

Atividade antioxidante do α -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado

α -tocopherol and rosemary extract antioxidant activity in purified soybean oil

RIALA6/1055

Valéria C. RAMALHO¹, Neuza JORGE¹

Endereço para correspondência: ¹Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos – IBILCE - UNESP. Rua Cristóvão Colombo, 2265

CEP 15054-000 – São José do Rio Preto-SP. e-mail: valeria_ramalho@yahoo.com.br

Recebido: 01/02/2006 – Aceito para publicação: 24/04/2006

RESUMO

A oxidação lipídica é uma das mais importantes alterações que afetam tanto o óleo ou a gordura assim como o alimento que os contêm, que é responsável pelo desenvolvimento de sabor e odor desagradáveis. A aplicação de antioxidantes, em termos técnicos, é um dos caminhos mais simples para reduzir a oxidação de gorduras. Há indícios de que os antioxidantes sintéticos podem ter efeitos indesejáveis para a saúde humana, o que tem estimulado a busca por antioxidantes naturais como fonte alternativa. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante do extrato de alecrim, contendo 4% de diterpenos fenólicos, em comparação com o α -tocoferol, com 97% de pureza, utilizando como substrato lipídico óleo de soja purificado. A atividade dos antioxidantes foi avaliada nas concentrações de 0, 100, 300, 500, 800 e 1.000 mg/kg para o extrato de alecrim (ALE) e 0, 100, 200, 400, 600 e 700 mg/kg para o α -tocoferol (TOC), por meio da determinação da estabilidade oxidativa utilizando o Rancimat. A ordem da atividade antioxidante encontrada foi 600 mg/kg TOC > 400 mg/kg TOC > 1.000 mg/kg ALE > 200 mg/kg TOC > 800 mg/kg ALE > 500 mg/kg ALE > 100 mg/kg TOC > 300 mg/kg ALE > 100 mg/kg ALE.

Palavras-Chave. antioxidantes, tocoferol, extrato de alecrim.

ABSTRACT

Lipid oxidation is one of the most serious alterations that affect either oil or fat, and some food containing these products, and it is responsible for causing unpleasant taste and smell. On technical terms, the use of antioxidants is one of the easiest ways to reduce the fat oxidation. There are evidences indicating that synthetic antioxidants may have undesirable effects for human health, thence searches for natural antioxidants as an alternative source have been encouraged. The present study aimed to evaluate the rosemary extract antioxidant activity, which contains 4% of phenolic diterpenes, and comparing with 97% pure α -tocopherol, using purified soybean oil as lipid substrate. The antioxidant activity was analyzed in concentrations of 0, 100, 300, 500, 800, and 1,000 mg/kg for rosemary extract (ALE), and of 0, 100, 200, 400, 600, and 700 mg/kg for α -tocopherol (TOC), by means of oxidative stability determination using Rancimat. The observed antioxidant activity ranking was 600 mg/kg TOC > 400 mg/kg TOC > 1.000 mg/kg ALE > 200 mg/kg TOC > 800 mg/kg ALE > 500 mg/kg ALE > 100 mg/kg TOC > 300 mg/kg ALE > 100 mg/kg ALE.

Key Words. antioxidants, tocopherol, rosemary extract.

INTRODUÇÃO

A oxidação lipídica é uma das principais alterações que afetam tanto um óleo ou gordura como um alimento que os contêm. As reações químicas envolvidas nesse processo são muito complexas e geram, em estágios mais avançados,

produtos sensorialmente inaceitáveis¹. A aplicação de antioxidantes, em termos técnicos, é um dos caminhos mais simples para reduzir a oxidação de gorduras².

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria de alimentos são os compostos fenólicos butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona

(TBHQ) e propil galato (PG). Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de esses compostos apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais³. Por esse motivo, o uso de antioxidantes sintéticos é restringido em vários países, visto que existe a possibilidade de terem efeitos indesejáveis para a saúde humana⁴.

Nesse sentido, muitas pesquisas têm sido dirigidas com a finalidade de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos⁵.

Dentre os antioxidantes naturais de maior importância sob o ponto de vista tecnológico, estão os tocoferóis e os extratos de especiarias.

Os tocoferóis estão presentes de forma natural na maioria dos óleos vegetais. Existem quatro tipos: α , β , γ , e δ tocoferol, sendo o α -tocoferol o mais abundante nos alimentos e o de maior atividade biológica como vitamina E⁶.

A atividade antioxidante dos tocoferóis deve-se principalmente a sua capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos, inibindo a oxidação. Contudo, tem sido notado, que a atividade dos tocoferóis *in vitro* depende também de muitas outras possíveis reações paralelas que são drasticamente afetadas por suas concentrações⁷, pela temperatura e luz, pelo tipo de substrato e por outras espécies químicas atuando como pró-oxidante e sinergista no sistema^{8,9}.

Sobre a concentração adequada de cada um dos homólogos, Jung e Min⁷ definiram concentrações ótimas de 100 mg/kg de α , 250 mg/kg de γ e 500 mg/kg de δ tocoferóis para aumentar a estabilidade oxidativa de óleo de soja purificado, armazenado no escuro a 55°C. Os tocoferóis apresentaram significantes efeitos pró-oxidantes em concentrações acima desses níveis. A oxidação foi acompanhada pela determinação de peróxidos.

Para Evans et al.¹⁰, a concentração ótima de tocoferol para inibir a oxidação do óleo de soja também foi 100 mg/kg para α , mas para γ foi maior, 300 mg/kg. Para o δ -tocoferol, não foi observada uma concentração ótima; a oxidação do óleo diminuiu regularmente com o aumento da dosagem de 473 para 1.890 mg/kg. Nesse caso, a oxidação foi acelerada pela manutenção do óleo no escuro a 40, 50 e 60°C e a oxidação foi acompanhada pela formação de dienos conjugados, sendo que o comportamento pró-oxidante foi mais pronunciado com o aumento da temperatura.

Frankel¹¹ também concorda que o α -tocoferol pode atuar como antioxidante ou pró-oxidante, mas afirma que a atividade do α -tocoferol e dos antioxidantes em geral depende não só da concentração, como também do sistema testado, do tempo de oxidação e do método usado para acompanhar a oxidação. Para esse pesquisador, em altas concentrações, o α -tocoferol promove a formação dos hidroperóxidos, mas inibe a decomposição deles.

Os experimentos envolvendo a característica das especiarias em inibir a oxidação se iniciaram nos anos 50. Nessa

época, pesquisadores constataram o aumento da estabilidade de óleos adicionados de uma variedade de especiarias e condimentos¹². Dentre as especiarias, o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é uma das que apresenta maior poder antioxidante. Os compostos responsáveis pela atividade antioxidante do alecrim são principalmente diterpenos fenólicos, como carnosol, ácido carnósico, rosmanol, epirosmanol e isorosmanol¹³.

O efeito antioxidante do alecrim deve-se, principalmente, à capacidade dos constituintes fenólicos de doar hidrogênio para os radicais livres, formando radicais estáveis, e também em parte à capacidade de sequestrar radicais superóxidos ($O_2^{\bullet-}$)⁴.

Muitos extratos de alecrim para uso em sistemas alimentícios estão hoje disponíveis no mercado, principalmente na Europa e Estados Unidos, onde, segundo consta, o alecrim representa cerca de 40 a 50% dos antioxidantes naturais comercializados¹⁴. No Brasil, o alecrim é classificado como aroma natural, sendo aplicado principalmente em produtos cárneos, pratos prontos e biscoitos.

Estudos têm sido conduzidos com o propósito de examinar a atividade antioxidante do alecrim na forma natural e sob a forma de extrato, em comparação com outros antioxidantes. Nesse sentido, em pesquisa realizada por Basaga et al.¹⁵, foi observado que a presença de 100 mg/kg de alecrim em óleos de soja e milho, armazenados a 30°C, preveniu a autooxidação, mas foi menos eficiente que o BHT nos dois óleos. A atividade antioxidante foi acompanhada pela determinação de peróxidos.

Almeida-Doria e Regitano-D'Arce⁴ avaliaram a ação antioxidante de extrato etanólico de alecrim em óleo de soja submetido a testes de oxidação acelerada em estufa a 60°C, comparando-o com os antioxidantes sintéticos TBHQ e BHA + BHT. Verificou-se que os compostos empregados retardaram a oxidação do óleo, entretanto, o extrato natural não atingiu a eficiência do TBHQ, mas foi tão efetivo quanto a mistura BHA + BHT.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante do extrato de alecrim em comparação com o α -tocoferol, utilizando óleo de soja purificado como substrato lipídico.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Para a realização do experimento foram utilizados óleo de soja refinado sem adição de antioxidantes, α -tocoferol com 97% de pureza, marca Sigma Aldrich e extrato de alecrim comercial marca GuardianTM tipo 40 fabricado pela empresa Danisco S/A contendo, segundo informações do fabricante, 4% de diterpenos fenólicos.

O óleo de soja foi purificado com alumina segundo o método descrito por Steel¹⁶, com o objetivo de se determinar a influência apenas do α -tocoferol e do extrato de alecrim adicionados sobre a alteração do substrato lipídico, sem a

influência de compostos minoritários não controlados, normalmente presentes nos óleos, com possíveis efeitos antioxidantes ou pró-oxidantes. A eficiência do procedimento de purificação foi verificada por meio da determinação da estabilidade oxidativa, teor de compostos polares totais, índice de peróxidos, teores de dienos conjugados e tocoferóis totais do óleo de soja, antes e após o processo de purificação. Esse óleo isento de tocoferóis teve a adição dos antioxidantes naturais α -tocoferol ou extrato de alecrim nas concentrações apresentadas na Tabela 1.

Todos os tratamentos foram conduzidos em duas repetições. A atividade dos antioxidantes foi avaliada por meio da determinação da estabilidade oxidativa utilizando o Rancimat.

Métodos analíticos

Estabilidade oxidativa, expressa em horas e determinada pelo método AOCS Cd 12b-92¹⁷, utilizando o Rancimat que é baseado na determinação da condutividade elétrica dos produtos voláteis de degradação. A determinação foi realizada a 100°C, com fluxo de ar de 20 L/h, utilizando 3 g de amostra e volume de água destilada de 60 mL nos frascos contendo os eletrodos.

Compostos polares totais, expressos em porcentagem e determinados pelo método cromatográfico proposto por Dobarganes et al.¹⁸. A base do método é a separação da amostra de óleo, utilizando cromatografia de adsorção, em duas frações de diferentes polaridades que podem ser determinadas gravimetricamente.

Índice de peróxidos, expresso em miliequivalentes de oxigênio ativo por kg de óleo, conforme método AOCS Cd 8-53¹⁷.

Dienos conjugados, expressos como porcentagem de ácidos dienóicos conjugados e determinados pelo método AOCS Ti 1a-64¹⁷.

Tocoferóis totais, expressos em mg/kg e determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência, seguindo o método AOCS Ce 8-86¹⁹.

Delineamento experimental

O experimento foi realizado no delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos (concentrações de 0, 100, 300, 500, 800 e 1.000 mg/kg para o extrato de alecrim e de, aproximadamente, 0, 100, 200, 400, 600 e 700 mg/kg para o α -tocoferol) e duas repetições²⁰.

Tabela 1. Concentrações de antioxidantes adicionadas ao óleo purificado.

Tratamento	Antioxidante	Concentração (mg/kg)
A	Extrato de alecrim	0
B		100
C		300
D		500
E		800
F		1.000
G	α -tocoferol	0
H		100
I		200
J		400
K		600
L		700

Os resultados obtidos da estabilidade oxidativa foram submetidos à análise de variância para determinar a influência dos tratamentos na estabilidade dos óleos adicionados de antioxidantes, medida por meio do Rancimat.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo obtido após a purificação com alumina foi analisado quanto a sua estabilidade oxidativa, teor de compostos polares totais, índice de peróxidos, teores de dienos conjugados e de tocoferóis. A Tabela 2 mostra a média e o desvio padrão dos valores encontrados.

Como pode ser observado na Tabela 2, com relação à estabilidade oxidativa, houve uma drástica redução, 97% do teor inicial, evidenciando a eficácia da purificação com alumina para a retirada dos antioxidantes naturais. Barrera-Arellano et al.²¹, utilizando o mesmo procedimento para a remoção de tocoferóis, conseguiram 88% de redução da estabilidade oxidativa de óleo de soja, medida pelo Rancimat nas mesmas condições deste estudo. Romero et al.⁹ conseguiram reduzir em 89% o período de indução medido pelo Rancimat também a 100°C após submeter o óleo de avelã chilena (*Gevuina avellana* Mol) ao mesmo procedimento para remoção de tocoferóis. A grande diferença na estabilidade entre o óleo purificado e o não purificado enfatiza a importância dos compostos que não são triacilgliceróis como inibidores naturais da oxidação de óleos vegetais²².

Tabela 2. Caracterização do óleo de soja antes e após purificação com alumina.

Determinações Analíticas	Óleo de soja antes da purificação	Óleo de soja após a purificação
Estabilidade Oxidativa (horas)	17,08 \pm 0,11	0,48 \pm 0,09
Compostos Polares Totais (%)	1,98 \pm 0,07	0,12 \pm 0,01
Índice de Peróxidos (meq/kg)	0,70 \pm 0,01	1,29 \pm 0,01
Dienos Conjugados (%)	0,26 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01
Tocoferóis Totais (mg/kg)	1.058 \pm 13	< 0,2

A purificação mostrou-se também muito eficiente na remoção de compostos polares, uma vez que estes foram quase totalmente eliminados, com uma redução de 94% do teor inicial. Steel¹⁶ reduziu em 47% o teor de compostos polares após aplicar o mesmo procedimento para também purificar óleo de soja submetido a termoxidação.

Com relação ao índice de peróxidos, não foi encontrada a esperada redução como a observada por Souza²³, que, por meio da purificação da oleína de palma com alumina, reduziu o índice de peróxidos de 0,72 para 0,43 meq/kg. Vale salientar que, naquele trabalho, os tocoferóis não foram completamente removidos, restando 74,9 mg/kg.

Os dienos conjugados também foram parcialmente removidos, com uma redução de 11% do teor inicial e não foram encontrados tocoferóis nas amostras de óleo purificado, o que confirmou a eficácia do procedimento para a retirada desses compostos. Barrera-Arelano et al.²¹ e Steel¹⁶ também não detectaram tocoferóis em óleo de soja após utilizar o mesmo procedimento para remoção desses antioxidantes naturalmente presentes no óleo.

O período de indução (também chamado de índice de estabilidade oxidativa) é um parâmetro comparativo muito utilizado para se avaliarem diferentes tipos de óleos para fritura, alteração na composição em ácidos graxos, eficiência da adição de antioxidantes, entre outros²⁴. O aparelho Rancimat é uma versão automática do teste AOM (Active Oxygen Method) que determina a estabilidade oxidativa em óleos. Nesse equipamento, induz-se a oxidação de uma amostra de óleo, que é mantida sob temperatura e fluxo de ar constantes. Os produtos voláteis gerados com a oxidação são recolhidos em água destilada, cujo aumento de condutividade elétrica, detectada por eletrodos, gera um gráfico em que se visualiza o período de indução em horas^{24, 25}.

Para avaliar a concentração mais efetiva de cada um dos antioxidantes testados, bem como uma possível ação pró-oxidante, foram aplicadas concentrações de 0, 100, 300, 500, 800 e 1.000 mg/kg de extrato de alecrim ou de 0, 100, 200,

400, 600 e 700 mg/kg de α -tocoferol no óleo de soja purificado e a medida da estabilidade oxidativa foi verificada pelo Rancimat a 100°C. O limite de 1.000 mg/kg para o extrato de alecrim foi definido por ser esse o máximo valor recomendado pelo fabricante do produto. As concentrações utilizadas para o α -tocoferol, foram baseadas em estudos anteriores^{26, 26, 28, 29, 30}.

Por meio da análise de variância para a determinação da estabilidade oxidativa do óleo de soja purificado adicionado de alecrim ou de α -tocoferol observou-se que, o teste F foi significativo ($P < 0,01$) para o efeito Concentrações tanto para o extrato de alecrim quanto para o α -tocoferol. As Tabelas 3 e 4 mostram o resultado das médias submetidas ao teste de Tukey para o alecrim e α -tocoferol, respectivamente.

Com relação às concentrações adicionadas de extrato de alecrim, verifica-se, pela Tabela 3, que a concentração de 100 mg/kg não demonstrou ação antioxidante, já que não houve diferença significativa entre os valores da estabilidade das amostras com 0 e 100 mg/kg de antioxidante. Verifica-se, porém, que houve diferença significativa entre os valores da estabilidade oxidativa no intervalo de 300 a 1.000 mg/kg e que tais valores aumentaram com o aumento da dosagem, não demonstrando, portanto, efeito pró-oxidante. Esse resultado está de acordo com o que tem sido verificado por alguns pesquisadores; a atividade antioxidante do extrato de alecrim tem aumentado com o aumento da concentração na faixa de 300 a 1.000 mg/kg³¹.

No caso das concentrações de α -tocoferol adicionadas, houve diferença significativa entre os valores da estabilidade oxidativa no intervalo de 0 a 600 mg/kg e eles também aumentaram com o aumento da concentração, não apresentando, dessa forma, a característica pró-oxidante relatada pela literatura^{10, 7}.

Esse fato pode ser justificado pelo uso de diferentes métodos para acompanhar a oxidação, visto que, segundo Evans et al.¹⁰, a aparente relação entre a concentração de tocoferol e sua atividade antioxidante pode ser influenciada pelo método analítico usado para determinar a extensão e o ponto final da

Tabela 3. Estabilidade oxidativa (horas) do óleo de soja purificado adicionado de diferentes concentrações de extrato de alecrim.

Antioxidante	Concentrações (mg/kg)					
	0	100	300	500	800	1.000
Alecrim	0,48 ^e	0m,67 ^e	1,69 ^d	2,96 ^c	5,07 ^b	6,02 ^a

a, b ... (linha) - médias de Concentrações seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Tabela 4. Estabilidade oxidativa (horas) do óleo de soja purificado adicionado de diferentes concentrações de α -tocoferol.

Antioxidante	Concentrações (mg/kg)					
	0	100	200	400	600	700
α -tocoferol	0,48 ^e	2,65 ^d	5,42 ^c	6,78 ^b	7,70 ^a	7,71 ^a

a, b ... (linha) - médias de Concentrações seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

oxidação; no presente trabalho, foi utilizado o Rancimat a 100°C, enquanto os pesquisadores citados utilizaram a determinação de peróxidos e dienos conjugados com oxidação acelerada a 50°C. Esse fator tem contribuído para as opiniões conflitantes em trabalhos publicados considerando as concentrações necessárias para estabilizar óleo de soja; vale salientar, inclusive, que as concentrações ótimas de α -tocoferol para inibir a oxidação pela formação ou decomposição de hidroperóxidos são contraditórias²⁸.

Verifica-se, ainda, pela Tabela 4, que não houve diferença significativa na estabilidade oxidativa das amostras com 600 e 700 mg/kg de α -tocoferol.

O efeito de um antioxidante é chamado Fator de Estabilização e é expresso como a razão entre o período de indução de um óleo na presença do antioxidante e o período de indução do mesmo óleo na ausência do antioxidante³². Quanto maior o valor do Fator de Estabilização, melhor a atividade antioxidante³³.

Na Tabela 5, são apresentados os Fatores de Estabilização para todas as concentrações dos antioxidantes testadas no presente trabalho.

Verifica-se, pelos valores do Fator de Estabilização da Tabela 5, que o extrato de alecrim foi eficiente em retardar a oxidação, mas o α -tocoferol foi melhor. Por outro lado, ao avaliar o Fator de Estabilização de 400 mg/kg de extrato de alecrim e a mesma concentração de α -tocoferol em óleo de soja natural, Lalas e Dourtoglou²⁹ encontraram maior valor para o extrato de alecrim do que para α -tocoferol: 1,86 e 1,04, respectivamente. Sobre isso, Chen et al.³⁴ afirmaram que o nível de proteção contra oxidação é diferente entre os extratos de alecrim e depende do método de extração, estando intimamente relacionado com o teor de diterpenos fenólicos.

Em pesquisa realizada por Bauman et al.³⁵, a concentração dos diterpenos fenólicos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em extratos de alecrim comercialmente disponíveis variou de 2,8 a 22,5%, sendo que a atividade antioxidante dos extratos dependeu

Tabela 5. Fator de Estabilização para os antioxidantes testados em óleo de soja purificado.

Concentrações mg/kg	Fator de Estabilização (F)	
	extrato de alecrim	α -tocoferol
100	1,40	5,52
200		11,29
300	3,52	
400		14,13
500	6,17	
600		16,04
700		*
800	10,56	
1.000	12,54	

* Não houve diferença significativa na estabilidade oxidativa das amostras com 600 e 700 mg/kg de α -tocoferol.

diretamente da concentração desses compostos. Em estudo realizado por Schwarz et al.³⁶, os 100 mg/kg de extrato de alecrim adicionados em banha, utilizada como substrato lipídico por ter conteúdo de antioxidantes naturais extremamente baixo, aumentaram o período de indução, obtido através do Rancimat a 100°C, de 2 horas para 5,8 a 16 horas, conforme a concentração de diterpenos fenólicos do extrato que variou de 2,78 a 22,49%.

Vale ressaltar que o α -tocoferol utilizado no presente trabalho tem pureza de 97%, enquanto o extrato de alecrim tem 4% de diterpenos fenólicos. A eficácia tanto do extrato de alecrim quanto do carnosol e do ácido carnósico também é significativamente influenciada pelo tipo de sistema testado (óleo ou emulsão), tipo de óleo como substrato (milho, soja, amendoim, peixe), método usado para acompanhar a oxidação (formação de dienos conjugados, hexanol ou propanol) e concentração utilizada para os antioxidantes³⁷. Lalas e Dourtoglou²⁹ observaram que a proteção antioxidante do extrato também pode ser influenciada pelo efeito sinérgico entre os componentes; contudo, o mecanismo deste sinérgico é ainda desconhecido.

No presente estudo, com base na estabilidade oxidativa encontrada e no Fator de Estabilização, a ordem da atividade antioxidante foi 600 mg/kg TOC > 400 mg/kg TOC > 1.000 mg/kg ALE > 200 mg/kg TOC > 800 mg/kg ALE > 500 mg/kg ALE > 100 mg/kg TOC > 300 mg/kg ALE > 100 mg/kg ALE.

O Fator de Estabilização mais alto para o α -tocoferol e para o extrato de alecrim foi na concentração de 600 e 1.000 mg/kg, respectivamente.

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos concluiu-se que:

O extrato de alecrim, com 4% de diterpenos fenólicos, demonstrou ter efeito protetor sobre o óleo de soja contra a oxidação, quando aplicado nas concentrações de 300 a 1.000 mg/kg, mas o α -tocoferol, com 97% de pureza, aplicado nas concentrações de 100 a 700 mg/kg, foi mais eficiente.

Dentre as concentrações avaliadas, 600 mg/kg de α -tocoferol e 1.000 mg/kg de extrato de alecrim promoveram maior estabilidade oxidativa ao óleo de soja purificado medida por meio do Rancimat.

Tanto o α -tocoferol quanto o extrato de alecrim não demonstraram efeito pró-oxidante nos níveis testados.

A adição de extrato de alecrim ao óleo de soja mostrou efeito positivo sobre a estabilidade oxidativa desta matéria-prima e poderia ser indicado como antioxidante alternativo na conservação de óleos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às empresas Cargill Agrícola S.A. e Danisco S/A pelas amostras de óleo e extrato de alecrim.

REFERÊNCIAS

1. Lima J R, Gonçalves L A G Avaliação analítica de óleos utilizados em processo de fritura. *Bol SBCTA* 1995; 29: 186-92.
2. Karpinska M, Borowski J, Danowska O M The use of natural antioxidants in ready-to-serve food. *Food Chem* 2001; 72: 5-9.
3. Botterweck A A, Verhagen H, Goldbohm R A, Kleinjans J, Brandt P A Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the netherlands cohort study. *Food Chem Toxicol* 2000; 38: 599-605.
4. Almeida-Doria R F, Regitano-D'Arce M A B Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. *Ciênc Tecnol Aliment* 2000; 20: 01-14.
5. Soares S E Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr* 2002; 15: 1-13.
6. Kamal-Eldin A, Appelqvist L A The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids* 1996; 31: 671-701.
7. Jung M Y, Min D B Effects of α , γ , e δ tocopherols on oxidative stability of soybean oil. *J Food Sci* 1990; 55: 1464-5.
8. Kochhar S P Stabilization of frying oils with natural antioxidative components. *Eur J Lipid Sci Technol* 2000; 102: 552-9.
9. Romero N et al. Effect of α -tocopherol and α -tocotrienol on the performance of chilean hazelnut oil (*Gevuina avellana* Mol) at high temperature. *J Sci Food Agric* 2004; 84: 943-8.
10. Evans J C, Kodali D R, Addis P B Optimal tocopherol concentration to inhibit soybean oil oxidation. *J Am Oil Chem Soc* 2002; 79: 47-51.
11. Frankel E N Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chem* 1996; 57: 51-5.
12. Chipault J R, Mizuno G R, Lundberg W O Antioxidants properties of spices in oil-in-water emulsions. *Food Res* 1955; 20: 443-8.
13. Cuvelier M E, Berset C, Richard H Antioxidant constituents in sage. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 665-9.
14. Valenzuela A B, Sanhueza J, Nieto S Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. *Grasas y Aceites* 2003; 54: 295-303.
15. Basaga H, Acikel F, Tekkaya C Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. *Lebensm Wissens Technol* 1997; 30: 105-8.
16. Steel C J Gorduras vegetais hidrogenadas: produtos da termoxidação e ação antioxidante dos tocoferóis [Tese de Doutorado] Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2002. 234 p.
17. American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. *Methods Cd 12b-92, Cd 8-53, Ti 1a-64*: Campaign USA; 1993.
18. Dobarganes M C, Velasco J, Dieffenbacher A Determination of polar compounds, polymerized and oxidized triacylglycerols, and diacylglycerols in oils and fats. *Pure Appl Chem* 2000; 72: 1563-75.
19. American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. *Method Ce 8-86*: Campaign USA; 1998.
20. Gomes F P Curso de estatística experimental, 14. ed. Piracicaba: Editora Nobel; 2000. 477 p.
21. Barrera-Arellano D, Ruiz-Méndez V, Velasco J, Márquez-Ruiz G, Dobarganes C Loss of tocopherols and formation of degradation compounds at frying temperatures in oils differing in degree of unsaturation and natural antioxidant content. *J Sci Food Agric* 2002; 82: 1696-702.
22. Fuster M A, Lampi A M, Hopia A, Kamal-Eldin A Effects of α and γ -tocopherols on the autoxidation of purified sunflower triacylglycerols. *Lipids* 1998; 33: 715-22.
23. Souza W S M Termoxidação de gorduras animais [Dissertação de Mestrado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2001. 79 p.
24. Antoniassi R Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. *BCPPA* 2001; 19: 353-80.
25. Lima J R, Gonçalves L A G Parâmetros de avaliação da qualidade de óleo de soja utilizado para fritura. *Quím Nova* 1994; 17: 392-6.
26. Cuesta P J M, Martínez E R, Chaparro M G Enranciamiento oxidativo de aceites vegetales in presencia de α -tocoferol. *Grasas y Aceites* 1995; 46: 349-53.
27. Frankel E N, Huang S W, Prior E, Aeschbach R Antioxidant activity of a rosemary extracts and its constituents, carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid, in bulk oil and oil-in-water emulsion. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 131-5.
28. Huang S W, Frankel E N, German J B Antioxidant activity of α and γ tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions. *J Agric Food Chem* 1994; 42: 2108-14.
29. Lalas S, Dourtoglou V Use of rosemary extract in preventing oxidation during deep-fat frying of potato chips. *J Am Oil Chem Soc* 2003; 80: 579-83.
30. Rizner-Hras A, Hadolin M, Knez Z, Bauman D Comparison of antioxidative and synergistic effect of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food Chem* 2000; 71: 229-33.
31. Gordon M H, Kourimská L Effect of antioxidants on losses of tocopherols during deep-fat frying. *Food Chem* 1995; 52: 175-7.
32. Yanishlieva N V, Marinova E M Antioxidative effectiveness of some natural antioxidants in sunflower oil. *Z Lebensm Unters Forsch* 1996; 203: 203-23.
33. Elizabete B E, Bressa F, Rosa M D Antioxidative action of maillard reactions volatiles: influence of maillard solution level. *J Am Oil Chem Soc* 1992; 69: 331-4.
34. Chen Q, Shi H, Ho C T Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxigenase activity. *J Am Oil Chem Soc* 1992; 69: 999-1002.
35. Bauman D, Hadolin M, Rizner-Hras A, Knez Z Supercritical fluid extraction of rosemary and sage antioxidants. *Acta Aliment* 1999; 28: 15-28.
36. Schwarz K, Ternes W, Schmauderer E Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. III. Stability of phenolic diterpenes of rosemary extracts under thermal stress as required for technological processes. *Z Lebensm Unters Forsch* 1992; 195: 104-7.
37. Frankel E N, Huang S, Prior E, Aeschbach R Evaluation of antioxidant activity of rosemary extracts, carnosol and carnosic acid in bulk vegetable oils and fish oil and their emulsions. *J Sci Food Agric* 1996; 72: 201-8.