

# Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva-doce em sistemas aquoso e lipídico

## *Antioxidant activity of mustard, cinnamon and anise in lipidic and aqueous systems*

### ABSTRACT

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI FILHO, J. Antioxidant activity of mustard, cinnamon and anise in lipidic and aqueous systems. *Nutrir e: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.* = J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP, v.25, p. 31-46, jun., 2003.

*This study sought to investigate the antioxidant profile of phenolic compounds present in extracts of cinnamon, anise and mustard tested in aqueous and lipidic systems, with the purpose to observe the influence of each mellieu on the assessment of antioxidant activity. Etheric, alcoholic and aqueous extracts of cinnamon, anise and mustard were obtained in sequential extraction form and used in two model systems: one aqueous and the other one lipidic. In the aqueous model the antioxidant activity was measured by means of the  $\beta$ -carotene/linoleic acid system, where the 200ppm aqueous mustard extract displayed the best protection against oxidation process with an average of 70%. In the lipidic system, 5g of soybean oil without additives was used, where aliquots of the extract were added to obtain concentrations of 100 and 200ppm and then left overnight in the RANCIMAT, equipment at a temperature of 110°C and gas flow of 20L/h. The results of oil-induced conductivity were expressed as percentage, on the basis of the negative control as being of 5.99 hours (100%). The etheric and aqueous extracts of mustard at 100ppm presented the best induction time (7.42h and 7.16h, respectively representing increases of 23.89% and 19.63% when compared to the control period), both longer than the positive control and showing no significant difference ( $p < 0.05$ ) when compared to the alcoholic extract of anise. RANCIMAT, lipidic system is the most suitable for the industrial needs to evaluate the stability of oils and fats.*

**Keywords: mustard; cinnamon; anise; antioxidant activity; RANCIMAT**

**ANA VLÁDIA BANDEIRA MOREIRA<sup>1</sup>; JORGE MANCINI FILHO<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Depto. de Alimentos e Nutrição Experimental/ FCF Universidade de São Paulo

**Endereço para correspondência:**

Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bl. 14, Conj. Químicas. Cidade Universitária. CEP 05508-900

e-mail: avbm@usp.br e jmancini@usp.br

Parte da tese: efeito oxidante de compostos fenólicos de especiarias sobre os ácidos graxos das séries  $\omega E$  e  $\omega 6$ . Trabalho apresentado na FeSBE 2001, realizado em Caxambu/MG

**Agradecimentos**

Ao Programa PICDT/UFRN pela bolsa concedida e à FAPESP pelo apoio financeiro na realização de parte do projeto.

## RESUMEN

*Este estudio se refiere al comportamiento antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en extractos de canela, anís y mostaza analizados en sistemas acuoso y oleoso, con el objetivo de observar la influencia de cada sistema en la actividad antioxidante. Los extractos de los condimentos arriba citados fueron preparados en forma secuencial: etéreo, alcohólico y acuoso en dos sistemas modelo: acuoso y oleoso. En el modelo acuoso, la actividad antioxidante fue medida a través del método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico y fue verificado que 200ppm del extracto acuoso de la mostaza presentó la mejor protección contra la oxidación con un promedio de 70%. En el modelo oleoso, fueron utilizados 5g de aceite de soya sin aditivos, al cual se adicionaron alícuotas de los extractos, para obtener concentraciones de 100 y 200ppm y enseguida colocados en el aparato llamado RANCIMAT a una temperatura de 110°C overnight, con un flujo de gas de 20L/h. Los resultados de la conductividad inducida por el aceite fueron expresados en porcentaje, teniendo como base el control negativo correspondiendo a 5,99 horas (100%). Los extractos: etéreo y acuoso de la mostaza a 100 ppm presentaron los tiempos de inducción más altos, con 7,2h (23,89% de aumento del tiempo del control) y 7,16h (19,63%), respectivamente, siendo ambos superiores al control positivo y sin diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) del extracto alcohólico del anís. El sistema oleoso RANCIMAT es el más adecuado para la necesidad industrial de evaluación de estabilidad de aceites y grasas.*

**Palabras clave: mostaza; canela; anís; actividad antioxidante; RANCIMAT**

## RESUMO

*Este estudo refere-se ao comportamento antioxidante dos compostos fenólicos presentes em extratos das especiarias canela, erva-doce e mostarda testados em sistema aquoso e lipídico com o objetivo de observar a influência de cada sistema na avaliação da atividade antioxidante. Os extratos obtidos de forma seqüencial foram: etéreo, alcoólico e aquoso da canela, erva-doce e mostarda, os quais foram utilizados nos dois sistemas modelos. No modelo aquoso a atividade antioxidante foi medida através do método  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico, onde foi verificado que 200ppm do extrato aquoso da mostarda apresentou a melhor proteção contra a oxidação com média de 70%. No modelo lipídico, foi utilizado 5g de óleo de soja sem aditivos, onde alíquotas dos extratos foram adicionadas para se obter concentrações de 100 e 200ppm e em seguida colocados no aparelho RANCIMAT, a uma temperatura de 110°C overnight, com um fluxo de gás de 20L/h. Os resultados da condutividade induzida pelo óleo foi expresso em porcentagem, tomando-se como base o controle negativo como sendo 5h99 (100%). Os extratos etéreo e aquoso da mostarda a 100ppm apresentaram os maiores tempos de indução com 7h42 (23,89% de aumento no tempo do controle) e 7h16 (19,63%), respectivamente, ambos superiores ao controle positivo e sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do extrato alcoólico da erva-doce. O sistema lipídico RANCIMAT, é o que se aproxima mais das necessidades da avaliação industrial na estabilidade de óleos e gorduras.*

**Palavras-chave: mostarda; canela; erva-doce; atividade antioxidante; RANCIMAT**

## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a preocupação constante de proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade levou a adoção de medidas que permitem reduzir a oxidação durante as fases de processamento e armazenamento dos produtos (por exemplo, escolha de processos que limitem as operações de arejamento e do tratamento térmico; utilização de matérias-primas refinadas, com baixos teores de água e isentas de pró-oxidantes; armazenamento a baixas temperaturas e em atmosfera inerte; adição de compostos antioxidantes; utilização de embalagens inertes e opacas à radiação UV, etc.). Deste conjunto de ações, a adição de compostos antioxidantes é, sem dúvida, uma prática corrente, razão que justifica o atual interesse pela pesquisa de novos compostos com capacidade antioxidante. O baixo custo de obtenção, facilidade de emprego, eficácia, termo-resistência, “neutralidade” organoléptica e ausência reconhecida de toxicidade, são premissas para a sua seleção e utilização ao nível industrial (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992).

Antioxidantes dietéticos podem ser efetivos na limitação do processo oxidativo em sistemas *in vivo*, e muitos antioxidantes têm sido encontrados em ervas e especiarias. A atividade antioxidante de muitas especiarias, seqüestradoras de radicais livres, foi determinada pela formação de malonaldeído (MDA) da 2-deoxiribose e na hidroxilação de benzoato (OYA et al., 1997). A maior justificativa do uso de antioxidantes é o aumento do tempo de prateleira dos alimentos, reduzindo as perdas nutricionais pela diminuição do processo oxidativo (SCHULER, 1990).

Certas especiarias e seus extratos de especiarias contêm componentes com atividade antioxidante; deste fato decorre a aplicabilidade destas em diferentes preparações culinárias para intensificar as características organolépticas, aumentar a aceitabilidade e principalmente, melhorar a estabilidade oxidativa de produtos cárneos cozidos. Os componentes responsáveis pela estabilidade oxidativa têm sido identificados em várias especiarias, tais como, o alecrim, sálvia, tomilho, cravo-da-índia, dentre outras, estas apresentam a propriedade antioxidante, atribuída principalmente, a presença de compostos fenólicos (MADSEN et al., 1996).

A adição de antioxidantes em gorduras, óleos e alimentos contendo gorduras é justificável por vários motivos: antioxidantes podem aumentar a vida média dos alimentos em 15-200% (BRANEN, 1975; DUVE e WHITE, 1991). A adição de antioxidantes pode evitar que nutrientes como ácidos graxos essenciais e vitaminas fiquem sujeitos à degradação autoxidativa e a perda do valor nutricional (DUVE e WHITE, 1991). Na indústria alimentícia, antioxidantes sintéticos são freqüentemente usados, por serem efetivos e menos caros do que os antioxidantes naturais.

Mas com o aumento da preocupação na utilização dos antioxidantes sintéticos em alimentos tais como o hidroxitolueno butilado, hidroxianisol butilado, terciobutil hidroquinona e o galato de propila, tem aumentado o interesse na descoberta de substâncias naturais com atividade antioxidante, incluindo as especiarias e durante a última década, o uso de seus extratos tem sido pesquisado em diferentes centros de investigação. A restrição dos

antioxidantes sintéticos está relacionada, principalmente, na possibilidade do seu efeito tóxico em vários estudos clínicos (BARLOW, 1990; BOTTERWECK et al., 2000). Contudo, pesquisadores identificaram a importância da substituição total ou parcial dos antioxidantes sintéticos por extratos naturais ricos em compostos fenólicos com bom potencial antioxidante (BRANEN, 1975; DUVE e WHITE, 1991, SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992).

Os compostos fenólicos têm sido utilizados como antioxidantes primários que agem como seqüestradores de radicais livres e bloqueiam reações em cadeia. Eles são largamente distribuídos na natureza e são derivados dos ácidos benzóico e cinâmico, bem como dos flavonóides (PRATT e HUDSON, 1964).

O mecanismo de cinética antioxidante de compostos fenólicos foi estudada inicialmente por BOLAND e TEM-HAVE (1947). Estes autores descrevem em detalhes o mecanismo de ação antioxidante no processo de oxidação, nas etapas mais limitantes do processo e suas efetividades. Desde então, outros trabalhos surgiram, e complementam a explicação do mecanismo de ação destas substâncias parcialmente elencados na revisão de SHAHIDI e WANASUNDARA (1992).

Com a perspectiva da utilização de compostos fenólicos como antioxidantes naturais para minimizar os efeitos *in vitro* do processo oxidativo, o presente trabalho utilizando algumas técnicas de avaliação do grau de oxidação de alimento (óleo), determinou a atividade antioxidante de compostos fenólicos naturais, identificados e quantificados de especiarias (um dos alimentos fonte), com a finalidade de avaliar a eficácia destes compostos na estabilidade oxidativa e a provável aplicação na indústria alimentícia.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

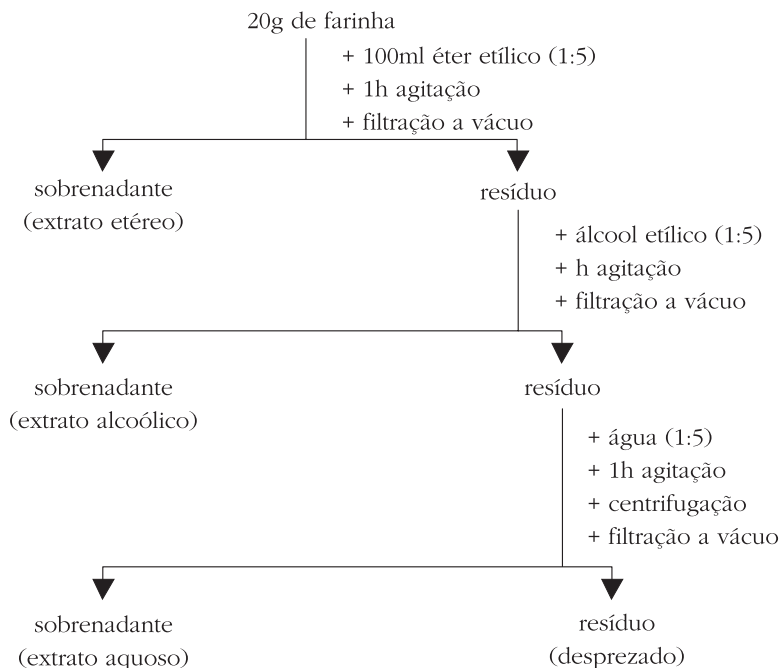
### **AMOSTRAS**

As especiarias (mostarda, canela e erva-doce) foram adquiridas no comércio local de São Paulo. O óleo sem antioxidante da empresa CARGIL S.A. Os demais reagentes utilizados foram adquiridos da Sigma, e outros fornecedores de reagentes de qualidade analítica.

### **PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS**

Os extratos etéreo, alcoólico e aquoso, da mostarda, canela e erva-doce foram obtidos através do processo de extração seqüencial (Figura 1).

Para obtenção dos extratos etéreos, foram pesados, inicialmente, 20 gramas da farinha de cada amostra e adicionados 100mL de éter etílico onde foram agitadas em um homogeneizador por 1 hora à temperatura ambiente. Após 1 hora, as soluções foram filtradas em funil de *Büchner*, com volume a ser completado para 100mL com éter etílico. Os resíduos foram recuperados, secos em estufa a 60°C, e as perdas foram pesadas e calculadas para a obtenção dos demais extratos com álcool etílico e água destilada, seguindo o mesmo procedimento para obtenção do extrato etéreo.



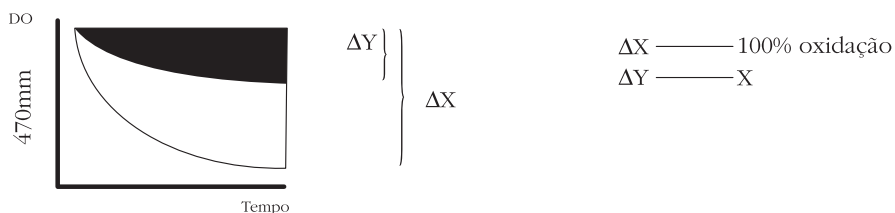
**Figura 1 Extração sequencial das farinhas das especiarias: mostarda, canela e erva-doce MOREIRA, 1999**

### ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO SISTEMA $\beta$ -CAROTENO/ÁCIDO LINOLÉICO

A atividade antioxidante foi determinada pelo método *in vitro*, desenvolvido por MARCO (1968) e modificado por MILLER (1971), empregando-se o ácido linoléico, *Tween* 40 e  $\beta$ -caroteno. Esse sistema foi mantido a 50°C, e medidas espectrofotométricas de absorvância foram monitoradas em espectrofotômetro *Bausch & Lomb*, modelo Spectronic 20, a 470nm, a cada 15 minutos, durante 2 horas. Volumes diferentes de extratos para as concentrações de 100 e 200ppm foram adicionados a 5mL de solução de  $\beta$ -caroteno com ácido linoléico: (20mL de solução de  $\beta$ -caroteno (20mg/mL) + 1mL de clorofórmio, 60mg de ácido linoléico, 14 gotas de *Tween* 40, como emulsificante), e foram evaporados pela passagem de nitrogênio. A seguir foram adicionados 100mL de água destilada, tratada com borbulhamento de O<sub>2</sub> durante 30 minutos. A solução inicial foi diluída até apresentar densidade ótica entre 0,6 e 0,7m comprimento de onda de 470nm. Todas as determinações foram realizadas em repetições até obtenção de coeficiente de variância de 5% e acompanhadas por um controle sem antioxidante e um outro com antioxidante sintético (BHT), nas mesmas proporções das amostras. As porcentagens de inibição da oxidação foram calculadas da seguinte forma: o decaimento da densidade ótica do controle (D.O. inicial - D.O. final) foi considerado como 100% de oxidação. A queda na leitura da

densidade óptica das amostras foi correlacionada com o controle e se estabeleceu a percentagem de inibição da oxidação, subtraindo-se a percentagem de oxidação de cada amostra de 100 (Figura 2).

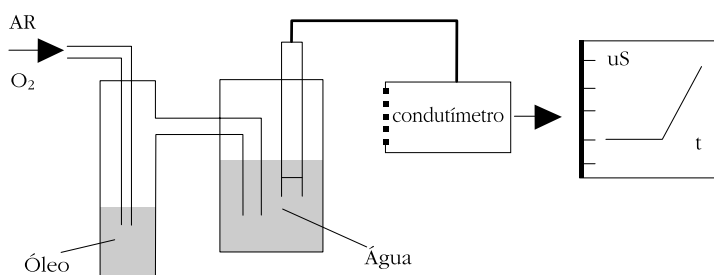
Primeiramente, foi verificada a ação antioxidante dos extratos e depois o efeito antioxidante sinergista através da associação dos extratos com os antioxidantes sintéticos.



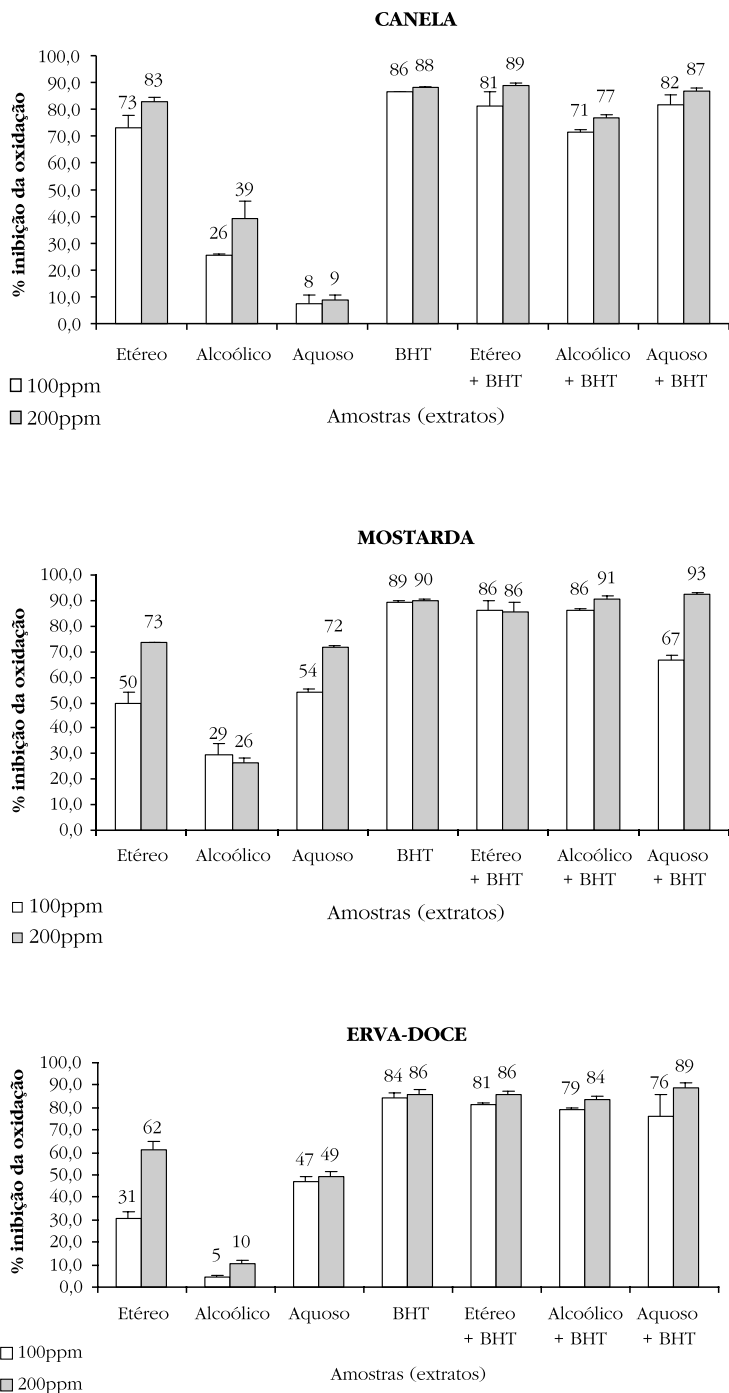
**Figura 2 Modelo para cálculo de porcentagem de inibição da oxidação (PEREIRA, 1996)**

### **AValiação DO TEOR DE ÁCIDOS Voláteis POR CONDUTIMETRIA (RANCIMAT)**

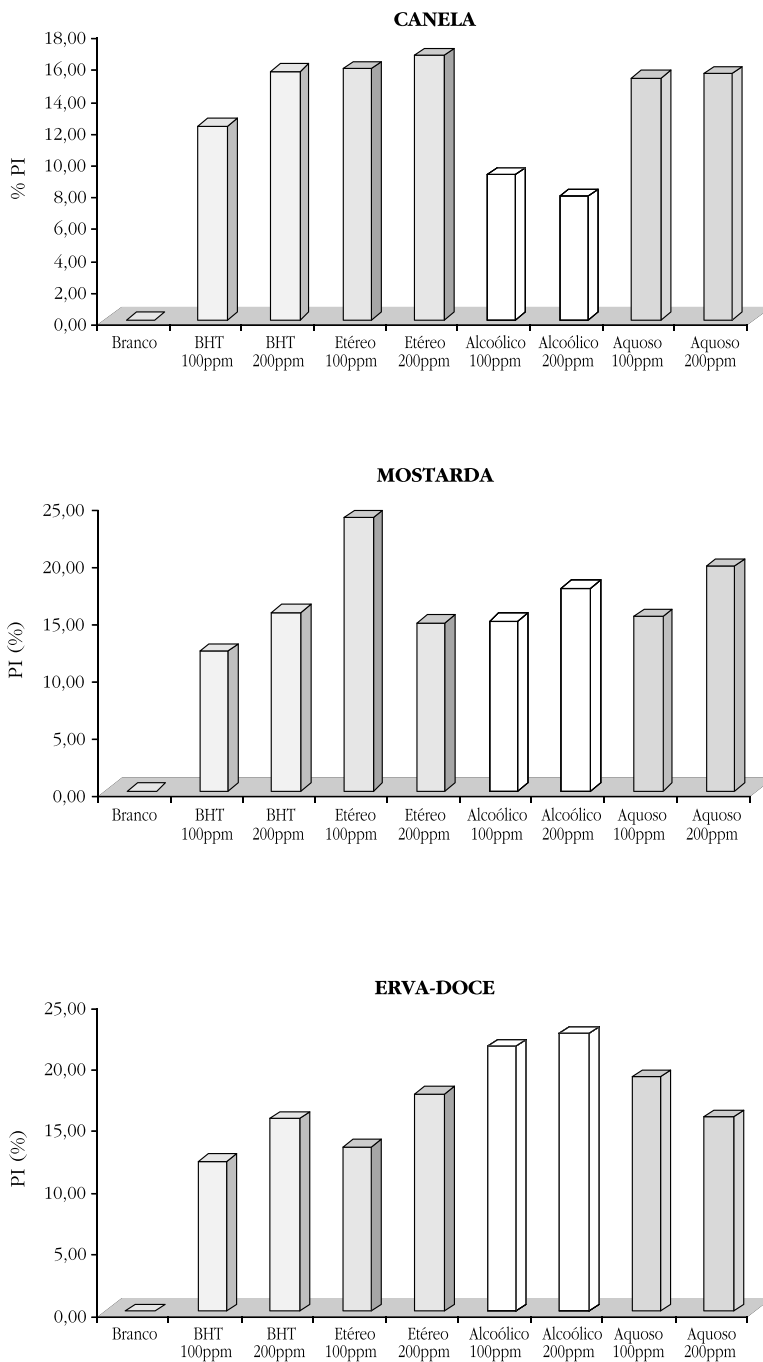
A análise baseia-se no registro das variações da condutividade da água destilada, na qual se faz a coleta de compostos polares de menor peso molecular. Estes compostos são obtidos normalmente após iniciação forçada da oxidação a uma temperatura de 110-130°C e com corrente de ar (Figura 3). Os resultados foram expressos por percentual de aumento dos tempos de indução baseados no controle negativo (óleo sem antioxidante) (SILVA et al., 1999). Para avaliação de compostos voláteis por condutimetria foi utilizado o aparelho RANCIMAT, a 110°C com um fluxo de ar de 10h/L, onde amostras de 5g de óleo sem antioxidante foi utilizado como controle negativo e o controle positivo foi utilizado o antioxidante BHT a 100 e 200ppm na mesma quantidade de óleo sem antioxidante. Todos os extratos das especiarias mostarda, canela e erva-doce, nas mesmas concentrações do controle positivo foram avaliadas de acordo com o princípio da técnica que avalia o tempo de indução (PI), como observados na Figura 5. Este período de indução é um parâmetro importante relacionado com a estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. Este PI avaliado pelo RANCIMAT, avalia rapidamente a produção de compostos voláteis produzidos que são coletados em água destilada e detectados por condutimetria.



**Figura 3 Descrição esquemática do RANCIMAT**



**Figura 4** Atividade antioxidante no sistema de co-oxidação de substratos  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico das especiarias mostarda, canela e erva-doce em comparação ao antioxidante sintético BHT como seu efeito sinérgico com as especiarias, nas concentrações de 100 e 200ppm



**Figura 5 Atividade antioxidante por condutimetria (RANCIMAT) das especiarias mostarda, canela e erva-doce em comparação ao antioxidante sintético BHT como seu efeito sinérgico com as especiarias, nas concentrações de 100 e 200ppm**

## **CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA**

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada para identificação de compostos fenólicos com atividade antioxidante, como também para purificação dos mesmos, suportando análise qualitativa e quantitativa por CGMS. A CCD seguiu utilizados os procedimentos citados por DUVE e WHITE (1991). Para tanto, foi utilizado h-butanol/ácido acético/água, como fase móvel, na proporção de 4:1:5, onde foram aplicado uma média de 10mL das amostras em placas de vidros com uma espessura de 0,25mm, e para a identificação dos compostos seguiu-se os seguintes sistemas de revelação: 1) para avaliar as bandas com atividade antioxidante utilizou-se a solução de 9mg de  $\beta$ -caroteno em 30mL de colorórmio e 10 $\mu$ L de ácido linoléico em 60mL de etanol. As manchas com atividade antioxidante reveladas neste sistema, foram aquelas que apresentaram coloração que variaram do amarelo ao alaranjado; 2) e, para avaliar a presença de compostos fenólicos foi utilizado uma solução de 1% de cloreto férrico e ferricianeto de potássio em água que apresentaram manchas de coloração que variaram do azul claro ao azul escuro.

## **CROMATOGRAFIA A GÁS ACOPLADO AO ESPECTROFOTÔMETRO DE MASSA (CGMS)**

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a gás HP (modelo 6890 com detector de ionização de chama), conectado a um espectro de massa modelo 5972 SP, com parâmetros controlados pelo software *Windows NT workstation 4.0*. A coluna empregada foi a semipolar DB5 (J & W®), com 25 metros de comprimento por 0,25mm de diâmetro, utilizando-se a seguinte programação: temperatura inicial de 112°C, isotérmica por 3 minutos e programada de 112°C até 290°C, a uma velocidade de aquecimento de 10°C por minuto; isotérmica a 290°C, por 10 minutos. A temperatura da câmara injetora foi de 290°C e a temperatura do detector, 300°C e, o gás de arraste utilizado foi o hidrogênio (MOREIRA e MANCINI FILHO, 1998).

A identificação dos ácidos fenólicos foi realizada com base nos tempos de retenção relativa das amostras com base no padrão interno e na concentração dos compostos da solução padrão (Sigma) e por confirmação com os espectros de massa obtidos presentes na biblioteca *Phenolic* criada com os espectros dos padrões de compostos fenólicos (Sigma) sendo cadastrados no programa do software *Windows NT workstation 4.0*.

## **RESULTADOS**

As extrações seqüenciais com solventes de diferentes polaridades (éter etílico, etanol e água) permitiram obter diferentes frações com atividade antioxidante diferenciadas nos dois sistemas utilizados.

Os extratos obtidos por meio de extração seqüencial (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 1998), seguindo procedimento descrito na Figura 1, foram avaliados segundo seu potencial

antioxidante nos sistemas aquoso (co-oxidação de substratos, com o uso do ácido linoléico e  $\beta$ -caroteno) e lipídico (condutometria de compostos polares - RANCIMAT).

## **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMA AQUOSO**

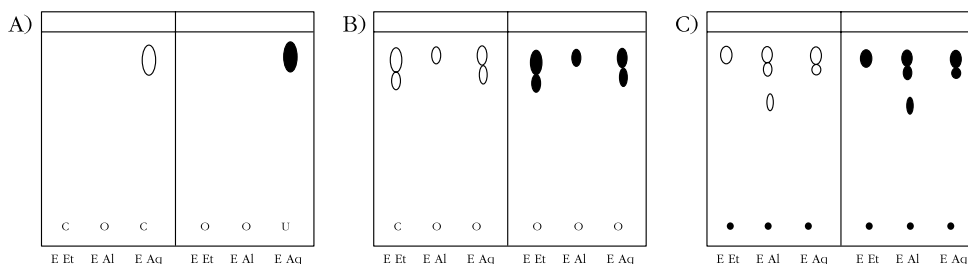
De acordo com a Figura 4, que apresenta os resultados da inibição da oxidação no sistema aquoso, pode-se verificar que dos extratos etéreos das especiarias, a canela foi a que apresentou melhor percentual de inibição da oxidação com 83,05% a 200ppm, seguido da mesma especiaria com 73,09% de inibição da oxidação a 100ppm, atividade esta sem diferença significativa ( $p < 0,05$ ) do extrato etéreo da mostarda com 73,06% a 200ppm. Os extratos alcoólicos de todas as especiarias não apresentaram bom potencial antioxidante, porém os extratos aquosos da mostarda e erva-doce foram os que apresentaram significativa inibição da oxidação com 72,00% e 49,15%, respectivamente em comparação ao antioxidante sintético BHT, nas duas concentrações do estudo (100 e 200ppm).

## **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM SISTEMA LIPÍDICO**

O aumento do período de indução pela adição de antioxidantes está relacionada com a sua eficácia em retardar ou inibir o processo oxidativo e, é expresso por um índice ou fator de proteção. Como observado na Figura 5, os extratos alcoólico e aquoso da mostarda e erva-doce foram os que apresentaram o maior aumento no tempo de indução neste sistema. Indicando que estas amostras estabilizam significativamente óleos comestíveis (como o óleo de soja utilizado no procedimento) em comparação ao controle positivo BHT, antioxidante sintético, muito utilizado na indústria alimentícia. Levando-se em conta a importância da determinação do PI para óleos e gorduras e considerando-se que o RANCIMAT, ainda não é de uso rotineiro, objetivou-se, com o presente trabalho, mostrar também, a viabilidade do uso deste equipamento para a avaliação da estabilidade oxidativa do óleo de soja refinado com antioxidantes naturais (fenólicos de especiarias) e sintéticos (BHT).

## **CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA**

Como se observa na Figura 6, apenas os extratos etéreos das especiarias canela e erva-doce apresentaram  $R_f$  em torno de 0,9 para ambos os sistemas de revelação ( $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e cloreto férrico/ferricianeto de potássio). Já para os extratos alcoólicos a maior presença de substâncias fenólicas com atividade antioxidante foi no extrato da erva-doce que apresentou  $R_f$  0,64 a 0,90. E nos extratos aquosos, todas as especiarias avaliadas apresentaram bandas de compostos fenólicos com atividade antioxidante com  $R_f$  que variaram de 0,62 a 0,90.



**Figura 6** Cromatografia em camada delgada. A) mostarda; B) canela; C) erva-doce. E ET = extrato etéreo. E Al = extrato alcoólico; E Aq = extrato aquoso. ○ - revelação no sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico; ● - revelação no sistema ferricianeto/cloreto férrico

## CROMATOGRAFIA A GÁS COM DETECÇÃO EM ESPECTROFOTÔMETRO DE MASSAS

Com a necessidade de conhecer quais os compostos presentes, foi realizada a cromatografia gasosa utilizando como agente silinizante o trimetilsililbisacrilamida (B.S.A.), onde foi possível verificar o perfil cromatográfico presente nos extratos das especiarias mostarda, canela e erva-doce. Observando os valores quantificados, presentes na Tabela 1, verifica-se que os ácidos salicílico e caféico, como também o catecol, estiveram presentes nos três extratos das três especiarias estudadas. Destaca-se, porém o ácido caféico que apresentou, quantitativamente superior nos extratos aquosos das mesmas, apresentando-se em sua maior quantidade no extrato aquoso da canela (2,462mg/mL), seguido da erva-doce (1,772mg/mL) e da mostarda (1,545mg/mL). Os demais compostos fenólicos identificados e quantificados (Tabela 1) foram os ácidos pirogalol, protocatequínico, quínico, ferúlico e sináptico, como também, quercetina, miricetina e luteolína. Por outro lado, quando se observa o perfil de compostos fenólicos dos extratos das mesmas especiarias, não se verifica diferença significativa ( $p < 0,05$ ) nas concentrações dos mesmos, que foi estimada em mg/mL, quantidade que foi analisada no cromatógrafo da HP, modelo 5973, com detector de massa e uma coluna semipolar DB5, seguindo a programação e preparação das amostras descritas por (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 1998).

## DISCUSSÃO

Autoxidação é um processo natural entre o oxigênio molecular e constituintes lipídicos insaturados (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992). Ela está na origem do desenvolvimento da rancidez, da produção de compostos responsáveis por *off flavors* e *off odors*, da reversão e da ocorrência de um elevado número de reações de polimerização e de cisão. Este tipo de reação não só diminui o tempo de prateleira e o valor nutritivo dos produtos alimentares, como pode gerar compostos nocivos como aldeídos, cetonas e polímeros (SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992; FRANKEL, 1996).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, numa concentração consideravelmente menor que a do substrato oxidável, retardam o processo oxidativo, diminuindo a velocidade da reação ou prolongando o seu período de indução (BRANEN, 1975; MAILLARD e BERSET, 1995).

A quebra da cadeia da oxidação lipídica pelos antioxidantes não ocorre segundo um mecanismo simples, e certos aspectos, relativos às interações entre constituintes de meios complexos, não estão completamente esclarecidos. O emprego de antioxidantes em formulações é muito empírico, de tal modo que a garantia da sua eficácia nem sempre existe (FRANKEL, 1996; DECKER, 1997).

Considerando as particularidades do efeito antioxidante, neste trabalho a utilização dos dois sistemas aquoso e lipídico permitiram estabelecer uma avaliação mais ampla da inibição da oxidação em sistemas diferenciados, cumpre-se destacar que estes modelos tem sido utilizados por diferentes pesquisadores (DUVE e WHITE, 1991; SHAHIDI e WANASUNDARA, 1992; MOREIRA e MANCINI FILHO, 1998; SILVA et al., 1999; CINTRA e MANCINI FILHO, 2001).

Este trabalho evidenciou o efeito antioxidante de extratos de especiarias na capacidade de inibir a oxidação lipídica com o objetivo de viabilizar sua provável utilização na indústria alimentícia. Esta avaliação foi realizada em dois meios de solubilidade para testar a eficácia das substâncias fenólicas presentes nas especiarias em distintos meios de solubilidade. Foi empregada a medida do tempo de indução em óleo sem antioxidante, como também o teste de co-oxidação de substratos, baseado na descoloração (oxidação) do  $\beta$ -caroteno pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoléico. Com estes dados e juntamente com a identificação das substâncias fenólicas presentes com atividade antioxidante nas especiarias foi possível levantar pontos importantes que podem interferir na utilização de especiarias como prováveis adjuvantes na inibição de processos oxidativos em alimentos e organismos.

Após a obtenção dos extratos das especiarias mostarda, canela e erva-doce com solventes de diferentes polaridades avaliou-se a presença de atividade antioxidante nos diferentes extratos. Os resultados apresentados, tanto no sistema aquoso, quanto lipídico mostraram distintos níveis na proteção do processo oxidativo.

No sistema aquoso destaca-se o efeito protetor da mostarda (no extrato aquoso com 72% de inibição da oxidação a 200ppm) e da canela (no extrato etéreo com 83% de inibição da oxidação, também a 200ppm). O efeito sinérgico de todos os extratos avaliados com o antioxidante sintético BHT.

Atividade antioxidante de compostos fenólicos em mostarda já foi relatada (SHAHIDI et al., 1994) utilizando o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e confirmados por MOREIRA e MANCINI-FILHO (1998). O perfil de identificação dos compostos presentes também são comuns, quantitativamente diferentes em alguns dos trabalhos, diferenciando, principalmente pelas condições de extração de cada grupo de estudo. Estes autores encontraram elevadas atividades

antioxidantes dos extratos de mostarda, sendo superior, inclusive, do antioxidante sintético BHT a 200ppm. Nestes trabalhos também ficou evidenciado que a atividade antioxidante é proporcional à presença dos compostos fenólicos e do efeito sinérgico que estes compostos exercem entre si, sendo influenciada principalmente pelo esquema de extração.

Já para o sistema lipídico evidencia-se o potencial antioxidante do extrato etéreo da mostarda, etéreo e aquoso da canela e alcóolico da erva-doce, demonstrando que o meio de extração influencia a capacidade antioxidante das substâncias fenólicas presentes nas especiarias.

Várias medidas de estimativas da atividade antioxidante têm sido relatadas, visando à monitoração do processo de oxidação dos lipídios. Estes procedimentos podem ser aplicados tanto nos extratos como diretamente no próprio alimento. Medidas do oxigênio ativo, teste de Schall (estufa), consumo de oxigênio, peróxidos, entre outros têm sido utilizados, e recentemente trabalhos destacam o uso de sistemas fechados automáticos (RANCIMAT) como um parâmetro de menor repetição de erro entre outros (KAHL e HILDEBRANDT, 1986; KOCHHAR e ROSSELL, 1990; SILVA et al., 1999).

Os dados apresentados no presente trabalho corroboram com os resultados de DECKER (1997), onde foram verificadas as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos e que os mesmos são dependentes das suas características de solubilidade. Este autor foi o primeiro a descrever o “paradoxo antioxidante” como um fenômeno onde seqüestradores de radicais livres (substâncias com características antioxidantes) hidrofílicos foram antioxidantes mais efetivos do que os hidrofóbicos em emulsões de óleo. Estes resultados são devidos à capacidade de antioxidantes hidrofílicos agirem na interface óleo-água mais efetivamente do que os hidrofóbicos.

Compostos fenólicos exibem distintas características de solubilidade que podem afetar sua capacidade antioxidante. Os antioxidantes hidrofílicos como *Trolox* e ácido gálico, são antioxidantes mais efetivos em sistemas aquosos do que seus homólogos hidrofóbicos como o  $\alpha$ -tocoferol e galato de propila. Já em óleo com emulsificante, o inverso é verdadeiro, o  $\alpha$ -tocoferol sendo mais efetivo do que seu homólogo hidrofílico *Trolox*. Em sistemas de emulsões lipídicas pode-se encontrar antioxidante hidrofílicos equilibrados em água na forma de micelas e em fases lipídicas.

Diante da presença da atividade antioxidante nas especiarias avaliadas, justificou-se a identificação de quais substâncias fenólicas presentes nas mesmas poderiam estar envolvidas com o processo de inibição da oxidação. Portanto, métodos cromatográficos foram utilizados para tal finalidade.

Constatadas as vantagens da cromatografia em camada delgada, como um método rápido, sensível e de boa resolução, estabeleceu-se as condições de trabalho para a purificação e identificação de ácidos fenólicos em extratos das especiarias mostarda, canela e erva-doce. A cromatografia em camada delgada para identificação e purificação de ácidos fenólicos é um parâmetro seguro quando utilizada com diferentes sistemas

reveladores, como sugerido por SHAHIDI *et al.* (1994), para identificação e purificação de ácidos fenólicos, principalmente de compostos fenólicos di e tri hidroxí, como o ácido *p*-hidroxibenzóico e o ácido sináptico. Com esta técnica não somente foi possível evidenciar a presença de bandas de compostos fenólicos com atividade antioxidante, como também a purificação destas para sua identificação e quantificação por cromatografia gasosa, permitindo o conhecimento das principais substâncias responsáveis pela inibição da oxidação nos extratos das especiarias mostarda, canela e erva-doce nos dois sistemas testados (aquoso e lipídico) (Tabela 1).

**Tabela 1 Composição de compostos fenólicos presentes nas especiarias mostarda, canela e erva-doce**

Compostos fenólicos	Extratos								
	Etéreo (µg/mL)			Alcólico (µg/mL)			Aquoso (µg/mL)		
	M	C	ED	M	C	ED	M	C	ED
catecol	0,023	0,033	0,058	0,065	0,098	0,140	0,309	0,305	0,111
salicílico	0,053	0,035	0,038	0,111	0,143	0,119	0,236	0,302	0,175
pirogalol	-	-	-	0,073	0,082	0,162	-	-	0,100
protocatequínico	0,04	-	-	-	-	-	-	-	-
quínico	-	-	-	-	0,069	-	-	-	0,430
ferúlico	-	-	-	-	0,044	-	-	-	0,710
caféico	0,263	0,378	0,500	1,092	0,482	1,528	1,545	2,462	1,772
sináptico	0,155	0,153	0,162	0,184	0,180	0,251	-	0,233	0,202
quercetina	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-
miricetina	-	-	-	0,022	-	-	-	-	-
luteolína	0,024	-	-	0,022	-	0,144	-	-	0,093

M-mostarda; C-canela; ED-erva-doce; MT-mistura teste.

Traços dos ácidos: *p*-hidroxibenzóico, vanílico, *p*-cumárico e gálico foram identificados mas não quantificados por sua baixa concentração nos extratos, conseqüentemente sua baixa detecção no CGMS.

## CONCLUSÕES

Com base nos dados disponíveis até o momento, foi possível concluir que as substâncias fenólicas identificadas nas especiarias mostarda, canela e erva-doce foram os compostos responsáveis pela inibição do processo oxidativo, tanto pela proteção dos ácidos graxos insaturados que compõem a fração lipídica das especiarias, como pela proteção contra oxidação nos sistemas onde os extratos foram adicionados. Os extratos quando associados com o antioxidante sintético BHT, apresentaram atividade sinérgica, com potencialização da atividade antioxidante a valores equivalentes a 100ppm do

antioxidante sintético considerado. Como, também, as diferentes características de solubilidade dos compostos presentes, evidenciadas pelo meio de extração, é o que suportará sua vasta aplicabilidade na indústria alimentícia, pela sua atuação na interface óleo-água dos diferentes alimentos. Finalizando, destaca-se que entre os sistemas estudados o *RANCIMAT* é o que se aproxima mais das necessidades da avaliação industrial na estabilidade de óleos e gorduras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS/REFERENCES

- BARLOW, S.W. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In: HUDSON, B.J.F. (Ed.) *Food Antioxidants*. Amsterdam: Elsevier, 1990. p. 253.
- BOLAND, J.L. e TEM-HAVE, P. Kinetics in the chemistry of rubber and related materials; the inhibitory effect of hydroquinone on the thermal oxidation of ethyl linoleate, *Trans. Faraday Soc.*, v. 43, p. 201, 1947.
- BOTTER WECK, A.A.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R.A.; KLEINJANS, J.; VAN DEN BRANDT, P.A. – Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach risk: results from analysis in the Netherland. Cohort Study. *Food Chem. Toxicol.* v.38, p.599-605, 2000.
- BRANEN, A.L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.52, p.59-63, 1975.
- CINTRA, R.M.G.; MANCINI-FILHO, J. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos *in vitro* e *in vivo*. *Nutrire*, São Paulo, v.22, p. 49-62, 2001.
- DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? *Nutr. Rev.*, New York, v. 55, n.11, p. 396-407, 1997.
- DUVE, K.J.; WHITE, P.J., Extraction and Identification of Antioxidants in Oats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.61, n.6, p. 365-370, 1991.
- FRANKEL, E.N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chemistry*, v.57, n. 1, p. 51-55, 1996.
- KAHL, R.; HILDEBRANDT, A.G. Methodology for studying antioxidant activity and mechanisms of action of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.*, v. 24, p. 1071, 1986.
- KOCHHAR, S.P.; ROSSELL, J. D. Detection, estimation and evaluation of antioxidants in food systems. In: HUDSON, B.J.F. (Ed.) *Food Antioxidants*. Amsterdam: Elsevier, 1990, p. 19.
- MADSEN, H.L.; NIELSEN, B.R.; BERTELSEN, G.; SKIBSTED, L.H. Screening of antioxidants between assays based on ESR spin trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption. *Food Chemistry*, New York, v.57, n.2, p.331-337, 1996.
- MAILLARD, M-N.; BERSET, C. Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. *J. Agric. Food Chem.* v. 43, p. 1789, 1995.
- MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, v.45, p.494-598, 1968.
- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.48, p.91, 1971.

- MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante de sementes de mostarda (*Brassica alba*, L.) I- Identificação dos principais compostos responsáveis pela inibição da oxidação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17º; Rio de Janeiro. *Anais*. Rio de Janeiro: SBCTA, 1998. v. 2. p. 1077-1080.
- OYA, T.; TOSHIHIKO, O.; KAWAKISHI, S. Spice Constituents Scavenging Free Radicals and Inhibiting Pentosidine Formation in a Model System. *Biosci. Biotech. Biochem.*, v.61, n.2, p.263-266, 1997.
- PEREIRA, R.B.; MANCINI-FILHO, J. A valiação da atividade antioxidante em sementes de frutas cítricas. *Ciên. Tecnol. Aliment*, v. 14, n. 2, p. 160-167, 1994.
- PRATT, D.E.; HUDSON, B.J.F. Natural antioxidant activity of vegetable extracts. I flavone aglycones. *J. Food Sci.*, v.19, p.27-33, 1964.
- SCHULER, P. Natural antioxidants exploited commercially. In: HUDSON, B.J.F. (Ed.), *Food Antioxidants*, Amsterdam: Elsevier, 1990, p. 99.
- SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P.K.J.P.D. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Sci. and Nutr.*, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.
- SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U.N; AMAROWICZ, R. Natural antioxidants from low-pugency mustard flour. *Food Res. Intern.*, v.27, p. 489-493, 1994.
- SHERWIN, E.R. Oxidation and Antioxidants in fat and oil processing. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.55, 809.
- SILVA, F.A.M.; BORGES, M. F.; FERREIRA, M. A. Methods for the evaluation of the degree of lipid oxidation and the antioxidant activity. *Quím. Nova*, v.2, n.1, p. 94-103, 1999.

Recebido para publicação em 25/11/02.

Aprovado em 30/06/03.