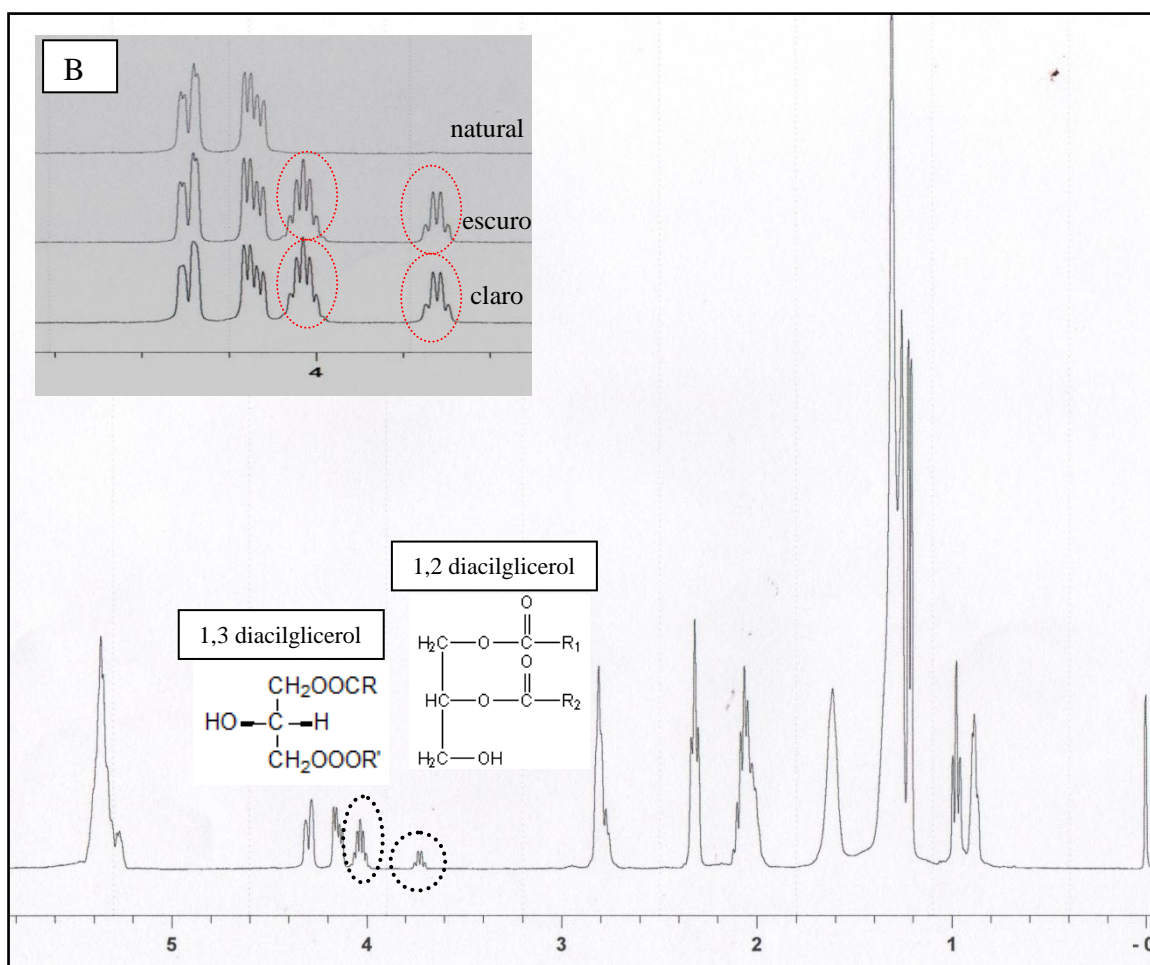
**Figura 25** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do óleo de linhaça no **oitavo dia** da foto-oxidação, com pontilhado nas regiões do aparecimento dos picos em 1,05; 3,7 e 4,8 ppm B) sobreposição dos espectros dos 3 sistemas com expansão na região entre 3,5 a 5 ppm evidenciando que os picos surgem nos **sistemas claro e natural**.



Fonte: A autora

Neste dia surgiram três picos no espectro, um em 1,05 ppm referente à formação de propanal, em 3,7 ppm refere-se aos prótons do 1,2 diacilglicerol ( $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ) e outro em 4,8 ppm devido a formação de hidroperoxi-epidioxido derivado da trilinolenina (um triacilglicerol composto de três unidades de ácido linolênico). No décimo dia o espectro está representado na Figura 26.

**Figura 26** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do óleo de linhaça no **décimo dia** da foto-oxidação, com pontilhado nas regiões do aparecimento dos picos em 3,7 e 4,05 ppm. B) sobreposição dos espectros dos 3 sistemas com expansão na região entre 3,5 a 5 ppm evidenciando que os picos surgem nos **sistemas escuro e claro**.



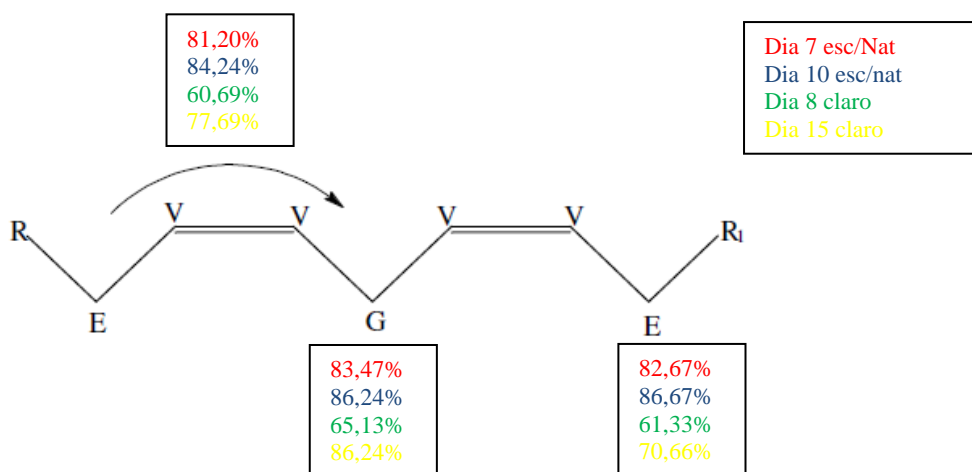
Fonte: A autora

Nestes dias surgiram dois picos no espectro um em 3,7 ppm referente aos prótons do 1,2 diacilglicerol ( $-\text{CH}_2\text{-OH}$ ) e outro em 4,05 ppm devido ao próton de 1,3 diacilglicerol ( $-\text{CH-OH}$ ), com a formação desses compostos, os parâmetros apresentados na Tabela 10 também tendem a diminuir, pois as posições vinílicas, dialílicas e alílicas as mais propensas a sofrer ataque, portanto ao oxidar estas posições, os parâmetros Roa, II e PM irão diminuir. O PM tende a diminuir pois o TAG hidrolisa formando DAG e voláteis, e o II refere-se à



reatividade das duplas ligações, quanto maior o número de duplas ligações, maior o II, ao atacar as ligações duplas, maior é a degradação e o Roa tende a diminuir. No último dia da oxidação no sistema claro, o óleo apresentou endurecimento e coloração escura, característicos do processo de polimerização e ligações cruzadas. Além de evidenciar os produtos formados na degradação a técnica de RMN de  $^1\text{H}$  permite calcular o teor residual (razão entre o valor final e inicial) dos hidrogênios dialfílicos (G), vinílicos (V) e alílicos (E), determinando-se quais foram preferencialmente abstraídos durante a foto-oxidação (Figura 27).

**Figura 27** – Fragmento insaturado de um ácido graxo mostrando as posições alílicas (E), vinílicas (V), dialfílicas (G) e a fração residual desses hidrogênios após foto-oxidação.



Onde: V- hidrogênios vinílicos

E – hidrogênios alílicos

G – hidrogênios dialfílicos

R –  $(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$

R1 –  $(\text{CH}_2)_n\text{Me}$

Fonte: Tolentino, 2008.

Observa-se na Figura 27 que a posição vinílica (V) é a mais degradada, excetuando-se o último dia de oxidação do sistema claro, isso confirma que o ácido linolênico composto por 3 duplas ligações, tende a ter alta reatividade nestas posições. Além disso o óleo que permaneceu até o oitavo dia no sistema claro foi o que apresentou uma maior degradabilidade, tendo 39,31% de ataque nessa posição ( $100 - 60,69\%$ ). A razão entre hidrogênios olefínicos e alifáticos (Roa) também dá informações sobre a estabilidade oxidativa dos óleos. Comparando os valores iniciais, observa-se que este índice diminui com o tempo de foto-oxidação. Pela análise deste índice, calculando-se o seu valor residual (razão entre o valor

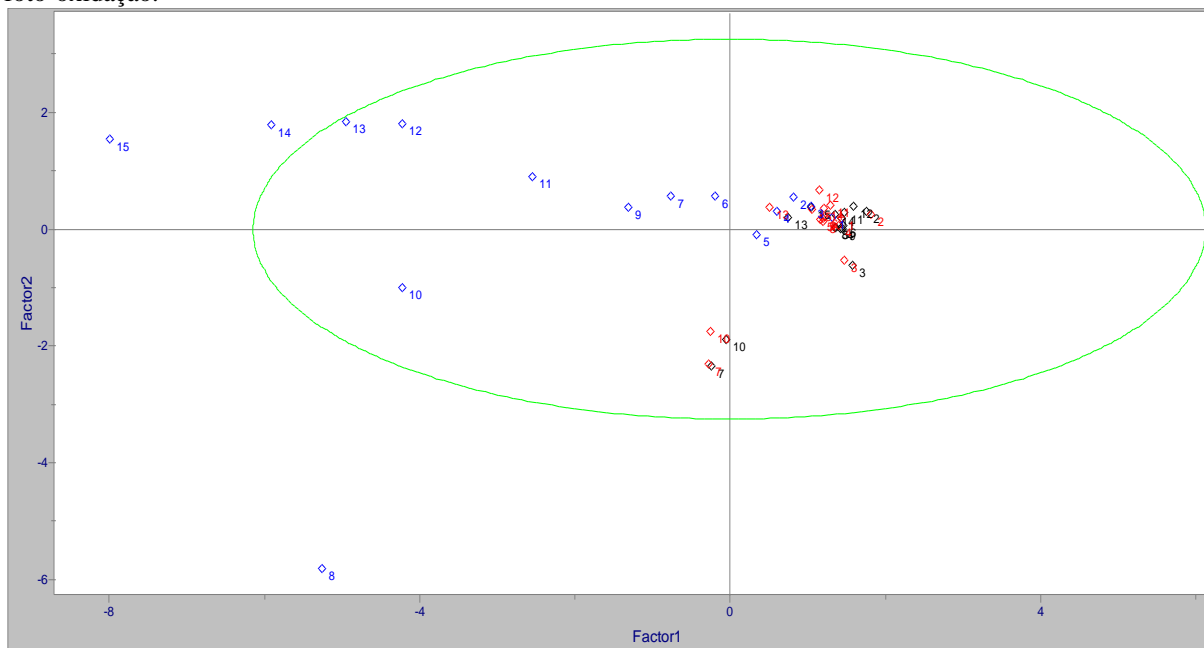
final e inicial), pode-se estimar a resistência á oxidação, e vê-se que no sistema escuro/natural o óleo permanece 88,73% inalterado, contra 73,56% do sistema claro. Portanto a técnica de RMN de  $^1\text{H}$ , juntamente com as outras análises comprovaram que houve degradação no óleo. Todas as técnicas em conjunto demonstraram que o sistema claro, foi eficiente para degradar o óleo, e a análise estatística confirmou que os parâmetros: *dias* e a interação *luz X dias*, foram os que apresentaram significância estatística, pois quanto maior a quantidade de dias de oxidação, e este aliado à presença de luz, maior é a degradação observada no óleo.

A Análise de Componentes Principais (ACP) é uma técnica estatística multivariada criada por Hotelling (1933) e que se dedica à explicação da estrutura de variância-covariância existente em um conjunto de dados, utilizando-se combinações lineares das variáveis originais. Segundo Rencher (2002), seus objetivos principais são: (1) a redução de dimensionalidade, e (2) a interpretação de dados. Seu princípio é fatorar um conjunto de dados de natureza multivariada, objetivando a representação das variações existentes na forma de componentes principais (PCs).

Gambarra Neto (2008) em sua dissertação de mestrado realizou uma PCA em um conjunto de 114 amostras de óleo vegetal para avaliar possíveis sobreposições entre as classes e avaliar se as amostras estavam ou não vencidas. Essa análise mostrou uma separação em dois grandes grupos, onde os escores mais negativos em PC1 pertencem às amostras da classe vencidos, enquanto que os mais positivos correspondem às amostras não vencidas. Em seguida ele aplicou novamente o PCA somente nas amostras não vencidas para classificar os tipos de óleos, verificando novamente dois grupos, um constituído pelas classes Canola e Milho e o outro formado por Soja e Girassol, sendo que estes foram agrupados juntos devido as suas semelhanças com relação à composição de ácidos graxos.

Com o propósito de investigar a existência de similaridades e/ou diferenças entre as amostras e variáveis analisadas realizou-se uma análise exploratória dos dados aplicando PCA. Inicialmente foi realizada uma PCA no conjunto das 45 amostras de óleo de linhaça submetido à foto-oxidação, para avaliar possíveis sobreposições entre as classes natural, escuro e claro. Essa análise mostrou que existe uma separação em dois grandes grupos (Figura 28). Os escores mais negativos em **Factor 1** pertencem às amostras da classe claro (azul) que foram aquelas que apresentaram uma maior degradação com o passar do tempo, visto que o dia 15 como mostra a Figura é a amostra mais degradada, enquanto que os mais positivos correspondem às amostras natural e escuro (preto e vermelho), que estão agrupadas juntas visto que apresentaram todos os resultados das análises de maneira similar.

**Figura 28** – Gráfico dos escores de **Factor 1** versus **Factor 2** das 45 amostras de óleo de linhaça submetido à foto-oxidação.



Fonte: A autora

A PCA confirmou que a câmara clara foi eficiente para degradar as amostras de óleo.

Para tentar retardar esse processo oxidativo, e estender a vida útil dos óleos e gorduras, inibidores de oxidação ou comumente chamados de aditivos antioxidantes, podem ser adicionados aos mesmos. Este produto reage preferencialmente com os produtos de oxidação oriundos da degradação dos óleos, formando produtos mais estáveis e interrompendo a reação em cadeia. Antes de adicioná-los nos óleos, primeiramente foi testada a eficiência dos mesmos através da atividade inibitória do DPPH·, para confirmar que possuem atividade antioxidante.

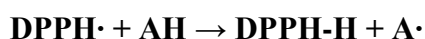
### 5.3 Atividade Inibitória de Radicais Livres (DPPH)

Em decorrência da grande diversidade química existente, em especial entre os compostos fenólicos, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliação da capacidade antioxidante de amostras. Alguns deles determinam a habilidade dos antioxidantes em sequestrar espécies reativas geradas no meio reacional (Sequestro do peróxido de hidrogênio -  $H_2O_2$ ), Sequestro do radical peroxil - Método ORAC (Capacidade de Absorção de Radicais de Oxigênio), Sequestro de radical superóxido - xantina oxidase) todos são métodos analisados por fluorescência. Outros avaliam a eficiência dos antioxidantes em inibir a peroxidação lipídica através de sua complexação com íons metálicos, inativando reações radicalares e

prevenindo a conversão de hidroperóxido em oxirradicais reativos como o método de Folin-Ciocalteu. Já o método de oxidação do  $\beta$ -caroteno/ ácido linoleico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico (medida espectrofotométrica). Não obstante a diversidade de métodos para avaliar a capacidade antioxidante, não existe um procedimento metodológico universal (OLIVEIRA et al, 2009; SUCUPIRA et al, 2012).

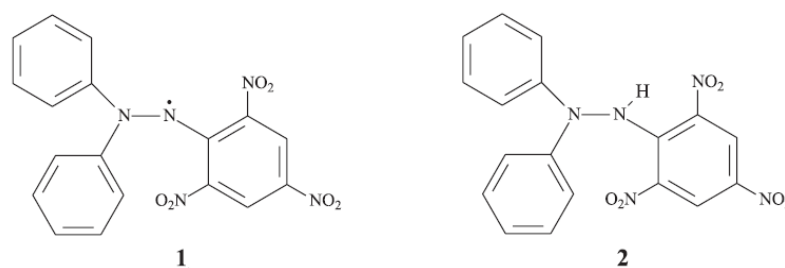
Um dos métodos e o utilizado neste trabalho é o da capacidade antioxidante frente ao radical DPPH $\cdot$ . Este é um método químico, aplicado para determinar a capacidade antioxidante e consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH $\cdot$ ). É considerado um método rápido, prático e com boa estabilidade (SUCUPIRA et al, 2012).

O DPPH $\cdot$  (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável por virtude da deslocalização do elétron livre sobre a molécula como um todo, possui coloração púrpura e absorve na faixa de 515-520 nm (enquanto radical). Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R $\cdot$ ) o DPPH $\cdot$  é reduzido formando o 2,2-difenilpicrilidrazina (DPPH-H) de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da banda de absorção, sendo a mesma monitorada pelo decréscimo da absorbância (SUCUPIRA et al, 2012; OLIVEIRA et al, 2009; BRAND-WILLIAMS, 1995).



A Figura 29 apresenta as formas radicalar e não radicalar do DPPH (ALVES et al, 2010).

**Figura 29-** Formas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH



Fonte: ALVES et al, 2010.

O mecanismo de reação é baseado em transferência de elétrons, enquanto a abstração de átomo de hidrogênio é uma reação marginal, pois a mesma acontece lentamente em solventes que estabelecem fortes ligações de hidrogênio. O método é influenciado pelo

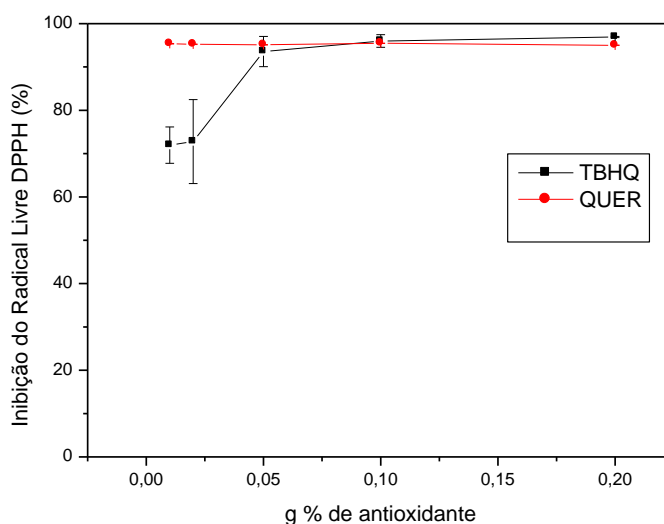
solvente e pelo pH das reações. É considerado um método fácil e útil para análise de substâncias puras e amostras complexas (OLIVEIRA et al, 2009).

A partir dos resultados obtidos, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH• consumida pelo antioxidante) ou sequestradora de radicais e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (OLIVEIRA et al, 2009).

DUARTE-ALMEIDA et al (2006) em sua pesquisa avaliando a atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH• verificaram que a quercetina apresentou a maior porcentagem de sequestro de radicais livres ou seja melhor atividade antioxidante em comparação aos padrões sintéticos BHA e BHT.

O método é baseado na redução do radical livre DPPH em solução alcoólica por um composto doador de hidrogênio (antioxidante) formando um produto não radical DPPH-H. O radical DPPH remanescente é medido depois de um tempo específico e é inversamente proporcional a capacidade de captação de radicais livres do antioxidante testado. O gráfico da Inibição do DPPH é mostrado na Figura 30.

**Figura 30** – Percentual de inibição do radical livre DPPH pelos antioxidantes TBHQ e Quercetina.



Fonte: A autora

Realizou-se este método utilizando os antioxidantes TBHQ (padrão para óleos) e Quercetina (natural) nas concentrações de 0,01; 0,02; 0,05; 0,10e 0,20 g antioxidante/% óleo (limite permitido pela ANVISA), e observa-se que em todas as concentrações houve inibição

do DPPH como mostra a Figura 29, não sendo observado efeito dose-dependente onde, o aumento da concentração do substrato (TBHQ e Quercetina) potencializa a atividade antioxidante então optou-se em utilizar a concentração limítrofe nos ensaios de degradação. Na concentração 0,2 g antioxidante/% óleo obteve-se cerca de 97% e 95% de inibição do radical livre DPPH, para TBHQ e Quercetina respectivamente, confirmando que ambos possuem uma atividade relativamente alta e que podem ser utilizados nos ensaios posteriores.

#### 5.4 Ensaio de foto-oxidação utilizando antioxidantes

Para estudar o efeito da presença de antioxidantes no processo de foto-oxidação do óleo de linhaça realizou-se o ensaio utilizando o sistema claro, visto que este apresentou uma degradação mais eficiente. No sistema foram adicionados três béqueres contendo: óleo in natura, óleo juntamente com TBHQ, e óleo juntamente com Quercetina. A concentração de antioxidantes adicionado no óleo foi de 0,20 g antioxidante/% óleo tanto do TBHQ quanto da Quercetina. O processo foi monitorado durante um período de 15 dias, com retirada diária de amostras, sendo que as análises IA, IP, RMN de  $^1\text{H}$ , UV-Vis e FTIR foram realizadas em triplicata, cujos resultados das análises físico-químicas são apresentados como a média aritmética dos valores na Tabela 11.

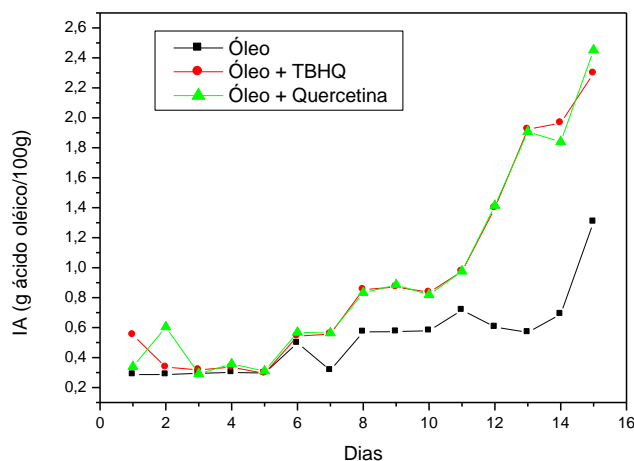
**Tabela 11** – Índice de acidez e peróxidos do óleo de linhaça na ausência e presença de antioxidantes monitorado por 15 dias.

DIAS	IA (g ácido oleico/100g)			IP (mmol peróxido/kg)		
	CLARO	TBHQ	QUERCETINA	CLARO	TBHQ	QUERCETINA
1	0,286	0,551	0,339	74,746	46,155	59,337
2	0,286	0,335	0,604	78,108	81,053	230,035
3	0,295	0,317	0,292	87,849	107,437	332,600
4	0,300	0,336	0,357	113,669	144,541	448,772
5	0,296	0,294	0,309	120,100	248,750	501,426
6	0,497	0,542	0,568	162,326	679,378	766,954
7	0,315	0,557	0,564	172,088	836,476	949,870
8	0,571	0,853	0,831	211,862	1079,445	1061,860
9	0,573	0,870	0,885	280,808	1272,383	1287,554
10	0,579	0,835	0,819	290,611	1508,057	1462,069
11	0,716	0,974	0,975	337,862	1570,140	1522,469
12	0,603	1,398	1,414	385,379	2001,040	1763,645
13	0,568	1,923	1,907	475,842	2056,547	2055,513
14	0,689	1,965	1,839	538,532	2160,040	2057,726
15	1,306	2,297	2,452	576,011	2097,458	1959,529

Fonte: A autora

A Figura 31 apresenta o perfil do índice de acidez utilizando antioxidantes com o passar do tempo.

**Figura 31** – Índice de acidez da foto-oxidação do óleo de linhaça na presença e ausência de antioxidantes TBHQ e Quercetina em sistema claro durante 15 dias.



Fonte: A autora

Observa-se em todas as condições que o índice de acidez aumenta com o passar do tempo, indicando que a presença dos antioxidantes não evitaram a formação de AGL no sistema, apesar de todos os valores estarem dentro do valor exigido pela legislação 3 g ácido oleico/100g. Desde o primeiro dia da oxidação, os valores deste índice para os sistemas que utilizaram antioxidantes foi superior ao que continha somente óleo, indicando que a presença ou ausência dos mesmos não impede que o óleo degrade e forme AGL juntamente com os DAG e MAG. Entretanto, este índice não deve ser utilizado sozinho para presumir a estabilidade de um óleo e sim associado a outros parâmetros, tais como peróxidos, dienos conjugados, formação de hidroperóxidos e compostos de oxidação primários e secundários.

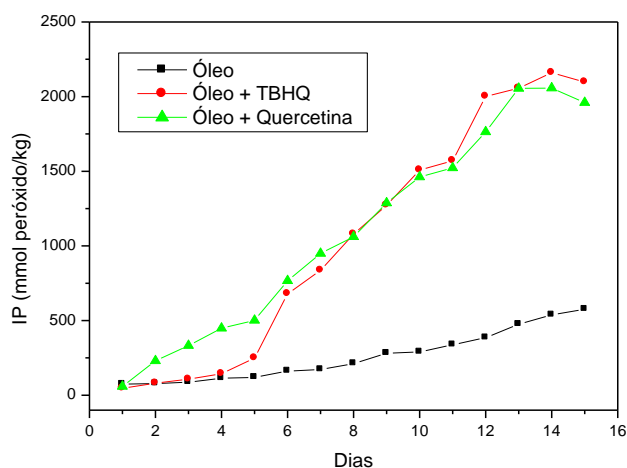
Na análise estatística do IA mostrado detalhadamente no Anexo C, observa-se uma significância estatística da foto-oxidação com antioxidantes, pois ao realizar o processo de oxidação em 15 dias, há uma variação significativa dos valores de IA ao comparar o primeiro e o último dia de experimento, isto é confirmando pelo *teste t* no qual observa-se que o parâmetro *dias* foi único influente no processo de degradação, confirmando que a presença ou não dos antioxidantes, não protege nem degrada o sistema, mas sim quanto maior o tempo de exposição maior o IA e maior a quantidade de AGL no sistema. Observou-se também o valor de  $r^2 = 0,94$ , (ideal é  $r^2 = 1$ ), portanto pode-se ter confiança nos dados obtidos experimentalmente. Além disso o significado da regressão foi testado (95% confiança),

proporcionando um valor de 104,4 (10 vezes maior) provando ser estatisticamente significativo, confirmando que o método de degradação em câmara clara foi eficiente mesmo na presença de antioxidantes.

Ao comparar a eficiência dos antioxidantes TBHQ e Quercetina vê-se que ambos apresentaram valores de acidez semelhantes, não podendo através dessa técnica determinar qual apresentou melhor resultado.

A Figura 32 apresenta o índice de peróxidos utilizando antioxidantes em função do tempo de exposição.

**Figura 32** - Índice de peróxidos da foto-oxidação do óleo de linhaça na presença e ausência de antioxidantes TBHQ e Quercetina.



Fonte: A autora

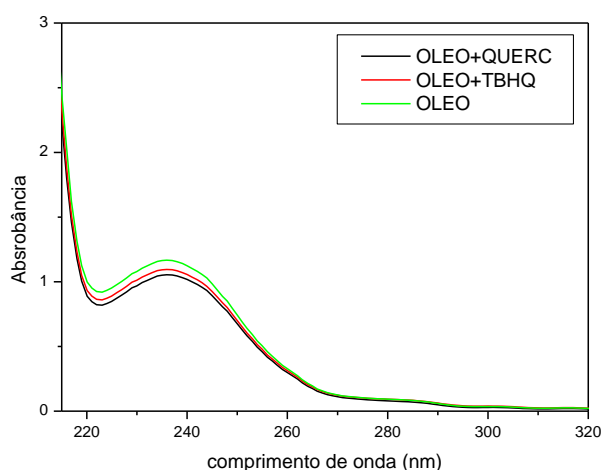
Na Figura 32 pode-se observar que no primeiro dia da oxidação, ambos antioxidantes evitaram a formação de peróxidos no sistema, porém após o segundo dia na câmara clara, os mesmos já tiveram sua atividade diminuída, pois observou-se um aumento gradativo do índice de peróxidos. Os sistemas que utilizaram antioxidantes tiveram um aumento maior no IP quando comparado ao sistema que tinha somente o óleo, pois estes compostos podem ser degradados pela luz, fazendo que com percam sua atividade como potenciais agentes antioxidantes. Na análise estatística do IP mostrado detalhadamente no Anexo D, observa-se uma significância estatística da foto-oxidação com antioxidantes, pois ao realizar o processo de oxidação em 15 dias, há uma variação significativa dos valores de IA ao comparar o primeiro e o último dia de experimento, isto é confirmando pelo *teste t* no qual observa-se que os parâmetros *dias*, *antioxidantes* e a interação *dias x antioxidantes*, foram influentes no processo de degradação do sistema, confirmando que a presença dos antioxidantes não ajuda a



proteger o óleo da oxidação, pois quanto maior a quantidade de dias de experimento, e quando há presença dos antioxidantes, maior é o IP observado, afirmando que os mesmos não impediram à formação de peróxidos no sistema. Observou-se também o valor de  $r^2 = 0,98$ , (ideal é  $r^2 = 1$ ), portanto pode-se ter confiança nos dados obtidos experimentalmente. Além disso o significado da regressão foi testado (95% confiança), proporcionando um valor de 468,3 (10 vezes maior) provando ser estatisticamente significativo, confirmando que houve degradação mesmo na presença de antioxidantes.

A espectroscopia de UV-Vis também é uma técnica utilizada para verificar a eficiência dos antioxidantes. A Figura 33 apresenta o espectro UV-Vis do primeiro dia da oxidação.

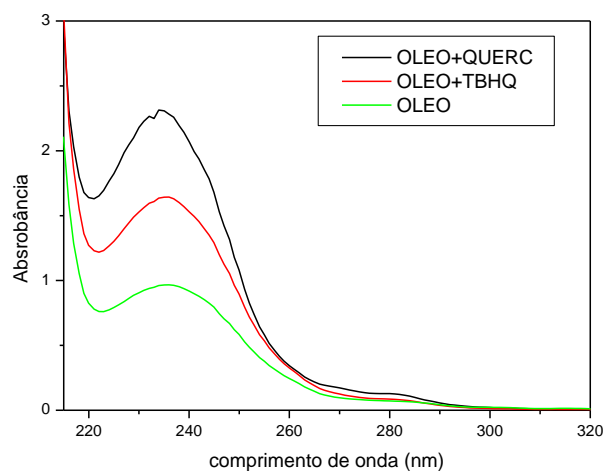
**Figura 33** – Espectro UV-Vis do primeiro dia da foto-oxidação do óleo de linhaça na presença e ausência de antioxidantes TBHQ e Quercetina.



Fonte: A autora

Verifica-se no primeiro dia da oxidação, que o sistema com antioxidantes possui uma menor absorbância quando comparado com o sistema com óleo, tendo o TBHQ e a Quercetina valores próximos de absorção, indicando que possuem o mesmo potencial nas primeiras horas de ensaio. Do segundo ao sexto dia, o perfil é mostrado na Figura 34.

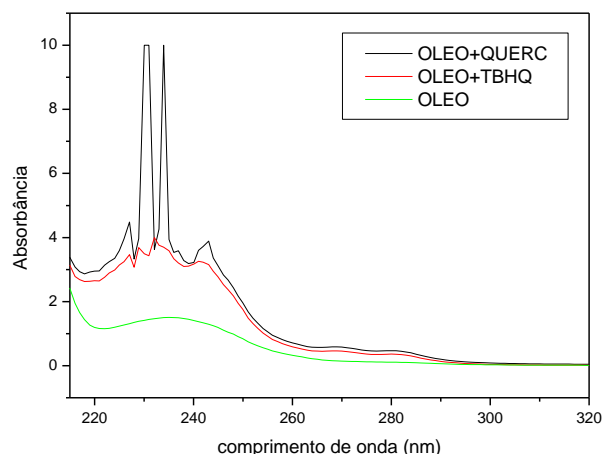
**Figura 34** - Espectro UV-Vis do segundo ao sexto dia da foto-oxidação do óleo de linhaça.



Fonte: A autora

Nestes dias tem-se que o óleo (somente) apresentou uma absorbância menor quando comparado aos sistemas que utilizaram antioxidantes, isso pode ser devido a degradação desses compostos quando expostos à radiação ultravioleta fazendo com que absorvam em maiores intensidades, nota-se que o TBHQ apresentou uma melhor atividade quando comparada à Quercetina. À partir do sétimo até o último dia, é mostrado o perfil na Figura 35.

**Figura 35** - Espectro UV-Vis do sétimo ao último dia da foto-oxidação do óleo de linhaça.

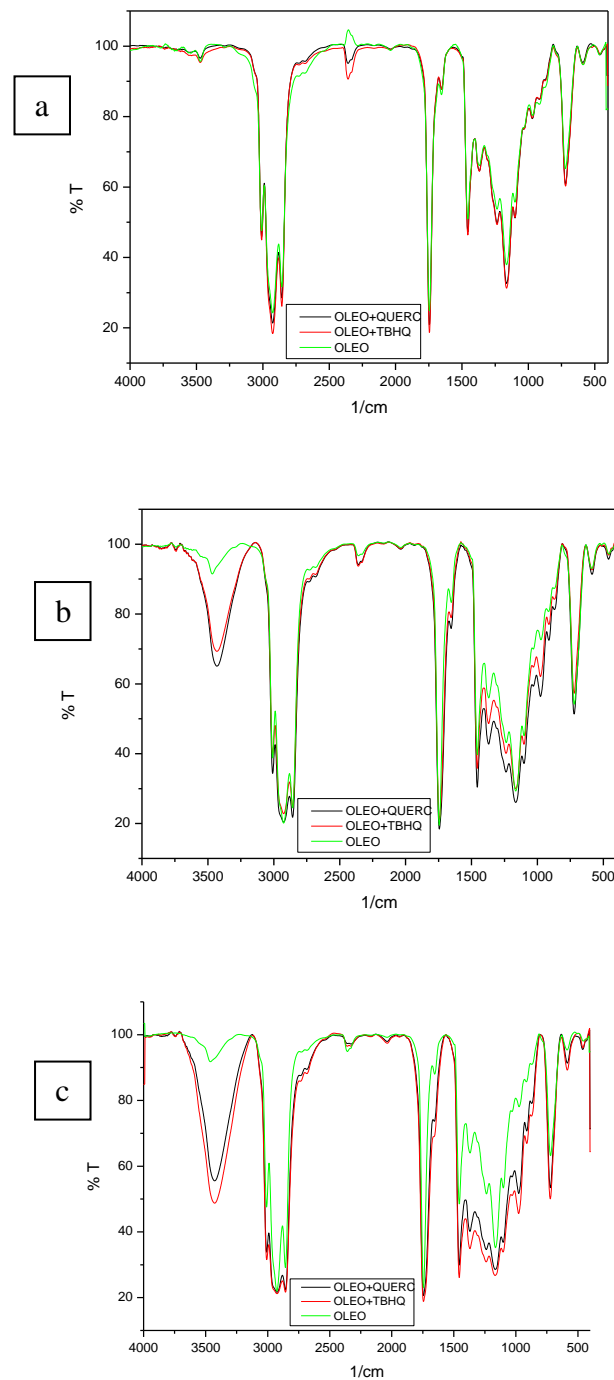


Fonte: A autora

Nota-se que à partir do sétimo dia, o antioxidante Quercetina degrada totalmente, apresentando absorbâncias extremamente altas, o TBHQ também começa a degradar, por isso eles não podem ser considerados como antioxidantes eficientes para proteger o óleo no processo de foto-oxidação prolongado.

A espectroscopia de IR revela se houve formação ou desaparecimento de algumas bandas, também sendo uma técnica útil para verificar a eficiência dos antioxidantes. Na Figura 36 tem-se os espectros de IR do (a) primeiro dia, (b) do 2º ao 10º dia e (c) do 11º ao último dia de oxidação.

**Figura 36** – Espectro IR do óleo de linhaça na presença e ausência de antioxidantes durante o processo de foto-oxidação(a), primeiro dia, (b) do 2º ao 10º dia e (c) do 11º ao último dia de oxidação.



No espectro 36 (a) observa-se que não ocorre nenhuma modificação dos grupamentos químicos do óleo na ausência e na presença dos antioxidantes, indicando que neste dia, o mesmo encontra-se íntegro. Nos próximos dias (figura 36b e 36c) nota-se o surgimento de uma banda próximo a  $3450\text{ cm}^{-1}$  correspondente à formação de hidroperóxidos, ficando mais evidente dos últimos dias da degradação, observa-se também um aumento da banda de absorção a  $970\text{ cm}^{-1}$  corresponde à formação de duplas ligações com configuração *trans* e o aparecimento de bandas adicionais próximo dos  $1750\text{ cm}^{-1}$  caracterizando a formação de compostos voláteis, todas essas bandas são indicativas de processo oxidativo. Do segundo ao décimo dia, a quercetina representou o antioxidante com menor eficiência pois apresentou uma banda de hidroperóxidos mais intensa, porém nos últimos dias da oxidação, o TBHQ apresentou essa característica, confirmando que esses agentes não impedem a formação de hidroperóxidos no sistema, e que degradam com a exposição à radiação.

A RMN de  $^1\text{H}$  complementa as outras técnicas, e os resultados estão apresentados na Tabela 12.

**Tabela 12** – Resultados obtidos pela RMN de  $^1\text{H}$  com a utilização de antioxidantes TBHQ e Quercetina.

(continua)

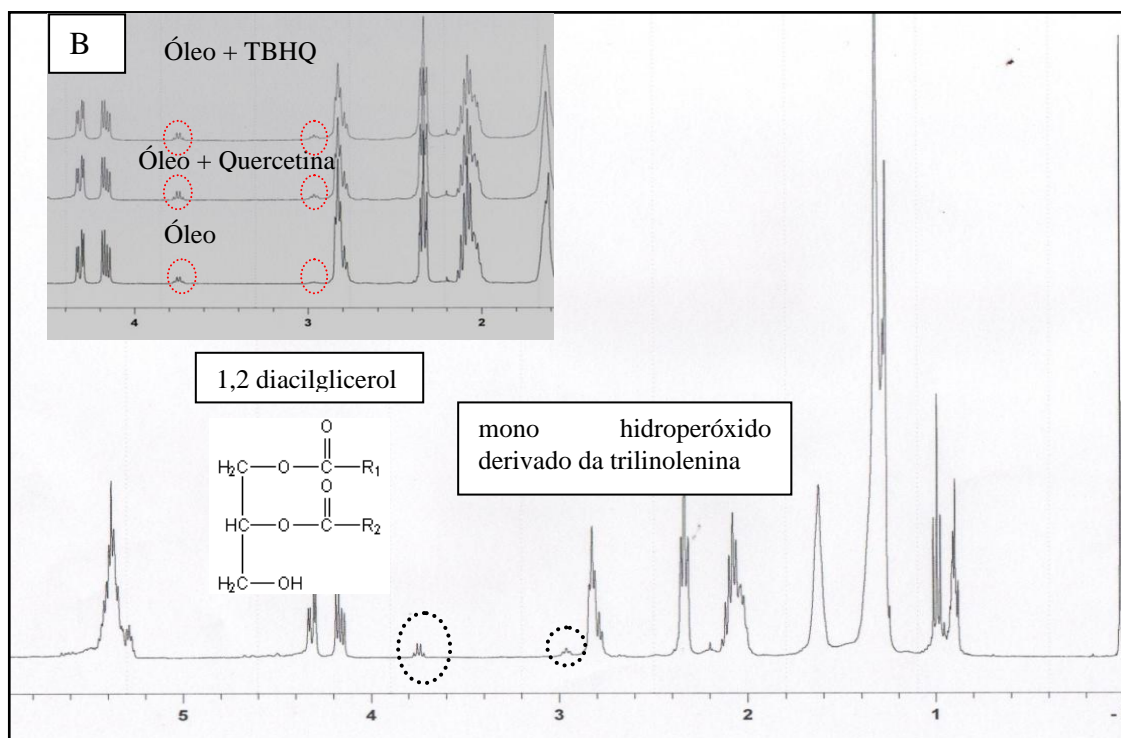
	Dias	V	E	G	PM	II	Roa	%Ln
ÓLEO	Orig	12,82	10,9	7,5	840,2	193,7	8,17	54,91
	1	12,80	11,0	7,5	840,2	193,2	8,13	55,06
	2	12,79	11,0	7,5	840,2	192,0	8,07	54,84
	3	12,90	11,1	7,6	840,1	191,9	7,81	54,74
	4	12,69	10,9	7,4	840,2	191,6	8,08	54,85
	5	12,66	10,9	7,4	841,2	191,0	8,09	55,01
	6	12,49	10,8	7,3	840,8	188,6	8,08	55,21
	7	12,54	10,9	7,4	839,5	189,6	8,07	54,79
	8	12,50	10,8	7,3	840,4	188,7	8,04	54,90
	9	12,25	10,6	7,0	840,3	185,0	8,06	55,66
	10	12,45	10,9	7,2	835,4	189,1	7,90	54,29
	11	12,11	10,3	7,1	839,8	183,0	7,86	54,69
	12	12,44	10,8	7,1	838,8	188,2	8,01	54,57
	13	12,30	10,8	7,0	837,4	186,5	7,89	54,27
	14	11,76	10,5	7,0	836,2	178,5	7,63	53,34
15	11,92	10,5	6,9	837,8	180,6	7,73	53,51	
ÓLEO+TBHQ		V	E	G	PM	II	Roa	%Ln
	Orig	12,82	10,9	7,5	840,2	193,7	8,17	54,91
	1	12,81	11,0	7,6	840,5	193,5	8,29	55,87
	2	12,72	11,0	7,4	840,5	192,1	8,15	55,15
	3	12,72	11,0	7,4	839,8	192,2	8,07	54,78
	4	12,62	10,9	7,4	840,4	190,7	8,06	54,90
	5	12,32	10,7	7,2	839,1	186,4	7,92	54,56
	6	11,51	10,2	6,5	836,2	174,7	7,67	54,28
	7	11,12	10,0	6,2	829,7	170,2	6,95	49,82
8	10,86	9,9	6,1	833,8	165,3	7,03	50,46	

	<b>9</b>	10,57	9,8	5,6	833,8	160,9	6,86	49,83
	<b>10</b>	10,02	9,8	5,1	828,4	153,5	6,72	49,63
	<b>11</b>	10,03	9,6	5,3	831,2	153,1	6,86	49,67
	<b>12</b>	9,59	8,7	4,5	821,5	148,2	6,32	46,65
	<b>13</b>	7,24	7,5	3,4	827,0	111,1	4,59	38,12
	<b>14</b>	8,57	8,1	4,4	829,0	131,2	5,55	43,25
	<b>15</b>	7,80	7,4	3,9	819,6	120,7	5,76	46,47
<b>ÓLEO+QUERCETINA</b>	<b>Orig</b>	12,82	10,9	7,5	840,2	193,7	8,17	54,91
	<b>1</b>	12,66	11,0	7,4	839,3	191,5	8,14	55,40
	<b>2</b>	12,38	10,8	7,2	840,5	187,0	8,13	55,81
	<b>3</b>	12,24	10,7	7,1	838,1	185,4	7,88	54,29
	<b>4</b>	12,13	10,6	7,1	839,3	183,4	7,69	53,10
	<b>5</b>	11,44	10,1	6,6	838,4	173,2	7,51	53,19
	<b>6</b>	11,32	10,1	6,4	835,4	172,0	7,21	51,37
	<b>7</b>	11,14	10,1	6,3	830,7	170,2	7,43	53,11
	<b>8</b>	10,87	10,0	6,0	833,7	165,5	6,91	49,66
	<b>9</b>	10,51	9,7	5,8	833,1	160,2	6,06	45,08
	<b>10</b>	10,16	9,6	5,4	826,9	156,0	6,70	48,67
	<b>11</b>	10,16	9,4	5,3	830,5	155,3	6,72	48,26
	<b>12</b>	10,53	9,1	4,8	823,6	162,2	6,31	45,47
	<b>13</b>	7,75	8,2	3,6	827,8	118,8	5,68	44,44
	<b>14</b>	9,32	9,1	4,4	827,5	142,9	5,38	40,94
<b>15</b>	9,98	8,4	4,2	819,8	154,6	6,40	47,75	

Os parâmetros estruturais foram obtidos dos espectros integrados de RMN de <sup>1</sup>H e calculados conforme descrito por BELESKI-CARNEIRO, REDA E CARNEIRO, 2005. V= hidrogênios vinílicos (olefínicos); G= hidrogênios dialílicos; E = hidrogênios alílicos; PM = peso molecular; Ii=índice de iodo; Roa= razão entre hidrogênios olefínicos e alifáticos; %Ln = concentração de ácido linolênico.

Primeiramente, observou-se o aparecimento de 2 picos no espectro no décimo dia da oxidação, para as três condições (óleo, óleo + TBHQ, óleo + quercetina) como mostrado na Figura 37.

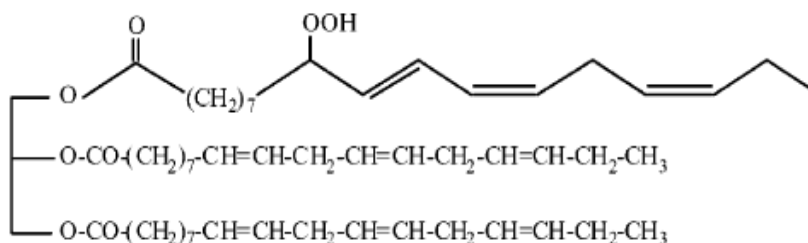
**Figura 37** -Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do óleo de linhaça com a utilização dos antioxidantes no **décimo dia** da foto-oxidação, com pontilhado na região do aparecimento do pico em 2,9 e 3,7 ppm B) sobreposição dos espectros dos 3 sistemas com expansão na região entre 2,5 a 4,0 ppm evidenciando que os picos surgem nos **três sistemas**.



Fonte: A autora

O primeiro pico surge em 2,9 ppm que segundo FRANKEL et al (1990) representa os prótons alílicos ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ) do mono hidropéroxido derivado da trilinolenina (Figura 38), e outro pico surge em 3,7 ppm e refere-se aos prótons do 1,2 diacilglicerol ( $-\text{CH}_2-\text{OH}$ ) (GUILLÉN & RUIZ, 2001), é neste dia que ocorre a redução brusca de todos os parâmetros obtidos pelo cálculo das integrações e mostrados na Tabela 12.

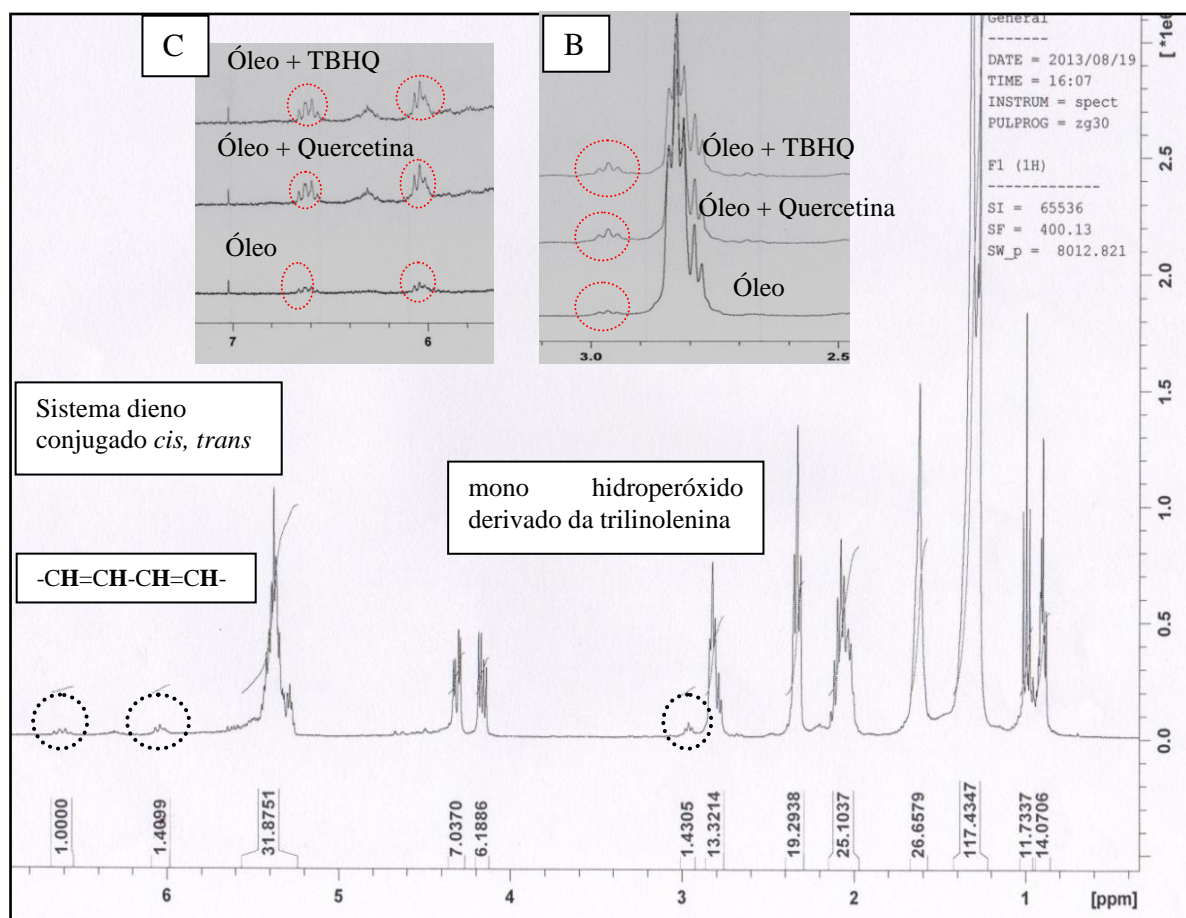
**Figura 38** – Estrutura do mono hidropéroxido derivado da trilinolenina



Fonte: GUILLÉN & RUIZ (2001)

No décimo terceiro dia da oxidação para as condições que possuem antioxidantes, surgem três picos nos espectros como mostra a Figura 39.

**Figura 39** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do óleo de linhaça com a utilização dos antioxidantes no **décimo terceiro dia** da foto-oxidação, com pontilhado na região do aparecimento do pico em 2,9; 6,1 e 6,6 ppm B) sobreposição dos espectros dos 3 sistemas com expansão na região entre 2,5 a 3,1 ppm C) expansão da região entre 6 e 7 ppm evidenciando que os picos surgem nos **três sistemas**



Fonte: A autora

O primeiro pico surge em 2,9 ppm representado pelos prótons alílicos ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$ ) do mono hidroperóxido derivado da trilinolenina (FRANKEL et al, 1990), o segundo e o terceiro em 6,1 e 6,6 ppm, respectivamente, sendo que o aparecimento de picos nesta região é relativo ao sistema dieno conjugado *cis, trans* ( $-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$ ) derivado dos mono hidroperóxidos dos ácidos graxos em geral (HAYWOOD et al, 1995). A tabela 12 mostra que houve um decréscimo acentuado em todos os parâmetros nesses dias, isso deve-se ao fato do surgimento dos picos extras no espectro representando grupamentos característicos do processo oxidativo. No 13º dia de experimento, o sistema que contém óleo + TBHQ, e óleo + Quercetina sofrem maior degradação como visto na Tabela 12, indicando que os mesmos são sensíveis à radiação, e exercem uma atividade baixa quando adicionados no óleo. Calculando-se o teor residual dos hidrogênios V, E e G nos dias de maior oxidação, tem-se para o sistema com óleo (14º dia), 91,73; 96,33 e 93,33% respectivamente, sendo a posição vinílica (V) a mais comprometida, com TBHQ (13º dia) tem-se V = 56,47%; E = 68,81% e G

= 45,33% e com Quercetina (13º dia) V = 60,45%; E = 75,23% e G = 48%, indicando que para ambos a maior degradação ocorre nas posições dialíticas (G). Com relação à razão entre hidrogênios olefínicos e alifáticos (Roa) tem-se OLEO = 93,39%, OLEO + TBHQ = 56,18% e OLEO + QUERCETINA = 69,52 %, indicando que o sistema que contém somente óleo permanece 93,39% inalterado, e ao comparar os antioxidantes que apesar de possuírem baixa efetividade, a Quercetina foi mais eficiente (deixou o sistema mais inalterado) quando comparada ao TBHQ que é o antioxidante padrão utilizado em óleo, podendo então substituir o mesmo.

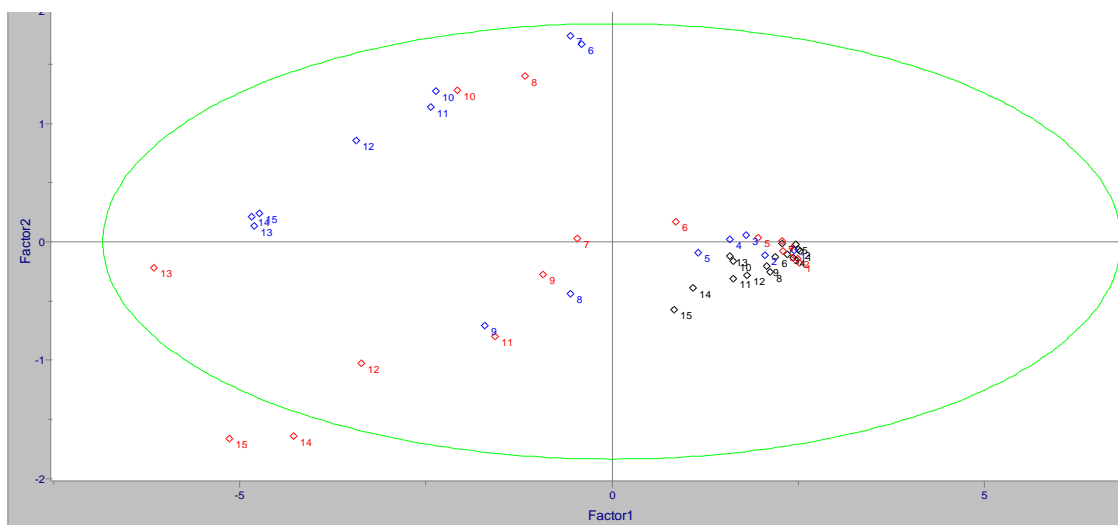
Os antioxidantes TBHQ e Quercetina potencializaram o processo de degradação do óleo de linhaça, devido à adição de alta concentração dos mesmos (0,02g/100 g óleo) no óleo. Oliveira (2003), em seu estudo submetendo os óleos de milho e canola à foto-oxidação acelerada durante um período de 168 horas e adição do antioxidante TBHQ na concentração de máxima de 0,02g/kg óleo, confirmou através das análises de UV-Vis e índice de peróxidos que o TBHQ exerceu efeito protetor no óleo. Já o estudo realizado por Tolentino (2008), avaliando a estabilidade dos óleos de soja, canola, milho e girassol submetidos a foto-oxidação por 60 dias, utilizando os antioxidantes PG, TBHQ, BHT, BHA e ácido cítrico na concentração máxima de 0,02g/kg óleo, verificou pelos dados de UV-Vis que o (PG) mostrou-se mais eficiente na proteção dos óleos, pois proporcionou um menor valor de absorvância a 232 nm, ou seja uma menor formação de compostos conjugados.

Ao comparar o estudo com a literatura, observou-se que a concentração de antioxidantes adicionada no óleo, pode ter sido muito alta (0,02g/100g óleo), cerca de 10 vezes maior, potencializando o processo de degradação. Uma proposta para trabalhos futuros é adicionar concentrações menores dos antioxidantes, para observar se estes exercerão efeito protetor no óleo, diferentemente do que foi observado nesta dissertação.

Aplicou-se novamente a técnica do PCA quando houve a adição dos antioxidantes TBHQ e Quercetina, para observar possíveis sobreposições das classes: óleo, óleo +TBHQ , óleo + Quercetina, como mostra a Figura 40.



**Figura 40** – Gráfico dos escores de **Factor 1** versus **Factor 2** das 45 amostras de óleo de linhaça submetido à foto-oxidação com adição dos antioxidantes TBHQ e Quercetina.



Fonte : A autora

Novamente observa-se separação em dois grandes grupos (Figura 40). Os escores mais positivos em **Factor 1** correspondem à amostra de óleo sem a presença de antioxidantes (preto) e os mais negativos pertencem às amostras das classes contendo os antioxidantes TBHQ (azul) e Quercetina (vermelho) que foram aqueles que apresentaram uma maior degradação com o passar do tempo. Observa-se que estes estão agrupados do mesmo lado do gráfico, pois ambos apresentaram resultados semelhantes, não podendo identificar qual possui melhor função.

Todas as técnicas em conjunto confirmaram que os antioxidantes TBHQ e Quercetina não foram efetivos para proteger o óleo da foto-oxidação, ao contrário, potencializaram a degradação, pois ocorreu formação de AGL, peróxidos, dienos conjugados e isomerização, porém os mesmos evitaram a formação de compostos secundários da oxidação, os voláteis como evidenciado pela ausência de sinais na RMN de  $^1\text{H}$ , referentes aos compostos propanal e pentanal evitando o chamado ranço que provoca um aroma desagradável, além disso, não observou-se ligações cruzadas pois o óleo na presença dos antioxidantes após 15 dias de experimento, não polimerizou e não houve mudança na coloração do mesmo.

## 5.5 Análise térmica

A análise térmica foi definida por (SANTOS et al, 2004) como: “Um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é

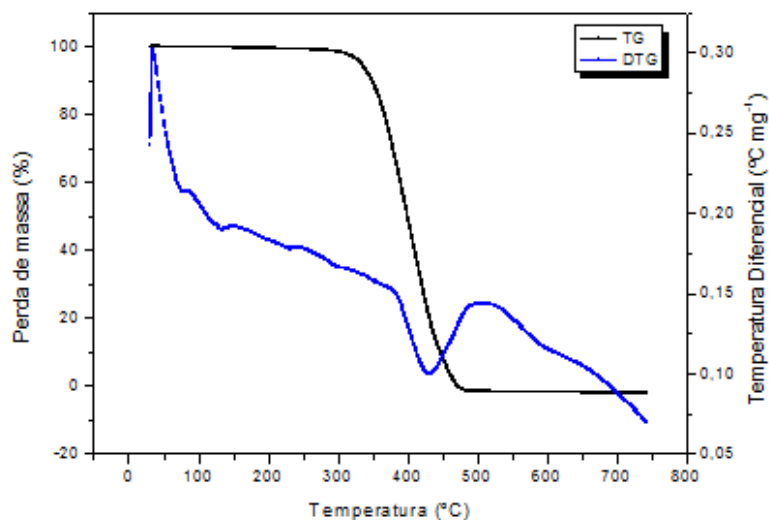
medida, enquanto a amostra é submetida a uma programação de temperatura”. A análise térmica possibilita uma ampla faixa de aplicação para medidas de propriedades físicas, estudo de reações químicas, avaliação da estabilidade térmica, determinação da composição de materiais e desenvolvimento de metodologia analítica (FARIA et al., 2002). Dentre as vantagens dessa técnica destacam-se o uso de pequenas quantidades de amostra, variedade de resultados em um único gráfico e não requer preparo prévio da amostra para o ensaio a ser realizado (MOTHÉ & AZEVEDO, 2002; EYCHENNE, et al, 1998).

O princípio da análise termogravimétrica (termogravimetria - TG) consiste na medição da perda de massa de uma amostra quando esta é aquecida dentro de uma determinada faixa de temperatura (BROWN, 1998). Um programa de aquecimento, com uma taxa de velocidade previamente selecionada é aplicado, enquanto o equipamento monitora a perda de massa através de uma termobalança previamente calibrada. A análise termogravimétrica gera como resultado uma curva de decomposição térmica que fornece os percentuais dos fragmentos de massa perdidos em função da temperatura (CHEN et al, 2003).

A Termogravimetria Derivada (DTG) é a derivada primeira da curva termogravimétrica, ou seja, a derivada da variação de massa em relação ao tempo ou temperatura. As perdas de massa observadas nas curvas TG são substituídas por picos que delimitam as áreas proporcionais às alterações de massa com o aquecimento ou resfriamento da amostra. A curva DTG apresenta as informações de uma forma mais visualmente acessível, mostrando com mais clareza os pontos inicial e final do processo (FERNANDES, 1995). Nas últimas décadas, técnicas termo analíticas têm sido empregadas com o intuito de controlar a qualidade de óleo de gorduras vegetais, e principalmente, de biodiesel, pois fornecem dados sobre a estabilidade destes produtos perante seu comportamento térmico (TOMASSETTI et al., 1991; GARCIA, et al., 2004).

Até o presente momento foi estudado a degradação parcial do óleo, mostrando quais os principais produtos formados durante a oxidação do mesmo, a análise térmica apresenta a decomposição total deste. O comportamento térmico do óleo de linhaça natural foi avaliado por TG e DTG em atmosfera dinâmica de nitrogênio. As curvas obtidas estão ilustradas na Figura 41.

**Figura 41** – Curvas TG/DTG do óleo de linhaça in natura.



Fonte: A autora

Observa-se, na curva TG (Figura 41), que o óleo de linhaça apresenta estabilidade térmica até aproximadamente 290°C. A partir desta temperatura, observa-se o início da degradação térmica em um único evento, com perda de massa de 98,7%, no intervalo de temperatura de 294,1 – 484,8°C, atribuído à volatilização e/ou decomposição dos triacilgliceróis. A perda de massa foi suave até aproximadamente 360,6°C e apresentou máximo da DTG posicionado em 432,8°C, tratando-se de um processo exotérmico característico de reações de oxidação e decomposição.

FONSECA & YOSHIDA, (2009) avaliaram o comportamento térmico do óleo de linhaça natural e envelhecido artificialmente por TG/ DTG e por DTA, e viram que em atmosfera de nitrogênio, as amostras também se decompõem em um único estágio entre 380°C e 490°C, com perda de aproximadamente 95% da massa inicial, diferentemente do que acontece na atmosfera dinâmica de ar sintético onde as amostras reagem com o gás oxigênio e se decompõem em três estágios entre 30°C e 550°C formando 4,5% (massa) de resíduo. A diferença no processo de decomposição está relacionada com a complexidade da matriz e dos mecanismos envolvidos na auto-oxidação do óleo.

## 6. CONCLUSÕES

Através da caracterização inicial do óleo de linhaça pode-se dizer que o mesmo estava íntegro, fazendo com que seja um substrato satisfatório para experimentos de degradação.

No ensaio de foto-oxidação, observou-se que o sistema claro foi eficiente para degradar o óleo, sendo que os parâmetros: *dias* e a interação *luz x dias* apresentaram significância estatística. Houve a formação de compostos de ligações cruzadas como dímeros, polímeros além de substâncias voláteis. A PCA demonstrou a separação em dois grandes grupos, sendo a primeira para a amostra clara, e a segunda representando as amostras escura e natural, confirmando que possuem resultados semelhantes.

Verificou-se que o TBHQ e Quercetina apresentaram atividade de inibição do radical DPPH relativamente alta (97% e 95% respectivamente), podendo ser utilizados no ensaio de foto-oxidação.

A utilização do antioxidantes quercetina e TBHQ não foi eficiente para impedir o processo fotoxidativo, pois não impediram a formação de AGL, nem de peróxidos que são compostos primários da oxidação confirmado pelas técnicas de IA, IP, UV-Vis e IR, porém evitaram a formação de compostos secundários como aldeídos, cetonas e ácidos carboxílicos, como evidenciado pela RMN de  $^1\text{H}$ , evitando ranço, e retardando a reação de polimerização.

A PCA demonstrou novamente a separação em dois grandes grupos, sendo a primeira para a amostra clara, e a segunda representando as amostras que possuem os antioxidantes TBHQ e Quercetina, demonstrando resultados semelhantes, não podendo identificar qual possui melhor função.

A análise térmica demonstrou que o óleo de linhaça apresentou um único evento de degradação, com 98,7% de perda de massa, atribuído a volatilização e/ou decomposição dos triacilgliceróis, sendo um processo exotérmico característico da reação de oxidação e decomposição.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-GHARBIA, H. A.; SHEHATA, A. A. Y.; YOUSSEF, M. M.; SHAHIDI, F. Oxidative stability of extracted sesame oil from raw and processed seeds. **Journal of Food Lipids**, v.3, p. 59-72, 1996.

AFANAS'EV, I.B. et al. Chelating and free radical scavenging mechanism of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 38, p. 1763-1769, 1989.

ALMEIDA-DÓRIA, R. F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 197-203, 2000.

ALVES, C.Q.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; BAHIA, M.V.; AGUIAR, R.M. Métodos Para Determinação De Atividade Antioxidante *In Vitro* Em Substratos Orgânicos. **Quim. Nova**, Vol. 33, No. 10, p.2202-2210, 2010

ANTONIASSI, R. **MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DE ÓLEOS GORDURAS**. B.CEPPA, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 353-380, 2001

ANVISA. RESOLUÇÃO RDC Nº270, DE 22 DE SETEMBRO DE 2005. Disponível em [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/82d8d2804a9b68849647d64600696f00/RDC\\_n\\_270.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/82d8d2804a9b68849647d64600696f00/RDC_n_270.pdf?MOD=AJPERES), acessado em 02/01/13.

ANVISA. RESOLUÇÃO CNS/MS Nº4, DE 24 DE NOVEMBRO DE 1988. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f27b71004745886991f6d53fbc4c6735/04\\_cns.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f27b71004745886991f6d53fbc4c6735/04_cns.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em: agosto de 2013.

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.

AOCS - American Oil Chemists Society. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, 1990.

BACCAN, N.; ANDRADE, J.C.; GODINHO, O.E.S.. **Química Analítica Qualitativa Elementar**. Ed. Edgard Blucher, 3ª edição, 2003.

BAILEY, A. E.; **Industrial Oil and Fat Products**.:5º ed, New York: John Wiley, 1996 vol. 3. In: MELO, M.A.M.F. Avaliação das Propriedades de Óleos Vegetais visando a Produção de Biodiesel. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 118 pgs, 2010.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.; **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2ªed., Ed. Unicamp:Campinas, 2002.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos de tecnologia de alimentos**. Vol. 3, São Paulo, Editora Atheneu, 1998.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Flavonoide Quercetina: Aspectos Gerais EAções Biológicas. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BERSET, C.; CUVELIER, M. E.; Méthodes d` evaluation du degré d` oxydation des lipides et de mesure du pouvoir antioxidant. **Science des Aliments**,1996, v.16, p. 219-245. In: MELO, M.A.M.F. *Avaliação das Propriedades de Óleos Vegetais visando a Produção de Biodiesel*. Dissertação (Mestrado em Química)- UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA. João Pessoa, 118 pgs, 2010.

BICKERT, C.; LÜHS, W.; FRIEDT, W. Variation for fatty acid content and triacylglycerol composition in different *Linum* species.**Ind. Crop. Prod.**, v.2, n.3, p. 229-237, 1994.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 2.ed. São Paulo: Varela, 1992., IN: DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

BOBBIO, Paulo A.; BOBBIO, Florinda Orsati. **Química do Processamento de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A.; KLEINJANS, J.; **Food Chem. Toxicol.**2000, 38, 599.

BOWER, J.A. (1997). Statistic for food science V: comparison of many groups (part A). **Nutrition & Food Science**, n.2, p.78-84, Mar./Apr.

BOZAN, B.; TEMELLI, F. Chemical composition and oxidative stability of flax, safflower and poppy seed and seed oils. **Bioresour. Technol.**, United Kingdom, v.99, n.14, p. 6354-6359. set. 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity, **Lebensm.-Wiss. U.-Technol.**, vol. 28, num. 1, p.25-30, 1995.

BROWN, M.E. **Introduction to Thermal Analysis Thechniques and Applications**, London, Chapman & Hall, 1998, 211.

**CAMPESTRE IND. E COM. DE ÓLEOS VEGETAIS LTDA**. Disponível em <http://www.campestre.com.br/oleo-de-linhaca.shtml>, acessado em 04/01/13.

CARNEIRO, P.I.B.; REDA, S.Y.; BELESKI-CARNEIRO, E.B. <sup>1</sup>H RMN Characterization of seed oils from rangpur lime (*Citrus limonia*) and “sicillian”lemon (*Citrus limon*). **Annals of Magnetic Resonance**.V.4, n.3, p. 64-68, 2005.

CHEN, DZ; HE, PS; PAN, LJ. Cure kinetics of epoxy-based nanocomposites analyzed by Avrami theory of phase change. **Polymer Testing**, v. 22, pgs.689-697, 2003.

CHOE, E.; MIN, D. B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.5, p. 169-186, 2006.

CRUCES-BLANCO, C.; CARRETERO, A.S.; BOYLE, E.M.; GUTIÉRREZ, A.F. The use of dansyl chloride in the spectrofluorimetric determination of the synthetic antioxidant butylated hydroxyanisole in foodstuffs. **Talanta**, v.50, p.1099–1108, 1999.

DANTAS, H. J.; **Estudo Termoanalítico, Cinético e Reológico de Biodiesel Derivado do Óleo de Algodão**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, Programa de Pós-Graduação em Química Analítica, João Pessoa – Paraíba, 122 P. 2006.

DANTAS, M. B., **Blendas de Biodiesel: Propriedades de Fluxo, Estabilidade Termoxidativa e Monitoramento Durante Armazenamento**. Tese (Doutorado em Química) Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 2010.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. **Propriedades Antioxidantes de Compostos Fenólicos**. Visão Acadêmica, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.

DERKSEN, J.T.P.; CUPERUS, F.P. & KOLSTER, P. **Renewable Resources in Coatings Technology: a Review**. Progress in Organic Coatings, Vol. 27, No. 1-4, pgs. 45 -53, 1996.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO; F. M.; Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH.. **Ciênc.Tecnol.Aliment.**, Campinas, 446-452, abr/jun. 2006.

DZIEZAK, J.D. - Fats, oils, and fat substitutes. **Food Technol.**, Chicago, v.43, n.7, p.66-74, 1986.

EYCHENNE, V.; MOULOUGUI, Z.; GASET, A.; Thermal Behavior of Neopentylpolyol Esters - Comparison Between Determination by TGA-DTA and Flash Point. **Thermochimica Acta**, 320: 201, 1998.

FARIA, E. A.; LELES, M. I. G.; IONASHIRO, M.; Z; UPPA, T. O.; ANTONIOSI FILHO, N.R. Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA. **Eclética Química**, São Paulo, v.27, p.111-119. 2002.

FASSINA, P. **Avaliação da degradação do óleo de linhaça e da ação do seu efeito antioxidante através da incidência de radiação UV/Vis**. 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós –Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2011.

FERNANDES, V. J.; **Curso de Análise Térmica (TG, DSC, DTA e TMA)**, UFRN, Natal, 1995.

**FLAX COUNCIL OF CANADA**. Statistics. 2010. Disponível em: <<http://www.flaxcouncil.ca/english/index.jsp?p=statistics2&mp=statistics>>. Acesso em: 04 janeiro de 2013.

FONSECA, M.M. **Estudo do Óleo de Linhaça Natural e Envelhecido Artificialmente em Sistemas Contendo Óxido de Zinco e Dióxido de Titânio**, 2009. 116 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

FONSECA, M.M.; YOSHIDA, M.I.; **Análise térmica do óleo de linhaça natural e oxidado**. VÉRTICES, Campos dos Goytacazes/RJ, v. 11, n. 1/3, p. 61-75, jan./dez. 2009.

FORTES, I. C. P.; **Analytical Pyrolysis and GC/MS of Pyrolysates From Vegetable Oils (and Their Calcium Soaps) Extracted from the Fruit of Macauba Palm (Acrocomia sclerocarpa M.)**. 1994. 277 f. Tese (Doutorado em Química) – Department of Chemistry and Applied Chemistry – University of Salford, 1994.

FRANKEL, E. N., NEFF, W. E., & MIYASHITA, K. **Autoxidation of polyunsaturated triacylglycerols**. II. Trilinolenoylglycerol. *Lipids*, v. 25, p.40–47, 1990.

FRANKEL, E. N. **Recent Advances in Lipid Oxidation**. *Journal of the Sciences of Food and Agriculture*, v.54, p. 495-511, 1991.

FREEDMAN, B. E; BAGBY, M. O. Heat of Combustion of Fatty Esters and Triglycerides. *Journal American Oil Chemists Society*, 1601-1605, 1989.

GALDÁMEZ, E.V.C.; **Aplicação das Técnicas de Planejamento e Análise de Experimentos na Melhoria da Qualidade de um Processo de Fabricação de Produtos Plásticos**. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Escola de Engenharia de São Carlos - Universidade de São Paulo, São Carlos-SP, 2002.

GALVÃO, E.L.; **Extração Supercrítica Do Óleo De Linhaça: Construção Do Extrator, Estudo De Parâmetros De Processo, Avaliação Química E Antioxidante Do Produto**. 2009, 159 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós- Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, 2009.

GAMBARRA NETO, F.F. **Classificação de Óleos Vegetais Utilizando Voltametria de Onda Quadrada e Métodos Quimiométricos**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa – PB, 2008, 117pgs.



GARCIA, J. U.; SANTOS, H. I.; FIALHO, A. P.; GARRO, F. L. T.; FILHO, N. R. A.; LELES, I. G.; Estudo da estabilidade térmica de óleos de peixes em atmosfera de nitrogênio. **Eclética Química**, v. 29, n. 2, p. 41-46, Brasil, 2004.

GORDON, M. H. The development of oxidative rancidity in foods. In: POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. **Antioxidants in food**. England: Woodhead publishing, 2001.

GRAY, J. I. **Measurement of Lipid Oxidation: A Review**. Journal of the American Oil Chemists' Society, v.55, p. 539-546, 1978.

GUILLÉN, M.D.; RUIZ, A. High resolution  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. **Trends in Food Science & Technology**, v.12, p.328-338, 2001.

GUNSTONE, F. D., Chemical properties. In: **The Lipid Handbook**. London, 2007.

HAYWOOD, R. M., CLAXSON, W. D., HAWKES, G. E., RICHARDSON, D. P., NAUGHTON, D. P., COUMBARIDES, G., HAWKES, J., LYNCH, E. J., & GROOTVELD, M. C. **Detection of aldehydes and their conjugated hydroperoxy diene precursors in thermally-stressed culinary oils and fats: investigations using high resolution proton NMR spectroscopy**. Free Radical Research, v. 22, p. 441-482, 1995.

**INMETRO** Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial DOQ – CGCRE – 008. Orientações sobre validação de métodos e ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003. 35p.

JACINTO, K.A. **Efeito do consumo de farinha de linhaça (*Linum usitatissimum L.*) no crescimento de ratos wistar e sua relação com a digestibilidade de globulinas e fatores antinutricionais protéicos nas albuminas**. 2007. 82 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) -Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

JEFFERY, BASSETT, MENDHAM & DENNEY. **Vogel Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

JORGE, N.; GONÇALVES, L. A. G. **Aditivos utilizados em óleos e gorduras de frituras**. Boletim SBCTA, Campinas, v.32, n.1, p.40-47, 1998.

KAHRAMAN, A. et al. Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **J. Nephrol.**, v.16, n.2, p. 219-224, 2003.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E.JR. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. **Adv. Exp. Med. Biol.**, New York, v. 366, p. 351-376, 1994.

KNOTHE, G., Dependence of Biodiesel Fuel Properties on the Structure of Fatty Acid Alkyl Esters. **Fuel Processing Technology**, v. 86, p. 1059-1070, 2005.

LAZZARI, M.; CHIANTORE, O.; Drying and Oxidative Degradation of Linseed Oil. **Polymer Degradation and Stability**, v. 65, n. 2, p. 303 – 313,1999.

LEHNINGER, A. L. & NELSON, D. L. & COX, M. M. - **Princípios de Bioquímica**. São Paulo, Sarvier, 1995, 4ª edição. pp 341-347.

LOPES, R.V.V. **Poliuretanas Obtidas a Partir dos Óleos de Linhaça (*Linum usitatissimum* L.) e Maracujá (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener)-Preparação e Caracterização**. 2009. 83 f.Tese (Doutorado) – Pós- Graduação em Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

LUGASI, A.; HÓVARI, J.; DWORSCHÁK, E. et al. Effect of UV irradiation on lipid peroxidation in edible fats. **Acta Alimentaria**, v.24, n.3, p.269-276, Sep. 1995. In: OLIVEIRA, J. T. G. S. B. **Melhor Dose e Dose Econômica de TBHQ em Óleos de Milho e Canola**. Dissertação (Mestrado) em Ciência pela ESALQ/USP, Piracicaba, 2003.

MADHAVI, D. L.; SALUNKHE, D. K. **Antioxidants**; New York, 1995, p. 89.

MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G.; SKIBSTED, L. H. Antioxidative activity of spices and spices extract. In: RISCH, S. J. e HO, C. **Spices: flavor chemistry and antioxidant properties**. Washington: American Chemical Society, 1997. p. 176-187.

MAHAN, L.K.; ESCOTT-STUMP, S. Krause alimentos, nutrição & dietoterapia. 10 ed. São Paulo: Roca, 2010. Apud: Fassina, P. **Avaliação da degradação do óleo de linhaça e da ação do seu efeito antioxidante através da incidência de radiação UV/Vis**. 2011. 110 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós –Graduação em Ambiente e Desenvolvimento, Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2011.

MANNINA, L.; SOBOLEV, A. P.; SEGRE, A.; Olive oil as seen by RMN and chemometrics, Spectroscopy Europe, mar, 2003.

MARQUETTI, J.M.; MIGUEL, V.U.; ERRAZU, A.F. **Renewable and Sustainable Energy Review**, 11, 1300,2007.

MAYES, P.A. Lipídeos de Importância Fisiológica. In: Harper: Bioquímica, 7 ed. São Paulo: Atheneu, 1994, p. 142-154. Apud: Moreira, A.V.B. **Avaliação da atividade antioxidantes de sementes de mostarda (*Brassica Alba*, L.). – Identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação**. 1999. 120 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós –Graduação em Ciência dos Alimentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

MCCORMICK, R. L.; WESTBROOK, S. R. Storage Stability of Biodiesel and Biodiesel Blends. *Energy Fuels*, 24: 690–698, 2010. IN: DANTAS, M. B., **Blendas de Biodiesel: Propriedades de Fluxo, Estabilidade Termo-oxidativa e Monitoramento Durante Armazenamento**. Tese (Doutorado em Química) Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa 2010.

MELO, E. de A.; GUERRA, N. B. **Ação Antioxidante de Compostos Fenólicos Naturalmente Presentes em Alimentos**. Boletim SBCTA, Campinas, v.36, n.1, p. 1-11, 2002.

MELO, M.A.M.F. **Avaliação das Propriedades de Óleos Vegetais visando a Produção de Biodiesel**. Dissertação (Mestrado em Química)- UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA. João Pessoa, 118 pgs, 2010.

MENDONÇA, M. A. *et al.* **Alterações físico-químicas em óleos de soja submetidos ao processo de fritura em unidades de produção de refeição no Distrito Federal**. Com. Ciências Saúde 2008; V. 19.Nº 2, p.115-122.

MILLS, J. S.; WHITE, R.; **The Organic Chemistry of Museum Objects**. 2. Ed., Oxford: Butterworth Heinemann, 1994. 205 p. In: Fonseca, M.M. Estudo do Óleo de Linhaça Natural e Envelhecido Artificialmente em Sistemas Contendo Óxido de Zinco e Dióxido de Titânio, 2009. 116 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

MORETTO, E. e FETT, R.; **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Varela, 150p, 1998.

MOTHÉ, C. G.; AZEVEDO, A. D. **Análise Térmica de Materiais**. Editora i@ditora, São Paulo, 2002.

NAMIKI, M. **Antioxidants/Antimutagens in food**. CRC- Critical Review in Food Science and Nutrition, v.29, p. 273-300, 1990.

NAWAR, W.W. **Lipids**. In: FENNEMA, O.R. Food Chemistry. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 1996. Cap 5, p. 225-319.

NIJVELDT, R.J *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am.J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 74, p. 418-425, 2001.

OLIVEIRA, A.C.; VALENTIM, I.B.; GOULART, M.O.F.; SILVA, C.A.; BECHARA, E.J.H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 3, 689-702, 2009.

OLIVEIRA, J. T. G. S. B. **Melhor Dose e Dose Econômica de TBHQ em Óleos de Milho e Canola**. Dissertação (Mestrado) em Ciência pela ESALQ/USP, Piracicaba, 2003.

OLSZEWER, E.; NAVEIRA, M. **Radicais livres em medicina esportiva**. São Paulo – SP. Tecnopress Editora e Publicidade Ltda.; 1997.

**OLVEPIN**- INDÚSTRIA DE ÓLEOS VEGETAIS PINDORAMA LTDA. Disponível em <http://www.olvepin.com.br/>, acesso em 04/01/13.

ORDÓÑEZ, J. A. et al. **Tecnologia de alimentos**: componentes dos alimentos e processos. Porto Alegre: Artmed, 2005. v. 1, 294 p.

OZAWA, C. C.; GONÇALVES, L. A. G. Oxidación lipídica y nuevos métodos analíticos de detección. **Aceites e grasas**, 2: 330-338, 2006.

PARKINSON, M.J. **The Potential of NMR Spectroscopy for the Chemical Characterisation of Alkyd Resins in Modern Fine Art**. Imperial College of Science, Technology and Medicine, London UK, 2000.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**. Editora Cengage Learning – São Paulo, 2012.

PITARO, S. P.; JORGE, N.; FIORANI, L. V. **Efeito antioxidante do extrato de manjeriço em óleo de soja sob condições de oxidação**. São José do Rio Preto, 2009.

RAMALHO, Valéria C.; JORGE, Neuza. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, vol. 29, nº 4, 755-760, 2006.

REDA, S.Y., **Estudo comparativo de óleos vegetais submetidos a estresse térmico**. 2004. 154 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2004.

REDA, S.Y.; CARNEIRO, P.I.B. Óleos e gorduras: aplicações e implicações. **Revista Analytica**, N°27,2007, pgs 60-67

REDA, S.Y.; LEAL, E.S.; BATISTA, E.A.C.; BARANA, A.C.; SCHNITZEL, E.; CARNEIRO, P.I.B. **Caracterização dos óleos das sementes de limão rosa (*citrus limonia*) e limão siciliano (*citrus limon*), um resíduo agroindustrial**. *Rev. Ciência e tecnologia de alimentos*. Vol.25, no.4, p.672-676, 2005.

RENCHER, A.C. **Methods of Multivariate Analysis**, John Wiley and Sons, 2.ed, 740p, 2002. RENNEBAUM, H.; GRIMM, E.; WARNSTORFF, K.; DIEPENBROCK, W. Fibre quality of linseed (*Linum usitatissimum* L.) and the assessment of genotypes for use of fibres as a byproduct. **Ind. Crop. Prod.**, v. 16, n.3, p. 201-215, 2002.

RIAHI, J.; MARZOUK, B. Effets de la lumière sur la qualité et la stabilité de quelques huiles végétales: Note préliminaire. **La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse**, v.77, n.1, p.25-30, 2000.

RODRIGUES, V. **Desenvolvimento de nova metodologia para a produção de biodiesel em meio ácido com indução por micro-ondas**. 2008. 117 f. Dissertação (Mestrado)-Programa De Pós-Graduação em Física Ambiental – Universidade Federal de Mato Grosso, Mato Grosso, 2008.

ROVELLINI, P.; CORTESI, N.; FEDELI, E; Ossidazione dei lipic. **La Revista Italiana delle Sostanze Grasse**, v.74, n.5, p.181 – 189, 1997. In: TOLENTINO, M.C.; Avaliação da qualidade de óleos vegetais sob estresse fotoxidativo e termoxidativo por espectroscopia de UV e RMN de <sup>1</sup>H. 2008. 99 f.

SACCHI, R.; PATUMI, M.; FONTANAZZA, G., BARONE, P.; FIORDIPONTI, P., MANNINA, L.; ROSSI, E.; SEGRE, A.L. A High-Field <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Study of the Minor Components in Virgin Olive Oils. **JAACS**, Vol. 73, n. 6, 1996.

SANTOS, J.C.O; SANTOS I.M.G; CONCEIÇÃO, M.M.; PORTO, S.L.; TRINDADE, M.F.S.; SOUZA A.G.; PRASAD, S.; FERNANDES, V.J.; ARAÚJO, A.S.; **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, vol. 75, pg. 419, 2004.

SHYAMALA, B. N.; GUPTA, S.; LAKSHMI, A. J.; PRAKASH, J. Leafy vegetable extracts - antioxidant activity and effect on storage stability of heated oils. **Food Science and Emerging Technologies**, v.6, p. 239-245, 2005.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica e da Capacidade Antioxidante. **Química Nova**, 1999, v. 22, n. 1, p. 94-103.

SILVERSTEIN, R.M; BASSLER, G.C; MORRILL, T.C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5ªed., Guanabara Koogan, R. Janeiro, 1991, 387 páginas.

SIQUEIRA, F.M. **Estabilidade oxidativa de óleos de soja, milho e canola**. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz” Piracicaba, Universidade de São Paulo, 1998. 91p.

SIZER, F.; WHTNEY, E. **Nutrição: conceitos e controvérsias**. Barueri São Paulo. Editora Manole, 133-166, 256-261, 2003.

SMITH, S. A.; KING, R. E.; MIN, D. B. Oxidative and thermal stabilities of genecally modified high oleic sunflower oil. **Food Chemistry**, v.102, p.1208-1213, 2007.

SOARES, S. E.; Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, vol. 15, nº 01, p.71-81, 2002.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B.; **Química Orgânica**. Tradução de Robson Mendes Matos. 8ª. ed., Rio de Janeiro: LTC, 2006. 715 p.

SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N. **Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos**. UNOPAR Científica Ciências Biológicas e Saúde. vol 14, no 4 pgs. 263-269, 2012.

TELES, R.M.; **Caracterização química, avaliação térmica e atividade larvicida frente ao *aedes aegypti* do óleo essencial da *aniba duckei kostermans***. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal Da Paraíba, João Pessoa, 2009, 126 f.

TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C. Quimiometria II: Planilhas Eletrônicas para Cálculos de Planeamentos Experimentais, Um Tutorial. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 2, 338-350, 2006.

TOLEDO, M.C.F.; ESTEVES, W.; HARTMANN, V.E.M. Eficiência de antioxidantes em óleo de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 1985.

TOLENTINO, M.C. ; **Avaliação da qualidade de óleos vegetais sob estresse fotooxidativo e termoxidativo por espectroscopia de UV e RMN de <sup>1</sup>H**. 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

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

VAN DEN BERG, J. D. J.; VAN DEN BERG, K. J.; BOON, J. J.; Identification of Non cross-linked Compound in Methanolic Extracts of Cured and Aged Linseed Oil Based Paint Films Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 950, p. 195 - 211, 2002.

VICETTI, R.; ISHITANI, T.; SALAS, A.; AYALA, M. Use of alpha-tocopherol combined with synergists and compared to other antioxidants on the oxidative stability of sardineskin lipids. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.18, p. 131-137, 2005.

VIGLI, G.; PHILIPPIDIS, A.; SPYROS, A.; DAIS, P. Classification of Edible Oils by Employing <sup>31</sup>P and <sup>1</sup>H NMR Spectroscopy in Combination with Multivariate Statistical Analysis. A Proposal for the Detection of Seed Oil Adulteration in Virgin Olive Oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 5715-5722, 2003.

VOIGT, C.L.; **Síntese e Caracterização espectroscópica de Biocombustível de óleo de fritura**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2009, 95 f.

8. ANEXOS

Anexo A – Estatística do IA para foto-oxidação durante 15 dias.

significancia estatística dos parâmetros (coeficientes)						MQR = 0,0159							
(x' . X) <sup>-1</sup> = B						matriz de covariância							
						V(B)= matriz B * MQR							
0,123	0	-0,0227	0	-0,0523	0,00098	0,00036	0,00196	0	-0,0004	0	-0,0008	1,6E-05	5,8E-06
0	0,04921	0	-0,004761905	0	0	0	0	0,00078	0	-8E-05	0	0	0
-0,0227	0	0,00729	0	1E-17	-0,0004	-1E-19	-0,0004	0	0,00012	0	1,6E-19	-7E-06	-2E-21
0	-0,0048	0	0,000595238	0	0	0	0	-8E-05	0	9,5E-06	0	0	0
-0,0523	0	2,4E-17	0	0,07841	0,00036	-0,0005	-0,0008	0	3,8E-19	0	0,00125	5,8E-06	-9E-06
0,00098	0	-0,0004	0	0,00036	3E-05	-4E-06	1,6E-05	0	-7E-06	0	5,8E-06	4,7E-07	-7E-08
0,00036	0	-2E-19	0	-0,0005	-4E-06	6,6E-06	5,8E-06	0	-3E-21	0	-9E-06	-7E-08	1E-07

coef	erro padrão	k	tem significância
0,3592	+-	0,0875	tem significância
-0,003	+-	0,05535	luz não tem significância
-0,0291	+-	0,02131	dias tem significância
0,02545	+-	0,00609	L*D tem significância
0,08542		0,06986	L^2 tem significância
0,00232		0,00136	D^2 tem significância
0,00141		0,00064	L^2*D^2 tem significância

var	Dp	t128	Dp . T128
0,001955767	0,04422	1,97867	0,0875
0,000782381	0,02797	1,97867	0,05535
0,000115941	0,01077	1,97867	0,02131
9,46429E-06	0,00308	1,97867	0,00609
0,001246685	0,03531	1,97867	0,06986
4,74859E-07	0,00069	1,97867	0,00136
1,04874E-07	0,00032	1,97867	0,00064

R = 0,350 - 0,0030 L - 0,029 D + 0,0254 L\*D + 0,085 L^2 + 0,00232 D^2 + 0,0014 L^2\*D^2

significância estatística da regressão		
Fcalculado	Ftabelado	
Fc = 83,113	Ft= 2,1702	
logo, Fcalc > Ftabel		
F <sub>c</sub> /F <sub>t</sub> > 10		
F <sub>c</sub> /F <sub>t</sub> 38,298		
é significativo pois F <sub>c</sub> /F <sub>t</sub> é maior que 10		

R^2 = SQR/SQT
0,7957
R^2 max = SQT - Sqep/SQT
0,951

significância estatística da falta de ajuste	
Mqfaj/Mqep	F tabelado
7,50192	1,53782
logo, Mqfaj/MQep > Ftabel	
Mqfaj:Mqep / F <sub>t</sub> > 10	
4,87828	falta de ajuste não possui significancia estatistica, indicando que o modelo quadrático pode ser usado.

**Anexo B - Estatística do IP para foto-oxidação durante 15 dias.**

significância estatística dos parâmetros (coeficientes)							MQR = 1493,479						
$(X' \cdot X)^{-1} = B$							matriz de covariância						
							V(B) = matriz B * MQR						
0,123	0	-0,02271062	0	-0,0522719	0,00097867	0,0003635	183,704223	0	-33,918	0	-78,067	1,46162	0,54289
0	0,04920635	0	-0,0047619	0	0	0	0	73,4886492	0	-7,1118	0	0	0
-0,0227	0	0,00729189	0	1,0283E-17	-0,0004309	-1,406E-19	-33,917838	0	10,8903	0	1,5E-14	-0,6436	-2E-16
0	-0,0047619	0	0,00059524	0	0	0	0	-7,1118048	0	0,88898	0	0	0
-0,0523	0	2,3939E-17	0	0,07840785	0,0003635	-0,0005453	-78,066987	0	3,6E-14	0	117,1	0,54289	-0,8143
0,00098	0	-0,00043094	0	0,0003635	2,9865E-05	-4,397E-06	1,46161578	0	-0,6436	0	0,54289	0,0446	-0,0066
0,00036	0	-1,6647E-19	0	-0,0005453	-4,397E-06	6,5958E-06	0,54288586	0	-2E-16	0	-0,8143	-0,0066	0,00985

coef	erro padrão	tem significância
40,0521472	26,8184	<b>k</b> tem significância
-69,43074	16,9623	<b>luz</b> tem significância
5,89223139	6,5297	<b>dias</b> não tem significância
28,5540119	1,8656	<b>L*D</b> tem significância
5,94710011	21,4118	<b>L^2</b> não tem significância
0,09563389	0,41789	<b>D^2</b> não tem significância
1,63466895	0,19638	<b>L^2*D^2</b> tem significância

var	Dp	t128	Dp . T128
183,704223	13,5537531	1,97867082	26,8184158
73,4886492	8,57255208	1,97867082	16,9622587
10,8902863	3,30004337	1,97867082	6,52969953
0,8889756	0,94285502	1,97867082	1,86559973
117,10048	10,8212975	1,97867082	21,4117857
0,04460325	0,21119482	1,97867082	0,41788503
0,00985075	0,09925095	1,97867082	0,19638496

$$R = 40,052 - 69,431 L + 5,892 D + 28,554 L^*D + 5,947 L^2 + 0,095 D^2 + 1,635 L^2*D^2$$

significância estatística da regressão		
Fcalculado	Ftabelado	
698,230196	Ft=	2,17015459
logo, Fcalc > Ftabel		
Fc/Ft > 10		
Fc/Ft	321,742146	
é significativo pois Fc/Ft é maior que 10		

R^2 = SQR/SQT
0,9703524
R^2 max = SQT - Sqep/SQT
0,9990512

significância estatística da falta de ajuste	
Mqfaj/Mqep	F tabelado
71,6384737	1,53782188
logo, Mqfaj/MQep > Ftabel	
Mqfaj.Mqep / Ftabel >10	
46,5843766	falta de ajuste possui significancia estatística, indicando que o modelo quadrático não é o mais indicado.



Anexo C - Estatística do IA para foto-oxidação durante 15 dias utilizando antioxidantes.

significância estatística dos parâmetros (coeficientes)													
(x' . X) <sup>-1</sup> = B						matriz de covariância V(B)= matriz B * MQR							
MQR = 0,0205													
0,18450633	0	-0,0341	0	-0,0784	0,00147	0,00055	0,00378238	0	-0,00069835	0	-0,0016	3E-05	1,1E-05
0	0,07381	0	-0,007142857	0	0	0	0	0,00151	0	-0,0001	0	0	0
-0,0340659	0	0,01094	0	0	-0,0006	0	-0,00069835	0	0,00022423	0	0	-1E-05	0
0	-0,0071	0	0,000892857	0	0	0	0	-0,0001	0	1,8E-05	0	0	0
-0,0784079	0	-9E-17	0	0,11761	0,00055	-0,0008	-0,00160736	0	-1,8738E-18	0	0,00241	1,1E-05	-2E-05
0,001468	0	-0,0006	0	0,00055	4,5E-05	-7E-06	3,0094E-05	0	-1,3251E-05	0	1,1E-05	9,2E-07	-1E-07
0,00054526	0	6,4E-19	0	-0,0008	-7E-06	9,9E-06	1,11778E-05	0	1,303E-20	0	-2E-05	-1E-07	2E-07

significância estatística dos parâmetros (coeficientes)											
var	Dp	t83	Dp . T83	coef	erro padrao	k	tem significância				
0,00378238	0,0615	1,98896	0,12232	0,50659836	+-	0,12232312	tem significância				
0,001513095	0,0389	1,98896	0,07737	-0,0019219	+-	0,0773676	ANTIOX não tem significância				
0,000224226	0,01497	1,98896	0,02978	-0,07695615	+-	0,02978301	DIAS tem significância				
1,83036E-05	0,00428	1,98896	0,00851	-0,00020518	+-	0,0085093	A*D não tem significância				
0,002411041	0,0491	1,98896	0,09766	-0,04472408		0,09766261	A^2 não tem significância				
9,18359E-07	0,00096	1,98896	0,00191	0,007679123		0,00190604	D^2 tem significância				
2,02822E-07	0,00045	1,98896	0,0009	0,005558477		0,00089574	A^2*D^2 tem significância				

$$R = 0,506 - 0,0019 A - 0,0769 D - 0,00021 A^*D - 0,0447 A^2 + 0,00768 D^2 + 0,00556 A^2*D^2$$

significância estatística da regressão			
Fc =	Fcalculado	Ftabelado	Ft =
	230,7067388		2,20991
logo, Fcalc > Ftabel			
	Fc/Ft > 10		
Fc/Ft	104,3963775		
é significativo pois Fc/Ft é maior que 10			

R <sup>2</sup> = SQR/SQT
0,94343122
R <sup>2</sup> max = SQT -Sqep/SQT
0,99828741

significância estatística da falta de ajuste		
Mqfaj/Mqep	F GLfaj:GLep	formula do fator F: = invf(erro; GLfaj, GLep)
83,5595	1,71077	
logo, Mqfaj/MQep > Ftabel		
Mqfaj:Mqep / Ftabel >10		
48,8433		
falta de ajuste possui significancia estatistica, indicando que o modelo quadrático não é o mais apropriado		

**Anexo D - Estatística do IP para foto-oxidação durante 15 dias utilizando antioxidantes.**

significância estatística dos parâmetros (coeficientes)													
$(x' \cdot X)^{-1} = B$						matriz de covariância $V(B) = \text{matriz } B \cdot \text{MQR}$							
MQR = 16595,4													
0,184506333	0	-0,0341	0	-0,0784	0,00147	0,00055	3061,96	0	-565,34	0	-1301,2	24,362	9,04875
0	0,07381	0	-0,0071	0	0	0	0	1224,9	0	-118,54	0	0	0
-0,03406593	0	0,01094	0	0	-0,0006	0	-565,34	0	181,518	0	0	-10,727	0
0	-0,0071	0	0,00089	0	0	0	0	-118,54	0	14,8173	0	0	0
-0,07840785	0	-9E-17	0	0,11761	0,00055	-0,0008	-1301,2	0	-2E-12	0	1951,81	9,04875	-13,573
0,001467998	0	-0,0006	0	0,00055	4,5E-05	-7E-06	24,362	0	-10,727	0	9,04875	0,74344	-0,1095
0,000545256	0	6,4E-19	0	-0,0008	-7E-06	9,9E-06	9,04875	0	1,1E-14	0	-13,573	-0,1095	0,16419

significância estatística dos parâmetros (coeficientes)											
var	Dp	t83	Dp . T83	coef	erro padrao	k	tem significância				
3061,96	55,3349	1,98896	110,059	-261,11	110,059	ANTIOX	tem significância				
1224,9	34,9986	1,98896	69,6107	-120,86	69,6107	DIAS	tem significância				
181,518	13,4729	1,98896	26,797	106,267	26,797	A*D	tem significância				
14,8173	3,84933	1,98896	7,65616	12,7311	7,65616	A^2	tem significância				
1951,81	44,1793	1,98896	87,8709	195,322	87,8709	D^2	tem significância				
0,74344	0,86223	1,98896	1,71494	-3,9755	1,71494	A^2*D^2	tem significância				
0,16419	0,4052	1,98896	0,80594	7,53105	0,80594		tem significância				

$$R = -261,106 - 120,864 A + 106,267 D - 12,731 A^2 + 195,322 A^2 - 3,975 D^2 + 7,531 A^2 D^2$$

significância estatística da regressão			
Fc =	Fcalculado	Ftabelado	Ft=
	1034,96		2,20991
logo, Fcalc > Ftabel			
	Fc/Ft > 10		
	468,328		
é significativo pois Fc/Ft é maior que 10			

$R^2 = \text{SQR}/\text{SQT}$
0,98681
$R^2 \text{ max} = \text{SQT} - \text{Sqep}/\text{SQT}$
0,99991

significância estatística da falta de ajuste		
Mqfaj/Mqep	F GLfaj;GLep	formula do fator F: = invf(erro; GLfaj, GLep)
401,589	1,71077	
logo, Mqfaj/MQep > Ftabel		
Mqfaj/Mqep / Ftabel >10		
234,742		falta de ajuste possui significancia estatistica, indicando que o modelo quadrático não é o mais apropriado