

CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE CRAMBE (*Crambe abyssinica*) EXTRAÍDO COM PROPANO EM CONDIÇÕES SUBCRÍTICAS

K. A. SANTOS¹, R. SCHNEIDER², L. CARDOZO FILHO³, C. SILVA⁴, E. A. SILVA¹

¹ Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e Ciências Exatas

² Universidade Tecnológica Federal do Paraná

³ Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Engenharia Química

⁴ Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Tecnologia

E-mail para contato: edsondeq@hotmail.com

RESUMO – O presente trabalho visa investigar as características do óleo de crambe extraído com propano em condições subcríticas em comparação aos óleos extraídos em Soxhlet utilizando os solventes orgânicos hexano e diclorometano. Foram realizadas análises de ácidos graxos totais, compostos não ligados ao glicerol (ácidos graxos livres e fitosteróis) e dos antioxidantes α , γ e δ -tocoferol. A estabilidade oxidativa do óleo de crambe foi verificada empregando a calorimetria diferencial de varredura (DSC) e esta técnica também foi empregada para determinar o ponto de fusão do óleo. Os resultados comprovaram que o óleo de crambe é predominantemente constituído por ácidos graxos monoinsaturados (80,59 a 81,88%), notadamente pelo ácido erúico. Em relação aos fitosteróis, o óleo apresenta, em média, 14% de brassicasterol, 30% de campesterol e 56% de β -sitosterol. A amostra de óleo extraída com propano subcrítico a 80 °C e 80 bar apresentou os maiores teores de tocoferóis, correspondendo ao total de 202 mg para cada 100 g de óleo. Nas análises calorimétricas foram encontrados períodos indutivos de 420 e 77,5 minutos para a amostra de óleo extraída com propano subcrítico submetida a 110 °C e 140 °C, respectivamente e a fusão completa do óleo acontece em aproximadamente 10°C.

1. INTRODUÇÃO

O crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) é uma oleaginosa pertencente à família Brassicaceae (Cruciferae). Originária da região do Mediterrâneo, a espécie se adapta muito bem ao clima frio e seco. A árvore pode chegar a 1-2 m de altura, suas sementes variam de 0,8-2,6 mm de diâmetro e contém de 35,6-42,8% de óleo (Atabani *et al.*, 2013). O óleo de crambe é rico em ácido erúico (50-60%), de grande aplicação industrial, como lubrificante, inibidor de corrosão, utilizado para fabricação de plásticos, borrachas, cosméticos, detergentes, produção de biodiesel, entre outras (Falasca *et al.*, 2010).

No Brasil, a oleaginosa foi introduzida pela Fundação MS em 1995, sendo logo identificada como uma cultura promissora para a produção de biodiesel. Em 2007 foi registrada a cultivar FMS Brilhante, com produção inicial entre 1000 e 1500 quilos por hectare (Falasca *et al.*, 2010). Até o ano de 2010 já foram registradas produtividades de até 2300 quilos por hectare (PITOL *et al.*, 2010).

Para a extração do óleo, tradicionalmente emprega-se a prensagem e/ou extração com solventes orgânicos, técnicas caracterizadas por elevados tempos de extração, além de requererem etapas posteriores para separação de resíduos sólidos e solventes. Desta forma, a extração de óleos vegetais com fluidos pressurizados, notadamente o propano em condições subcríticas, apresenta-se como uma alternativa aos métodos usualmente utilizados. Além de elevados rendimentos, a técnica é considerada limpa, pois o solvente é removido do extrato pela despressurização do sistema, sendo possível a sua recuperação.

Tendo em vista o atual interesse de aplicação do crambe na matriz energética do país, bem como a importância deste óleo para a indústria química, o presente trabalho visa caracterizar o óleo de crambe, cultivar FMS Brilhante, extraído com propano em condições subcríticas em comparação ao extraído convencionalmente com hexano e diclorometano quanto à composição em ácidos graxos totais, compostos livres de glicerol, antioxidantes, estabilidade oxidativa e ponto de fusão.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas amostras de óleo das sementes de crambe (*Crambe abyssinica*), cultivar FMS Brilhante, extraídas com propano (95% de pureza, Linde Gás) em condições subcríticas e amostras extraídas em Soxhlet com os solventes orgânicos hexano (99%, F. Maia) e diclorometano (99,5%, Vetec), acima de suas respectivas temperaturas de ebulição. As condições experimentais das extrações do óleo são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições experimentais das extrações

Solvente	Condição experimental	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	Tempo de extração (min)
Propano Subcrítico	1	40	80	80
	2	40	160	80
	3	80	80	80
	4	80	160	80
	5	60	120	80
<i>n</i> -hexano	HEX	-	-	480
Diclorometano	DCM	-	-	480

2.1. Análise dos Ácidos Graxos Totais

A análise dos ácidos graxos totais presentes no óleo de crambe foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás Agilent 7890 acoplado a espectro de massas MS 8990 e equipado com uma coluna capilar (ZBWAX, 30m x 0,25mm x 0,25 µm) segundo metodologia de Garcia *et al.* (2012). Com a finalidade de determinar os ácidos graxos totais foi realizada a derivatização do óleo com solução metanólica de KOH 2 mol L⁻¹ seguindo a metodologia padrão AOAC Ce 2-66 (1990). A identificação dos componentes presentes no óleo de crambe foi realizada por comparação dos dados do espectro com os apresentados na biblioteca Wiley.

2.2. Análise dos Compostos Livres de Glicerol

Os compostos não ligados ao glicerol (ácidos graxos livres e fitosteróis) foram derivatizados com N,O-bis(trimetilsilil)trifluoro-acetamida (BSTFA) e trimetilclorosilano (TMCS) (Sigma Aldrich), conforme Freitas *et al.* (2008). As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectro de massa, Thermo-Finnigan. Para a separação cromatográfica foi utilizada uma coluna capilar (Agilent HP-5MS 30 m x 0,250 mm x 0,25 μ m) e as condições utilizadas foram: injeção de 0,4 μ L no modo split 1:10, temperatura inicial da coluna de 100 °C, mantida nesta temperatura por 6 minutos, aumentando até 230 °C à taxa de 5 °C min⁻¹ e para 280 °C à 15 °C min⁻¹, permanecendo por 15 minutos. A vazão do gás de arraste, hélio, foi de 1 mL min⁻¹. O programa Xcalibur® (Thermo Electron) foi empregado para identificação dos compostos e a quantificação por padronização interna com os padrões de 5 α -colestano e heptadecanoato de metila, ambos da Sigma Aldrich.

2.3. Análise dos Tocoferóis

Os tocoferóis α , γ e δ presentes no óleo de crambe foram analisados em cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-20AT com detector UV-vis SPD-20A, ambos da marca Shimadzu, conforme metodologia proposta por Freitas (2007). A coluna utilizada foi a C-18, modelo Shim-pack CLC-ODS (M) com 4,6mm x 25 cm e diâmetro de partícula de 5 μ m, mantida a 25 °C. Utilizou-se um loop de 50 μ L e o fluxo de fase móvel (mistura metanol:água 96:4 v:v) de 1 mL min⁻¹ no modo isocrático. O comprimento de onda utilizado para a detecção foi de 292 nm. Para a quantificação foram construídas curvas padrão com concentrações de α , γ e δ variando de 0,5 a 5 mg L⁻¹ dos respectivos padrões (Sigma Aldrich), que apresentaram coeficiente de determinação (R^2) de 0,99.

2.4. Análises em Calorímetro Diferencial de Varredura (DSC)

As amostras de óleo de crambe extraídas com propano subcrítico a 80 °C e 160 bar, hexano e diclorometano foram caracterizadas quanto à estabilidade oxidativa e ponto de fusão utilizando um calorímetro DSC Shimadzu – 60.

A determinação da estabilidade oxidativa consiste na oxidação do óleo quando este é submetido a um fluxo constante de oxigênio. Foram pesados 2 mg de óleo em cadinho de alumínio e este colocado sem tampa no compartimento de amostra do equipamento. Um cadinho vazio foi utilizado como referência. Segundo metodologia proposta por Tan *et al.* (2002), cada amostra foi submetida a quatro diferentes temperaturas (110, 120, 130 e 140 °C) com fluxo de oxigênio (99,99% de pureza) de 50 mL min⁻¹.

Na determinação do ponto de fusão, aproximadamente 1 mg de óleo foi submetido a um fluxo de nitrogênio de 50 mL min⁻¹, sendo resfriado a -40 °C com a utilização de nitrogênio líquido e, então aquecido até 30 °C a uma taxa de 10 °C min⁻¹.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição do Óleo

A composição em ácidos graxos nas amostras de óleo de crambe obtidas sob diferentes condições de temperatura e pressão com o solvente propano subcrítico, bem como o óleo extraído de forma convencional com hexano (HEX) e diclorometano (DCM), estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição em ácidos graxos totais (%) encontrada no óleo de crambe extraído sob diferentes condições experimentais (conforme Tabela 1)

Ácido	1	2	3	4	5	HEX	DCM
Palmítico	1,74	1,75	1,72	1,87	1,87	1,72	1,79
Palmitoleico	0,06	0,08	0,06	0,05	0,08	0,08	0,10
Estearico	0,93	0,85	0,84	0,85	0,94	0,89	0,93
Oleico	18,68	18,43	20,17	19,72	20,16	17,87	18,01
cis-vacênico	0,24	0,20	0,16	0,20	0,23	0,26	0,32
Linoleico	6,86	6,99	7,14	6,71	7,23	6,99	7,52
Linolênico	5,14	5,05	5,71	5,08	4,92	5,37	5,05
Araquídico	1,21	1,12	0,92	1,02	1,01	1,04	1,13
Gadoleico	3,63	3,63	3,58	3,38	3,48	3,44	3,67
Eicosadienóico	0,61	0,65	0,55	0,57	0,49	0,64	0,74
Behênico	1,75	1,91	1,91	1,58	1,62	1,77	2,02
Erúcico	58,64	58,89	56,72	58,53	57,42	59,38	58,49
Lignocérico	0,33	0,40	0,35	0,29	0,43	0,37	0,39
nd*	0,19	0,18	0,15	0,16	0,18	0,15	0,21

* não determinados.

As análises mostraram que não houve diferenças significativas entre os resultados, ao nível de significância de 5%. Os ácidos graxos insaturados predominam na composição do óleo de crambe (Lalas *et al.*, 2012), majoritariamente representado pelo ácido erúcico, com até 59,4%, seguido do ácido oleico com composição de até 20,17% e do linoleico (até 7,52%), em concordância com outros trabalhos reportados na literatura (Singh & Singh, 2010; Lalas *et al.*, 2012). Os ácidos graxos saturados presentes no óleo somam aproximadamente 6%, sendo que o predominante é o ácido behênico, com até 2% da composição total.

Os ácidos graxos livres são produzidos através de reações hidrolíticas, em que ocorre a quebra da ligação éster do triacilglicerol. Estas reações podem ser catalisadas pelas enzimas lipases ou pela ação de calor e umidade (Osawa *et al.*, 2006) e contribuem para a aceleração do processo oxidativo dos óleos. Na Tabela 3 apresenta-se a quantificação dos ácidos graxos livres presentes nas amostras de óleo. Os resultados revelaram diferenças significativas para as diferentes condições de extração,

embora todas apresentem teores inferiores a 5%, indicando que estes óleos podem ser armazenados por longo período sem deterioração lipídica por ranço hidrolítico (Ajayi *et al.*, 2006).

Tabela 3 – Quantificação dos ácidos graxos livres (AGL) presentes no óleo de crambe

Condição experimental	Teor de AGL (%) [*]
40 °C e 80 bar	1,26 ± 1,01x10 ^{-2b}
40 °C e 160 bar	1,16 ± 3,50x10 ^{-2b}
80 °C e 80 bar	1,62 ± 3,68x10 ^{-2a}
80 °C e 160 bar	1,70 ± 4,76x10 ^{-2a}
60 °C e 120 bar	1,24 ± 2,77x10 ^{-2b}
Hexano	1,19 ± 1,47x10 ^{-2b}
Diclorometano	1,71 ± 1,07x10 ^{-2a}

*letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem entre si ao nível de 5%.

Também livres de glicerol, os fitosteróis são uma classe de esteróis presentes nas plantas que podem ser utilizados para identificação das mesmas. Esse é o caso do brassicasterol, encontrado nas espécies da família Brassicaceae em níveis de 5-20% (Phillips *et al.*, 2002). Na Tabela 4 estão apresentados os três fitosteróis (FIT) encontrados no óleo de crambe (brassicasterol, campesterol e β -sitosterol) bem como a quantificação dos mesmos.

Tabela 4 – Quantificação de fitosteróis presentes no óleo de crambe (mg de FIT 100 g⁻¹ de óleo)

Condição experimental	Brassicasterol	Campesterol	β -sitosterol	Total [*]
40 °C e 80 bar	28,64 ± 0,21	51,40 ± 0,14	99,96 ± 0,31	180,00 ± 0,23 ^d
40 °C e 160 bar	25,97 ± 0,28	52,73 ± 0,76	106,15 ± 0,70	184,86 ± 0,34 ^c
80 °C e 80 bar	25,82 ± 0,37	53,82 ± 0,57	101,50 ± 0,98	181,14 ± 0,78 ^d
80 °C e 160 bar	26,83 ± 0,45	62,15 ± 0,21	112,06 ± 0,21	201,05 ± 0,45 ^a
60 °C e 120 bar	29,79 ± 0,89	58,24 ± 0,62	104,73 ± 0,22	192,76 ± 0,05 ^b
Hexano	23,42 ± 0,56	54,09 ± 0,54	103,28 ± 0,43	180,79 ± 0,41 ^d
Diclorometano	23,59 ± 0,32	55,05 ± 0,55	107,80 ± 0,55	186,44 ± 0,32 ^c

*letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem entre si ao nível de 5%.

Segundo Phillips *et al.* (2002), o conteúdo de fitosterol no óleo depende de vários fatores como a variedade/cultivar, condições de cultivo, armazenamento do grão pós-colheita e método de extração e condições de armazenamento do óleo. Desta forma, pode-se atribuir às condições de extração do óleo os diferentes níveis de fitosteróis encontrados. Os teores individuais de cada fitosterol no óleo de crambe encontrados neste trabalho (em média de 14% para o brassicasterol, 29,7% para o campesterol e 56,3% para o β -sitosterol) são semelhantes aos encontrados por Lechner *et al.* (1999) e Lalas *et al.* (2012).

Embora os fitosteróis sitosterol e campesterol atuem como antioxidantes à peroxidação lipídica (Yoshida & Niki, 2003), os tocoferóis são os mais importantes antioxidantes presentes nos óleos vegetais (Schmidt & Pokorný, 2005). As quantificações dos tocoferóis (TOC) α , γ e δ para as diferentes condições experimentais de extração do óleo estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Quantificação dos tocoferóis (α , γ e δ) presentes no óleo de crambe (mg de TOC 100 g⁻¹ de óleo)

Condição experimental	α -tocoferol	γ -tocoferol	δ -tocoferol	Total*
40 °C e 80 bar	3,04 ± 0,16	118,00 ± 0,36	37,38 ± 0,06	158,41 ± 0,58 ^e
40 °C e 160 bar	2,69 ± 0,021	132,32 ± 1,63	5,22 ± 0,004	140,23 ± 1,65 ^f
80 °C e 80 bar	3,09 ± 0,02	171,57 ± 0,34	27,52 ± 0,25	202,18 ± 0,11 ^a
80 °C e 160 bar	2,95 ± 0,05	146,54 ± 1,20	25,28 ± 0,31	174,81 ± 1,56 ^b
60 °C e 120 bar	3,43 ± 0,01	155,04 ± 0,88	11,06 ± 0,05	169,53 ± 0,82 ^c
Hexano	2,63 ± 0,01	138,59 ± 1,58	22,19 ± 0,11	163,41 ± 1,67 ^d
Diclorometano	3,48 ± 0,05	95,00 ± 0,17	3,97 ± 0,007	102,35 ± 0,21 ^g

*letras iguais na mesma coluna indicam que as médias não diferem entre si ao nível de 5%.

Teores elevados de tocoferóis foram observados para o óleo de crambe. A concentração total de vitamina E variou entre 102,35 a 202,18 mg de TOC 100 g⁻¹ de óleo e a amostra extraída com propano a 80 °C e 80 bar apresentou o maior teor total em contraste à amostra extraída convencionalmente com diclorometano. O óleo apresentou maior conteúdo de γ , seguido do δ e do α -tocoferol.

3.2. Estabilidade Oxidativa e Ponto de Fusão

A análise de estabilidade oxidativa do óleo de crambe, conforme Tan *et al.* (2002), empregando um calorímetro diferencial de varredura (DSC) foi utilizada para a determinação do período de indução oxidativa na amostra de óleo extraída com propano subcrítico na condição de máxima temperatura e pressão empregadas, bem como nas amostras extraídas convencionalmente com hexano e diclorometano. Na Tabela 6 são apresentados os tempos de indução oxidativa (t_0) e as equações ajustas da relação entre T e t_0 .

Tabela 6 – Tempos de indução oxidativa do óleo de crambe

Solvente	Condições de extração		t_0 (min)				Regressão
	P (bar)	T (°C)	110 °C	120 °C	130 °C	140 °C	
Propano	160	80	420,2	265,2	155,2	77,5	T=217,86-40,70*log ₁₀ t ₀
Hexano	-	-	225,3	152,95	90,4	53,5	T=222,23-47,32*log ₁₀ t ₀
Diclorometano	-	-	90,2	35,0	22,9	-	T=172,06-32,14*log ₁₀ t ₀

Os resultados obtidos mostram que as condições de extração e o tipo de solvente empregado influenciam na estabilidade oxidativa do óleo de crambe, sendo que as amostras analisadas apresentaram diferenças significativas quanto ao tempo de indução oxidativa. Maiores tempos de indução oxidativa foram verificados para a amostra extraída com propano a 80 °C e 160 bar. Para as amostras extraídas convencionalmente com solventes orgânicos percebe-se que o diclorometano apresenta oxidação mais rápida para todas as temperaturas avaliadas e, quando submetido a 140 °C já

apresenta-se oxidado, não sendo possível avaliar o experimento nesta condição.

De forma geral, a extração com propano subcrítico forneceu um óleo de crambe mais estável à oxidação, podendo-se concluir que a composição em tocoferóis nas amostras de óleo está intimamente ligada à sua estabilidade oxidativa. A relação linear entre temperatura e tempo de oxidação proposta por Tan *et al.* (2002) representou adequadamente os resultados obtidos neste trabalho, apresentando coeficientes de determinação (R^2) superiores a 0,9.

O calorímetro também foi empregado na análise do ponto de fusão do óleo, sendo que durante o aquecimento do óleo variações endotérmica no fluxo de calor liberado pelo mesmo são considerados processos de fusão. Na tabela 7 são apresentadas as temperaturas referentes ao início, pico e final do processo de fusão do óleo, T_i , T_p e T_f , respectivamente.

Tabela 7 – Temperaturas do processo de fusão do óleo de crambe

Condição experimental	T_i (°C)	T_p (°C)	T_f (°C)
80 °C e 160 bar	-6,69	4,51	9,82
Hexano	-6,53	4,45	10,05
Diclorometano	-3,58	4,62	9,34

Embora a fusão completa do óleo aconteça em uma ampla faixa, verifica-se que as amostras apresentaram temperaturas semelhantes para o final do processo (T_f de aproximadamente 10 °C), na qual há o derretimento completo dos cristais. Pequenas variações na temperatura podem ser atribuídas às insaturações dos ácidos graxos (NASSU & GONÇALVES, 1994).

4. CONCLUSÕES

As amostras de óleo não apresentaram diferenças significativas quanto ao perfil dos ácidos graxos totais, sendo predominante no óleo o ácido erúico, seguido do ácido oleico, linoleico e linolênico. Apresentaram teores de ácidos graxos livres inferiores a 2% e o β -sitosterol é o fitosterol predominante no crambe. O óleo de crambe extraído com propano subcrítico apresentou teor mais elevado de vitamina E em relação aos óleos extraídos com hexano e diclorometano, sendo que este último apresentou a menor concentração. Nas análises de estabilidade oxidativa, o óleo extraído com propano subcrítico apresentou os maiores tempos de indução, fato relacionado à quantidade de ácidos graxos poliinsaturados e ao teor de tocoferóis. Quanto ao ponto de fusão, este varia em uma faixa de temperatura de aproximadamente -7 a 10 °C.

5. REFERÊNCIAS

ATABANI, A. E.; SILITONGAA, A. S.; ONGA, H. C.; MAHIAC, T. M. I.; MASJUKI, H. H.; BADRUDDINA, I. A.; FAYAZ, H. Non-edible vegetable oils: A critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, v.18, p. 211–245, 2013.

FALASCA, S. L.; FLORES, N.; LAMAS, M. C.; CARBALLO, S. M.; ANSCHAU, A. *Crambe abyssinica*: an almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. *Int.*

J. Hydrog. Energy, v. 35, p. 5808–5812, 2010.

FREITAS, L. S. Desenvolvimento de procedimentos de extração de óleo de semente de uva e caracterização química dos compostos extraídos. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 227 p. 2007. Tese (Doutorado em Química).

FREITAS, L. S.; OLIVEIRA, J. V.; DARIVA, C.; JACQUES, R. A.; CARAMÃO, E. B. Extraction of Grape Seed Oil Using Compressed Carbon Dioxide and Propane: Extraction Yields and Characterization of Free Glycerol Compounds. *J Agr. Food Chem.*, v. 56, p. 2558–2564, 2008.

GARCIA, V.A.S.; CABRAL, V.F.; ZANOELO, E.F.; SILVA, C.; CARDOZO-FILHO, L. Extraction of Mucuna seed oil using supercritical carbon dioxide to increase the concentration of l-Dopa in the defatted meal. *J. Supercrit. Fluids*, v. 69, p. 75–81, 2012.

LALAS, S.; GORTZI, O.; ATHANASIADIS, V. Full Characterisation of *Crambe abyssinica* Hochst. Seed Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v. 89, p. 2253–2258, 2012.

LECHNER, M.; REITER, B.; LORBEER, E. Determination of free and esterified sterols in potential new oil seed crops by coupled on-line liquid chromatography-gas-chromatography. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, v. 101, p. 171–177, 1999.

NASSU, R. T.; GONÇALVES, L. A. G. Avaliação de parâmetros térmicos de óleo de palma e seus derivados por calorimetria diferencial de varredura (DSC). *Quim. Nova*, v. 17, n.4, 1994.

OSAWA, C. C.; GONCALVES, L. A. G.; RAGAZZI, S. Titulação potenciométrica aplicada na determinação de ácidos graxos livres de óleos e gorduras comestíveis. *Quím. Nova* [online], v.29, n.3, p. 593–599, 2006.

PHILLIPS, K. M.; RUGGIO, D. M.; TOIVO, J. I.; SWANK, M. A.; SIMPKINS, A. H., Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *J. Food Compos. Anal.*, v. 15, 123–142, 2002.

PITOL, C.; BROCH, D. L.; ROSCOE, R. Tecnologia e produção: crambe. Maracaju: Fundação MS, 2010. 60 p.

SCHMIDT, S.; POKORNÝ, J. Potential application of oilseeds as sources of antioxidants for food lipids—a review. *Czech J. Food Sci.*, v. 23, p. 93–102, 2005.

SINGH, S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through de use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.*, v. 14, p. 200–216, 2010.

TAN, C. P.; CHE MAN, Y.B.; SELAMAT, J.; YUSOFF, M. S. A. Comparative studies of oxidative stability of edible oils by differential scanning calorimetry and oxidative stability index methods. *Food Chem.*, v. 76, p. 385–389, 2002.

WALKER, R.E. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society (Method AOCS Ce 2-66) (4th). Champaign: American Oil Chemists Society, 1990.

YOSHIDA, Y.; NIKI, E. Antioxidant effects of phytosterol and its components. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, v.49, p. 277–280, 2003.