**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Estabilidade oxidativa e avaliação sensorial de emulsões com extratos
de ervas antioxidantes**

Renata Cristina Casemiro

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2016**

Renata Cristina Casemiro
Bacharel em Ciências dos Alimentos

**Estabilidade oxidativa e avaliação sensorial de emulsão com extratos de ervas
antioxidantes**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:

Profa. Dra. **THAIS MARIA FERREIRA DE SOUZA VIEIRA**

Co-orientadora:

Profa. Dra. **MARTA HELENA FILLET SPOTO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2016

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Casemiro, Renata Cristina

Estabilidade oxidativa e avaliação sensorial de emulsões com extratos de ervas antioxidantes / Renata Cristina Casemiro. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016.

92 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Alecrim 2. Orégano 3. Tomilho 4. Oxidação lipídica 5. Antioxidantes naturais
6. Análise sensorial I. Título

CDD 664.06
C337e

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Ivonete e Gerson, que sempre estão presentes em todas as minhas conquistas, apoiando e incentivando a buscar os meus objetivos. Obrigada por todo amor, dedicação, confiança e incentivo.

Aos meus irmãos, Ricardo e Rafael, por todo o amor, conselhos e suporte ao longo da minha trajetória, presentes em todos os momentos da minha vida.

Ao meu namorado, Nilo, por todo seu companheirismo e amor, sempre paciente e amoroso, me incentivando a realizar meus sonhos e apoiando nas minhas decisões.

Às orientadoras Profa. Thais Maria Ferreira de Souza Vieira e Profa. Marta Helena Fillet Spoto, pela paciência, atenção e confiança para me orientar ao longo deste trabalho, auxiliando na minha formação científica e profissional.

Aos participantes da Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), que cederem seu tempo e disposição para realização das análises, tornando possível a conclusão de parte deste trabalho.

Aos professores Severino Matias de Alencar e Pedro Esteves Duarte Augusto pelo apoio para realização de parte dos ensaios laboratoriais.

As professoras Marta Regina Verruma Bernardi, Sandra Helena da Cruz, Solange Guidolin Canniatti Brazaca e Ana Paula Badan Ribeiro e a colega Paula Porrelli Moreira da Silva, pelas correções finais deste trabalhando, contribuindo para sua melhoria.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), pelo ensino de excelência, a qual tenho orgulho de ter cursado a graduação e agora o mestrado. Sou grata pela formação obtida.

Agradeço a todos, que de alguma maneira, contribuíram pela realização deste trabalho.

Por fim, agradeço a Deus, que me concedeu missões e forças para batalhar e vencer todos os obstáculos que surgiram no caminho.

MUITO OBRIGADA!

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e
nunca se arrepende.”*

Leonardo da Vinci

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 Objetivo Geral	16
Referências	16
2 OXIDAÇÃO LIPÍDICA: ANTIOXIDANTES NATURAIS PARA A CONSERVAÇÃO DE PRODUTOS DE BASE LIPÍDICA	19
Resumo	19
Abstract.....	19
2.1 Emulsões alimentícias e oxidação lipídica	19
2.2 Antioxidantes.....	21
2.2.1 Antioxidantes sintéticos.....	22
2.2.2 Antioxidantes naturais	24
2.2.3 Especiarias como fonte de antioxidantes naturais	26
2.3 Métodos para avaliar atividade antioxidante <i>in vitro</i>	27
2.3.1 Compostos fenólicos totais.....	27
2.3.2 Atividade sequestrante do radical DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazila)	28
2.3.3 Atividade sequestrante do radical ABTS (2,2-azinobis- (3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico).....	28
2.4 Métodos para avaliar a estabilidade oxidativa.....	29
2.4.1 Teste acelerado em estufa.....	30
2.4.2 Determinação da estabilidade oxidativa pelo Rancimat.....	31
2.5 Considerações finais	32
Referências	32
3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE ALECRIM, ORÉGANO E TOMILHO ADICIONADOS EM EMULSÕES	39
Resumo	39
Abstract.....	39
3.1 Introdução.....	40
3.2 ObjetivoS.....	41
3.3 Material e Métodos	41
3.3.1 Material.....	41
3.3.2 Preparo dos extratos	42

3.3.3 Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	42
3.3.3.1 Compostos fenólicos	42
3.3.3.2 Atividade antioxidante pelo método do DPPH	43
3.3.3.3 Atividade antioxidante pelo método ABTS	43
3.3.4 Preparo das emulsões, aplicação de teste acelerado e avaliação da capacidade antioxidante.....	44
3.3.5 Delineamento experimental	44
3.3.6 Análise estatística.....	45
3.4 Resultados e Discussão	45
3.4.1 Compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos.....	45
3.4.2 Aplicação dos extratos em emulsão lipídica	48
3.5 Conclusões	54
4 PERFIL SENSORIAL E ACEITAÇÃO DE EMULSÕES ADICIONADAS DE EXTRATOS DE ALECRIM E TOMILHO.....	59
Resumo.....	59
Abstract	59
4.2 Objetivo.....	62
4.3 Material e Métodos	62
4.3.1. Preparo das emulsões e extratos antioxidantes	62
4.3.2 Análise microbiológica	62
4.3.2.1 Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	62
4.3.3 Análise Sensorial – Análise Descritiva Quantitativa (ADQ).....	63
4.3.3.1 Recrutamento de julgadores.....	63
4.3.3.2 Seleção dos julgadores	64
4.3.3.3 Levantamento e agrupamento de atributos	65
4.3.3.4 Treinamento dos julgadores	67
4.3.4 Teste de aceitação	67
4.3.5 Análise estatística.....	68
4.4 Resultados e Discussão	69
4.4.1 Análise descritiva quantitativa	69
4.4.2 Perfil sensorial das amostras	80
4.4.3 Análise sensorial – Teste de aceitação com escala hedônica.....	82
4.5 Conclusões	84
Referências.....	84

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	87
ANEXO	89

RESUMO

Estabilidade oxidativa e avaliação sensorial de emulsão com extratos de ervas antioxidantes

A oxidação de produtos de base lipídica é um dos problemas enfrentados pela indústria alimentícia, resultando na formação de compostos indesejáveis que alteram as características sensoriais de alimentos lipídicos e reduzem sua qualidade nutricional. A incorporação de antioxidantes prolonga a vida útil dos produtos que contém lipídios em sua composição, retardando o processo de oxidação. Os antioxidantes utilizados pela indústria alimentícia são principalmente sintéticos, tais como o BHA, BHT, PG, e TBHQ. Entretanto, devido aos estudos sobre a possível toxicidade dos mesmos, o uso de antioxidantes naturais presentes em ervas e especiarias representa uma alternativa promissora. Visando encontrar alternativas aos antioxidantes sintéticos, neste trabalho foram utilizados extratos etanólicos de orégano (*Origanum vulgare* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.), que apresentam compostos fenólicos e atividade antioxidante em sistemas *in vitro*, em emulsões lipídicas. O objetivo foi avaliar a capacidade antioxidante dos extratos e suas misturas binárias e ternárias em um sistema modelo (emulsão alimentícia) e o impacto da adição de extratos de ervas sobre o perfil sensorial dos produtos testados. Através do acompanhamento do valor de índice de peróxido, observou-se que a adição de extrato de alecrim, bem como suas misturas com extrato de tomilho, em doses de até 200 mg.kg⁻¹ apresentaram proteção frente à oxidação das emulsões em condições aceleradas, com efeito semelhante à adição do antioxidante BHA. Em relação à análise sensorial descritiva, dos 13 atributos avaliados, dois apresentam diferença estatística entre amostras com antioxidantes naturais comparados ao antioxidante sintético, que são a aparência consiste e o sabor de ervas. Para teste de aceitação, emulsões adicionadas de misturas de extratos de tomilho e alecrim não deferiam de amostras adicionadas de BHA, indicando que não há alterações sensoriais perceptíveis nas doses utilizadas. Estes resultados demonstraram a promissora utilização de extratos de ervas em substituição ao uso de antioxidantes sintéticos.

Palavras-chave: Alecrim; Orégano; Tomilho; Oxidação lipídica; Antioxidantes naturais; Análise sensorial

ABSTRACT

Oxidative stability and sensory analysis of food emulsion with antioxidant herbal extracts

The oxidation of lipid-based products is one of the problems faced by the food industry, due to production of undesirable compounds that affect organoleptic characteristics of food lipid and their nutritional quality. Antioxidants added to food lipids avoid the oxidation process and prolong product the shelf life. The antioxidants used by the food industry are mainly synthetic such as BHA, BHT, PG, and TBHQ. However, due to the possible toxicological effects for human consumption, natural antioxidants present in herbs and spices represents a promising alternative. In this work ethanolic extracts obtained from dried oregano (*Origanum vulgare* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.), presenting high polyphenol content and *in vitro* antioxidant activity, were applied to a lipid model systems. This project aimed to evaluate the antioxidant capacity of binary and ternary mixtures of these extracts and the impact on sensory profile of tested products. Rosemary extracts and its mixtures with thym extracts added to emulsions subject in concentrations up to 200 mg.kg⁻¹ presented a effective protection under accelerated conditions, similar to the BHA effect. Regarding sensory description, according to Quantitative Descriptive Analysis (QDA) resulted only two from 13 evaluated attributes of emulsion added of herbal extracts showed significant difference when compared to BHA. However, there was no significant difference among emulsions added of natural and synthetic antioxidants when consumer test was applied. Results showed that rosmmary and thym extracts presents a high potential to replace BHA in food emulsions.

Keywords: Rosemary; Oregano; Thyme; Lipid oxidation; Natural antioxidants; Sensory analysis

1 INTRODUÇÃO GERAL

Um das principais preocupações em Tecnologia de Alimentos é a oxidação lipídica que ocorre nos alimentos, responsável pela formação de odores e sabores desagradáveis nos produtos que contém lipídios em sua composição, com consequente diminuição da segurança e qualidade nutricional causados pela formação de compostos potencialmente tóxicos. A prevenção é economicamente importante e fundamental para a proteção da saúde humana. O início da oxidação lipídica decorre da interação do oxigênio molecular com um iniciador, que pode ser luz, calor, radiação ionizante e íons metálicos, os quais ativaram o oxigênio, transformando-o em uma espécie reativa, que reagirá com o ácido graxo insaturado, ocasionando uma série de reações que levaram à formação dos compostos indesejáveis. Para aumentar a vida útil de produtos de base lipídica, retardando ou inibindo o processo de oxidação, são utilizados compostos químicos conhecidos como antioxidantes (BARRIUSO, ASTIASARÁN; ANSORENA, 2013; CHEN; MCCLEMENTS; DECKER, 2011; SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Os antioxidantes apresentam-se como uma alternativa para prevenir a deterioração oxidativa dos alimentos. Os antioxidantes mais utilizados pela indústria são os sintéticos, como o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroxi-quinona (TBHQ) e galato de propila (PG), de uso questionável devido a possível toxidez. Assim, pesquisas encontram-se voltadas para a busca de compostos naturais que exerçam a mesma função antioxidante (PAREDES-LÓPEZ et al., 2010; SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Diversas ervas e especiarias culinárias já foram relatadas na literatura por apresentarem atividade antioxidante, devido ao seu alto teor de compostos fenólicos, sugerindo, inclusive, potencial benéfico à saúde humana (CHAN et al., 2016; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007; YANG et al., 2016).

Além disso, a crescente preocupação do consumidor com a saúde tem levado ao aumento do interesse por produtos naturais, fundamentando as pesquisas de alternativas aos antioxidantes (produtos sintéticos).

Considerando essa nova demanda da população por produtos naturais e o potencial do uso de ervas e especiarias, o estudo destes produtos se faz necessário de forma a encontrar as melhores condições de aplicação em alimentos lipídicos. Neste trabalho a possibilidade de substituição de antioxidante sintético por extratos de ervas ricos em antioxidantes foi estudado.

O capítulo 1 foi composto desta introdução geral e dos objetivos gerais deste trabalho.

O capítulo 2 consiste em uma revisão bibliográfica sobre a oxidação lipídica e os meios de retardar este processo através da aplicação de antioxidantes naturais em substituição aos antioxidantes sintéticos utilizados pela indústria.

No capítulo 3 estão apresentados a atividade antioxidante *in vitro* de extratos de alecrim, orégano e tomilho e a capacidade antioxidante destes extratos e suas misturas binárias em emulsões óleo em água. Com a aplicação de delineamento experimental e análise de superfícies de resposta foram definidas as doses combinações com maior desempenho para aplicação em emulsões.

O capítulo 4 apresenta uma avaliação do impacto da adição dos extratos de ervas sobre o perfil sensorial dos produtos de base lipídica (emulsões), utilizando a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) e o Teste de Aceitação com escala hedônica.

1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é avaliar a estabilidade oxidativa, a partir de análises físico-químicas, produtos de base lipídica, adicionados de antioxidantes naturais e suas misturas, extraídos de ervas aromáticas (alecrim, orégano e tomilho). Posteriormente às análises físico-químicas, foram avaliados o perfil sensorial (Análise Descritiva Quantitativa) e a aceitação (Teste hedônico) das emulsões com os melhores antioxidantes.

Referências

BARRIUSO, B.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. **European Food Research Technology**, Berlin, v. 236, p. 1-15, 2013.

CHAN, C.L.; GAN, R.Y.; CORKE, H. The phenolic composition and antioxidant capacity and bound extracts in selected dietary spices and medicinal herbs. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 565-573, 2016.

CHEN, B.C.; MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Minor components in food oils: a critical review of their roles on lipid oxidation chemistry in bulk oils and emulsions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 51, n. 10, p. 901-916, 2011.

MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes naturais da família Lamiaceae. aplicação em produtos alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.

PAREDES-LÓPEZ, O.; CERVANTES-CEJA, M. L.; VIGNA-PÉREZ, M.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life: a review. **Plant Foods Human Nutrition**, Dordrecht, v. 65, n. 3, p. 299–308, 2010.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, London, v. 39, n. 11, p. 4067–4079, 2010.

YANG, Y.; SONG, X.; SUI, X.; QI, B.; WANG, Z.; LI, Y.; JIANG, LIANZHOU. Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 80, p. 141–147, 2016.

2 OXIDAÇÃO LIPÍDICA: ANTIOXIDANTES NATURAIS PARA A CONSERVAÇÃO DE PRODUTOS DE BASE LIPÍDICA

Resumo

A oxidação lipídica é responsável por produzir compostos indesejáveis que alteram a qualidade sensorial e nutricional dos alimentos, tornando necessário o uso de antioxidantes para retardar este processo. Devido à tendência mundial por alimentos naturais e a crescente preocupação dos consumidores em relação a saúde, estudos tem sido voltado para o uso de antioxidantes naturais em substituição aos artificiais utilizados hoje pela indústria alimentícia. Este capítulo apresenta uma revisão bibliográfica sobre o uso dos antioxidantes naturais presentes em ervas e especiarias.

Palavras-chave: Oxidação lipídica; Antioxidantes naturais; Antioxidantes sintéticos; Ervas; Compostos fenólicos

Abstract

The lipid oxidation produces undesirable compounds that affect the sensory and nutritional quality of food, making it necessary the use of antioxidants to slow down this process. Due to the global trend for natural foods and the growing concern of consumers regarding health, studies have been focused on the use of natural antioxidants in place of artificial used today by the food industry. This chapter presents a review on natural antioxidants in herbs and spices and their use in food industry.

Keywords: Lipid oxidation; Natural antioxidants; Synthetic antioxidants; Herbs; Phenolic compounds

2.1 Emulsões alimentícias e oxidação lipídica

Um dos produtos susceptíveis à oxidação lipídica são as emulsões. Uma emulsão consiste em dois líquidos imiscíveis, normalmente água e óleo, em que pequenas gotas (fase dispersa) são dispersas em uma fase contínua, estabilizadas pela presença de agentes emulsificantes localizados na interface óleo/água (FRANGE; GARCIA, 2009).

As emulsões simples podem ser classificadas em dois tipos: água em óleo (A/O), em que gotículas de água estão dispersas na fase contínua oleosa; e óleo em água (O/A), na qual gotículas de óleo estão dispersas na fase contínua aquosa. Alguns exemplos de emulsões O/A são maionese, leite, sopas e molhos. Exemplos de emulsão A/O são margarina e manteiga (MERRYWEATHER et al., 2005; ROBINS; WATSON; WILDE, 2002).

Um dos problemas relacionados à vida útil de emulsões alimentícias é a oxidação lipídica. A oxidação ocasiona alterações de sabores e odores, tornando os alimentos impróprios para o consumo, além de levar a alterações nutricionais pela degradação de

vitaminas e ácidos graxos essenciais, e formação de compostos tóxicos (RAMALHO; JORGE, 2006). Nos óleos e gorduras comestíveis, a oxidação lipídica representa a principal causa de deterioração (HRAS et al., 2000). Ocorre principalmente durante o processamento e armazenagem e resulta em alterações dos principais parâmetros de qualidade, como a cor, e na produção de compostos voláteis responsáveis pela formação de sabores e odores desagradáveis (*off flavors*). Afeta também o valor nutritivo, pela inativação de vitaminas (A, D, E, K e C) e modificação na estrutura de ácidos graxos essenciais, clorofilas, carotenos, aminoácidos, proteínas e enzimas (HRAS; HADOLIN; BAUMAN, 2000; NOGALA-KALUCKA et al., 2005; TSAI et al., 2005).

A oxidação lipídica consiste na reação de oxigênio molecular com ácidos graxos insaturados. Seu desenvolvimento ocorre a partir da formação de radicais livres, resultantes da abstração de um átomo de hidrogênio de um ácido graxo insaturado. Os radicais livres reagem com o oxigênio, levando à formação de hidroperóxidos, que por sua vez se decompõem em compostos responsáveis pelo sabor e odor de ranço. A maioria destes compostos, denominados produtos secundários de oxidação, produzem efeitos biológicos e alterações sensoriais indesejáveis, tornando fundamental seu controle (BARRIUSO; ASTIASARÁN; ANSORENA, 2013; SHAHIDI; JANITHA; WANASUNDARA, 1992).

Os lipídios são susceptíveis ao processo de oxidação na presença de iniciadores catalíticos, tais como luz, calor, enzimas, metais, metaloproteínas e microrganismos, dando origem ao desenvolvimento de características sensoriais desagradáveis, perda de aminoácidos essenciais, vitaminas e outros compostos bioativos (SKAICH, 2005).

O processo de oxidação lipídica ocorre através de uma reação em cadeia, dividida em três fases: iniciação, propagação e terminação (BERTON-CARABIN; ROPERS; GENOT, 2014, REGINATO-D'ARCE, 2006), conforme esquema apresentado na Figura 1.

Figura 1 - Esquema geral da auto-oxidação lipídica

Legenda: LH= ácido graxo insaturado, L*= radical livre, LOO*= radical peróxido

Fonte: Adaptado de Berton-Carabin, Ropers e Genot (2014)

Inicialmente são formados os produtos primários de oxidação, radicais peróxidos e hidroperóxidos. Na iniciação, com a presença de catalisadores (luz, metal, entre outros), os ácidos graxos insaturados (LH) perdem um átomo de hidrogênio, formando um radical livre (L^*) (BERTON-CARABIN; ROPERS; GENOT, 2014; SHAHIDI; ZHONG, 2010). Na propagação, os radicais livres formados na fase anterior (L^*), reagem rapidamente com os oxigênios tripletes, gerando radicais peróxidos (LOO^*). Estes radicais peróxidos são instáveis, retirando átomos de hidrogênios de outros ácidos graxos insaturados, formando hidroperóxidos e outros radicais livres, levando a uma reação em cadeia (BERTON-CARABIN; ROPERS; GENOT, 2014; SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Na fase final, terminação, os radicais formados na etapa anterior reagem em conjunto, formando produtos estáveis (compostos secundários) como aldeídos, álcoois, cetonas, hidrocarbonetos, os quais são voláteis e responsáveis pelas características sensoriais desagradáveis (SHAHIDI; ZHONG, 2010; BERTON-CARABIN; ROPERS; GENOT, 2014).

A oxidação lipídica limita a vida útil dos alimentos, pois possui um efeito indesejado sobre as qualidades tecnológicas, sensoriais e nutricionais, provocando perdas econômicas para a indústria alimentícia. Além disto, estudos demonstram que os produtos gerados a partir da oxidação lipídica podem danificar as células do organismo humano, contribuindo para o desenvolvimento de doenças como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas. Uma das estratégias utilizadas pela indústria de alimentos para reverter a oxidação é a aplicação de antioxidantes (BERTON-CARABIN; ROPERS; GENOT, 2014; SOARES et al., 2012).

2.2 Antioxidantes

Antioxidantes são substâncias capazes de inibir ou retardar a oxidação lipídica (ZHENG; WANG, 2001). Com relação aos alimentos, podemos definir os antioxidantes como uma substância que, em pequenas quantidades, é capaz de prevenir ou retardar a deterioração oxidativa de materiais facilmente oxidáveis (BECKER; NISSEN; SKIBSTED, 2004).

O efeito dos antioxidantes em retardar a oxidação lipídica tem sido relatado desde séculos passados. Os primeiros relatos sobre o uso de antioxidantes em alimentos foram sobre suas fontes naturais. Em 1843, Deschamps estudando pomadas feitas a partir de banha fresca de porco, observou que ao adicionar goma *benzoin* (contém vanilina) ou *populin* (contém partes polares), o produto não se tornou rançoso, diferente do que ocorreu com banha de porco sem adição destes componentes.

Nos alimentos lipídicos, os antioxidantes retardam o início da oxidação ou reduzem a velocidade em que ela acontece. O seu papel não é aumentar ou melhorar a qualidade dos alimentos, mas mantê-la e prolongar a sua vida útil (REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

Os antioxidantes podem ser divididos de acordo com seu mecanismo de ação em primários e secundários (LUZIA; JORGE, 2009). Os antioxidantes primários são aqueles capazes de interromper a cadeia de radicais, por meio da doação de um hidrogênio ao radical livre, tornando-o inativo. O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é sequestrado pelos radicais livres com mais facilidade que o hidrogênio das moléculas de ácido graxo. O radical proveniente do antioxidante é estabilizado por ressonância, possuindo baixa reatividade. Assim, os radicais livres tornam-se inativos e o antioxidante estável, interrompendo a reação em cadeia. Como exemplo de antioxidantes primários, podemos citar o BHA, BHT, TBHQ e PG (ANDREO; JORGE, 2006; LUZIA; JORGE, 2009; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

Já os antioxidantes secundários não agem diretamente sobre os radicais livres, mas são capazes de reduzir o processo de oxidação por diferentes mecanismos, que incluem complexação com metais, sequestro de oxigênio, decomposição de hidroperóxidos para formar espécie não radical, absorção da radiação ultravioleta ou desativação de oxigênio singlete. Como exemplo de antioxidantes secundários, podem ser citados o ácido ascórbico, ácido cítrico, fosfatos e sais de ácido etileno diaminotetracético (EDTA) (ANDREO, JORGE, 2006; LUZIA; JORGE, 2009; RAMALHO; JORGE 2006; REISCHE; LILLARD, EITENMILLER, 2008; ZHENG; WANG, 2001).

Entre os antioxidantes que atuam na eliminação de radicais livres, estão os antioxidantes sintéticos, como o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), e terc-butil-hidroxi-quinona (TBHQ), os quais normalmente exibem elevada atividade antioxidante, sendo muito utilizados pela indústria alimentícia. Entretanto, a utilização de antioxidantes sintéticos está sendo limitada por preocupações dos consumidores sobre o seu impacto negativo à saúde (CHEN; MCCLEMENTS; DECKER, 2011; SHAHIDI; ZHONG, 2010).

2.2.1 Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes mais utilizados pela indústria alimentícia são os antioxidantes sintéticos como o BHA, BHT, TBHQ e PG (Figura 2) (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Figura 2 - Estrutura química dos antioxidantes sintéticos

Fonte: Shahidi e Zhong (2010)

A estrutura dos antioxidantes sintéticos permite a doação de um próton a um radical livre formado no processo de oxidação, interrompendo a reação que posteriormente levaria a formação de compostos indesejáveis que alteram as características sensoriais e nutricionais dos alimentos (OMURA, 1995).

Estudos epidemiológicos apontam que a ingestão de antioxidantes sintéticos pode acarretar risco para a saúde do consumidor por apresentarem efeito tóxico (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Masui et al. (1986), estudando os efeitos de BHA (doses de até 2%) em ratos e hamsters por até 104 semanas, observaram o desenvolvimento de carcinomas em ambos os animais em diferentes tempos do experimento, associando o consumo do BHA com o surgimento de câncer.

Segundo Park et al. (1990) em estudos com peixes, os quais ingeriam doses de 0,01 a 0,8% de BHA por 12 dias, observaram o desenvolvimento de tumores de fígado em todas as concentrações estudadas, relacionando a ingestão do BHA com o desenvolvimento de câncer hepático. Seguindo essa linha de estudo, Bauer et al. (2001), estudando duas linhagens de ratos, relataram que a ingestão de BHT provocou inflamações e formação de tumores na linhagem de ratos BALB.

Adicionalmente aos estudos que relacionaram o uso de antioxidantes sintéticos aos riscos à saúde de animais, surge a tendência de consumidores que estão cada vez mais exigentes, buscando por alimentos que além de serem sensorialmente atraentes, sejam também seguros e saudáveis (HOSSAIN et al., 2008; PAREDES-LÓPEZ et al., 2010).

Assim, estudos vêm sendo dirigidos para produtos naturais que possuam atividade antioxidante, permitindo a substituição de substâncias sintéticas por produtos de base natural, ou a combinação dos dois tipos, com intuito de diminuir a quantidade de aditivos sintéticos nos alimentos (RAMALHO; JORGE, 2006; POYATO et al., 2013). Entre estes possíveis potenciais antioxidantes, encontramos extratos de plantas como alecrim e a sálvia (RAMALHO; JORGE, 2006; VALENZUELA; SANHUEZA; NIETO, 2003).

No Brasil, o uso de antioxidantes é regulamentado pelo Ministério da Saúde, resolução número 22/77, decreto-lei 986, que permite a adição de $0,02 \text{ g.100g}^{-1}$ de óleo de BHA e TBHQ e $0,01 \text{ g.100g}^{-1}$ de óleo de BHT como máxima concentração antioxidante (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2005a).

2.2.2 Antioxidantes naturais

Os antioxidantes naturais podem ser encontrados em frutas, sementes, cereais e plantas medicinais. A atividade antioxidante destes alimentos está aliada à presença dos compostos fenólicos. As diferentes classes dos compostos fenólicos, podem reagir individualmente ou em sinergia, atribuindo o efeito de defesa contra o ataque de radicais livres (OLIVEIRA et al., 2009; REISCHE; LILLARD; EITENMILLER, 2008).

Os compostos fenólicos são os antioxidantes mais representativos do reino vegetal, e podem ser quimicamente definidos como substâncias que possuem um ou mais anéis aromáticos com grupos hidroxila. Eles são classificados de acordo com sua estrutura e peso molecular como ácidos fenólicos, estilbenos, flavonóides (catequinas, flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonas e antocianinas), taninos e lignanas (Figura 3) (DEL RÉ; JORGE, 2012; PAREDES-LÓPEZ et al., 2010).

Figura 3 - Classificação dos compostos fenólicos

Fonte: Adaptado de Paredes-López et al. (2010)

Os compostos fenólicos exibem várias propriedades fisiológicas como antialérgica, antiarteriogênica, antiinflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora, mas o principal efeito dos compostos fenólicos tem sido atribuído à ação antioxidante em alimentos (BALASUNDRAM et al., 2006).

O principal mecanismo de ação presente nos compostos fenólicos é a inativação de radicais livres, que reduz a produção de espécies reativas, interrompendo a fase de propagação da autoxidação lipídica (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2009), sendo denominados antioxidantes primários (REISCHE, 1998).

A atividade antioxidante deve-se principalmente as características redutoras e estrutura química, agindo na inibição da oxidação através do sequestro de radicais livres e quelação com metais de transição. O radical formado pela reação dos compostos fenólicos com os antioxidantes apresenta baixa reatividade devido à estabilização que a ressonância do anel aromático proporciona (CHUN et al., 2005; HASLAM, 1996).

2.2.3 Especiarias como fonte de antioxidantes naturais

Especiarias são os produtos constituídos de partes (raízes, rizomas, bulbos, cascas, folhas, flores, frutos, sementes, talos) de uma ou mais espécies vegetais, tradicionalmente utilizadas para agregar sabor ou aroma aos alimentos e bebidas (ANVISA, 2005b).

As ervas e especiarias são uma das principais fontes de antioxidantes naturais na dieta humana. A atividade antioxidante das especiarias está relacionada, principalmente, com a presença de compostos fenólicos (CHAN et al., 2016). Estes são os antioxidantes mais representativos do reino vegetal, sendo definidos quimicamente como substâncias que possuem um anel aromático com uma ou mais hidroxilas; que podem também apresentar outros grupos substituintes em sua estrutura, como ésteres, metil-ésteres e glicosídeos (DEL RÉ; JORGE, 2012).

Os compostos fenólicos, além de apresentarem atividades antioxidantes, são eficazes na prevenção de doenças apresentando atividades antialérgicas, antiinflamatórias, antimicrobianas, antitrombóticas e vasodilatadoras. Entretanto, sua principal função é atribuída ao controle das reações de oxidação, prolongando a vida de prateleira dos alimentos (HOSSAIN et al., 2008; BALASUNDRAM et al., 2006).

A família Labiatae é uma das principais famílias de ervas e especiarias com potencial antioxidante. Compreende 150 gêneros com aproximadamente 3.500 espécies, nativas principalmente do Mediterrâneo, embora algumas tenham origem na Austrália, Sudoeste da Ásia e América do Sul. Dentre as principais espécies desta família estão o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), o orégano (*Origanum vulgare*) e o tomilho (*Thymus vulgaris*) (JUSTOS et al., 2008; MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

O alecrim apresenta atividade antioxidante atribuída principalmente à presença de compostos fenólicos como os flavonoides, os ácidos fenólicos e os diterpenos fenólicos, tais como o ácido carnósico e o carnosol (hidrofóbicos) e o ácido rosmarínico e o rosmanol (hidrofílicos) (Tabela 1 e Figura 4) (JUSTO et al., 2008; PIZZALE, 2002).

Para o tomilho, os principais antioxidantes encontrados são o timol, eugenol e carvacrol (Tabela 1 e Figura 4). Em estudos com extratos de tomilho, estes compostos apresentaram elevada atividade antioxidante quando comparados com os antioxidantes mais conhecidos, como o BHT e α -tocopherol (LEE et al., 2005).

Brewer (2011), encontrou como principais componentes antioxidantes do orégano o ácido rosmarínico, timol e carvacrol (Tabela 1 e Figura 4).

Tabela 1 - Compostos antioxidantes identificados em ervas

Especiarias	Diterpenos fenólicos			Ácidos fenólicos		Fenilpropanoides		
	Rosmanol	Carnósico	Carnasol	Rosmarínico	Cafeico	Timol	Eugenol	Carvacrol
Alecrim	X	X	X	X				
Orégano				X		X		X
Tomilho						X	X	X

Fonte: Adaptado de Brewer (2011)

Figura 4 - Estrutura química dos principais antioxidantes naturais presentes em especiarias

Fonte: Del Ré e Jorge (2012)

As especiarias apresentam-se como uma alternativa para o uso de antioxidantes sintéticos. Assim, torna-se necessário estudos que além de identificar a presença dos antioxidantes em extratos de ervas, defina sua capacidade antioxidante *in vivo*, e, também, o perfil sensorial e a aceitação dos produtos adicionados destes extratos.

2.3 Métodos para avaliar atividade antioxidante *in vitro*

2.3.1 Compostos fenólicos totais

Dentre os métodos utilizados para quantificar os compostos fenólicos totais nos alimentos encontramos o método que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu. Este método baseia-se na redução do ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico pelas hidroxilas fenólicas, produzindo

um complexo de coloração azul, que pode ser identificado em comprimento de onda entre 620 e 740 nm. O número de grupos hidroxilas ou grupos potencialmente oxidáveis presentes no meio reacional controla a quantidade de cor formada. As moléculas reduzidas são azuis e as não reduzidas são amarelas, permitindo a detecção dos fenóis (ANGELO; JORGE, 2007; SCHOFIELD; MBUGUA; PEEL, 2001). Apesar de ser uma metodologia para determinação do teor de compostos fenólicos, muitos autores a classificam como indicador de atividade antioxidante.

2.3.2 Atividade sequestrante do radical DPPH (2,2-Difenil-1-picrilhidrazila)

Esta análise consiste na capacidade de redução do radical DPPH diante da presença de antioxidantes. Ao receber um átomo de hidrogênio do antioxidante, o radical DPPH sofre redução mudando de coloração, a qual pode ser detectada por método espectrofotométrico, através da leitura de absorbância (Figura 5).

A porcentagem remanescente de DPPH é proporcional a concentração de antioxidante presente no meio. DPPH é considerada uma análise de transferência de elétrons (EMBUSCADO, 2015).

Figura 5 - Reação química do radical DPPH e um antioxidante

Fonte: Adaptado de Bois (1958) e Molineux (2004)

O método DPPH é um dos mais utilizados para determinar a capacidade antioxidante de um composto em capturar radicais livres, por ser considerado prático, rápido e estável (ESPIN et al., 2000).

2.3.3 Atividade sequestrante do radical ABTS (2,2-azinobis- (3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico)

Esta metodologia consiste na reação do radical ABTS com o antioxidante. Ao adicionar persulfato de potássio, o radical ABTS reage e é oxidado a um radical catiônico,

que apresenta coloração verde/azul, podendo ser quantificado em espectrofotômetro, com leitura de absorbância em comprimento de onda de 734 nm. Na presença do antioxidante, este radical catiônico é reduzido, promovendo a perda da coloração do meio reacional. Assim, a porcentagem de inibição do radical catiônico ABTS é determinada em função do Trolox, um padrão submetido as mesmas condições de análise do antioxidante (Figura 6) (RE et al., 1999).

Figura 1 - Redução do radical ABTS por um antioxidante

Fonte: Rufino et al. (2007)

2.3.4 FRAP (Ferric reducing antioxidant power)

Este método baseia-se na redução do complexo férrico (Fe^{3+}) - 2,4,6 - tripiridyl-s-triazine (TPTZ) ao complexo ferroso (Fe^{2+}), em condições de baixo pH, para que seja possível a solubilidade do ferro. Esta redução acarreta na formação de coloração azul, que pode ser quantificada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 593 nm. Os resultados são expressos em equivalente em micromoles de Trolox/grama de amostra (em base seca) ou equivalente em milimols de Fe^{2+} /Kg, entretanto é uma metodologia aplicável apenas em meios aquosos (BENZIE; STRAIN, 1996; KARADAG et. al., 2009).

2.3.4 ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Este método consiste no uso de marcadores fluorescentes oxidáveis e 2,2-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) como um gerador de radical peroxila. Este método determina a capacidade do antioxidante em inibir o radical peroxila, através da transferência de um átomo de hidrogênio. A capacidade antioxidante é calculada pela perda de fluorescência em leitura de espectrofotômetro a 565 nm, comparando com um padrão, que

geralmente é o Trolox. Os resultados são expressos μM de Trolox/L ou g de amostra (OU; HAMPSCH-WOODILL; PRIOR, 2001).

2.4 Métodos para avaliar a estabilidade oxidativa

Há diversos métodos para avaliar o estado de oxidação dos alimentos. Os mais utilizados são os que medem a formação de compostos primários e secundários de oxidação, baseando-se no monitoramento dos produtos resultantes, como os hidroperóxidos, dienos e trienos conjugados, compostos voláteis, entre outros (ANTOLOVICH et al., 2002; SILVIA; BORGES; FERREIRA, 1999). A determinação do estado de oxidação de produtos lipídicos pode ser realizada sob condições normais de armazenamento; as quais demandam longos períodos de estudos; ou sob condições aceleradas (GRAY, 1985). Estas exigem menor tempo para obtenção dos dados e equipamento simples, sendo considerada de grande importância para a indústria alimentícia.

Assim, para avaliar a estabilidade oxidativa de produtos lipídicos, são utilizados os testes acelerados, os quais consistem em acelerar as reações de oxidação, através da elevação da temperatura, adição de metais, aumento do nível de oxigênio, estocagem sob luz e agitação. Dentre os métodos acelerados, o mais utilizado é o teste de estufa ou *Schaal Oven Test* (ANTOLOVICH et al., 2002; ANTONIASSI, 2001; FRANKEL, 1993).

2.4.1 Teste acelerado em estufa

Consiste em armazenar as amostras em estufa a temperatura constante. Em determinados intervalos de tempo, as amostras são avaliadas quanto ao nível de oxidação. As temperaturas entre 40° e 60° C acarretam em resultados mais confiáveis diante da estabilidade dos sistemas lipídicos e eficácia dos antioxidantes (FRANKEL, 1993). De acordo com Kristott (2000), a cada dia de armazenamento a 65° C pode ser equivalente a um mês de armazenamento à temperatura ambiente. Essa relação somente poderá ser confirmada quando são desenvolvidos ensaios em condições reais de armazenamento. Entretanto, o teste em estufa pode ser adaptado aos diferentes tipos de amostras e combinações de tempo e temperatura para verificação da progressão da oxidação.

A oxidação lipídica envolve a formação contínua de hidroperóxidos (produtos primários), que ao reagirem levarão a formação dos produtos secundários (aldeídos, cetonas, hidrocarbonetos). Portanto, a determinação do índice de peróxido (IP) é um indicador do

estágio inicial de oxidação, pois este parâmetro representa o conteúdo total de hidroperóxidos e peróxidos de hidrogênio formados durante a reação (ANTOLOVICH et al., 2002; KRISTOTT, 2000; LI et al., 2013).

O índice de peróxido é um dos indicadores de qualidade mais utilizados para medir a oxidação de óleos e gorduras durante o processamento e armazenamento. Dentre os métodos utilizados, há o método iodométrico, recomendado pela AOCS (AMERICAN OIL CHEMISTS'S SOCIETY, 2003), que apresenta limitações relacionadas à grande quantidade de amostra requerida e à dificuldade de determinação do ponto de viragem. O método espectrofotométrico, baseado na habilidade de hidroperóxidos em oxidar íons ferrosos formando complexos de coloração vermelha, os quais exibem absorbância em comprimento de onda 500-510 nm, apresenta vantagens como pequena quantidade de amostra e maior precisão (KIOKIAS et al., 2010; SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Outros compostos resultantes da oxidação, como dienos e trienos conjugados, teor de aldeídos, dentre outros, também podem ser determinados. No entanto, a identificação do estágio oxidativo de amostras antes da formação de compostos secundários é altamente desejável (ANTOLOVICH et al., 2002; KRISTITT et al., 2000).

A análise sensorial é de extrema importância para avaliar se um alimento é bem aceito ou não pelo consumidor (CURVELIER; RICHARD, BERSET, 1996). Neste tipo de análise, são avaliados atributos referentes a aparência, sabor, aroma e textura dos alimentos. Esta avaliação é feita através do emprego de métodos de análise sensorial, ferramenta importante no desenvolvimento de produtos alimentícios, que utiliza os órgãos dos sentidos humanos, relatando a sensação ao observar e degustar um alimento (CANEPPELE et al., 2000).

A avaliação sensorial é uma metodologia útil e sensível para avaliar o estado oxidativo, entretanto, para resultados precisos, depende de treinamento da equipe sensorial (ANTONIASSI, 2001). Quando aplicada com julgadores treinados, permite acompanhar o aparecimento progressivo dos produtos de degradação dos lipídios, causadores dos *off flavors* ou *off odors*. Ela é responsável por medir o que o consumidor percebe de um determinado produto, relatando sua aceitação diante do mesmo (SILVIA; BORGES; FERREIRA, 1999).

2.4.2 Determinação da estabilidade oxidativa pelo Rancimat

Este método consiste em submeter uma amostra a oxidação forçada através da injeção de fluxo de ar contínuo e temperatura elevada (em torno de 100°C). A amostra é oxidada, levando à formação dos compostos primários e compostos secundários de oxidação. Parte destes compostos são voláteis, sendo coletados em um frasco contendo água destilada. Os

compostos que apresentam baixo peso molecular alteram a condutividade da água, a qual é medida continuamente. O período de indução é determinado no ponto de inflexão em que a condutividade aumenta exponencialmente. Quanto maior o período de indução, maior é a estabilidade da amostra perante a oxidação acelerada, portanto, menos susceptível (KRISTOTT, 2000; SILVIA; BORGES; FERREIRA, 1999).

2.5 Considerações finais

A reação de oxidação é responsável por alterações indesejáveis nos alimentos lipídicos. Para retardar tal processo, a indústria alimentícia faz o uso de antioxidantes. Os mais utilizados são os antioxidantes sintéticos, os quais são relatados como potencialmente tóxicos, tornando necessária a busca por alternativas, surgindo então pesquisas voltadas para os efeitos dos antioxidantes naturais.

É notória a demanda por estudos que relatem a eficiência de antioxidantes naturais em comparação com os sintéticos atualmente utilizados pela indústria. Entretanto, além do desempenho em retardar o processo oxidativo, a interferência sensorial que antioxidantes a base de ervas e especiarias pode causar aos alimentos deve ser avaliada. A análise sensorial é de extrema importância para avaliar o potencial de substituição dos antioxidantes sintéticos pelos naturais.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC N° 23, de 15 de fevereiro de 2005. Aprova o “regulamento técnico do uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos óleos e gorduras – subcategoria creme vegetal e margarinas”. **Diário Oficial da União**; Brasília, de 15 fev. 2005a.

_____. Resolução RDC nº 276, de 22 de setembro de 2005. Aprova o "Regulamento técnico para especiarias, temperos e molhos". **Diário Oficial da União**; Brasília, 23 set. 2005b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>.

AMERICAN OIL CHEMISTS SOCIETY. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society**. 5th ed. Champaign, 2003. 1200 p.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

ANGELO, P.M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analytst**, London, v. 127, n. 1, p. 183-198, 2002.

ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 2, p. 353-380, 2001.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial byproducts: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, Barking, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.

BARRIUSO, B.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. A review of analytical methods measuring lipid oxidation status in foods: a challenging task. **European Food Research Technology**, Berlin, v. 236, p. 1-15, 2013.

BAUER, A.K.; DWYER-NIELD, L.D.; HANKIN, J.A.; MURPHY, R.C.; MALKINSON, A.M. The lung tumor promoter, butylated hydroxytoluene (BHT), causes chronic inflammation in promotion-sensitive BALB/cByJ mice but not in promotion-resistant CXB4 mice. **Toxicology**, Limerick, v. 169, n. 1, p. 1-15, 2001.

BECKER, E.M.; NISSEN, L.R.; SKIBSTED, L.H. Antioxidant evaluation protocols: food quality and health effects. **European Food Research Technology**, Berlin, v. 219, n. 6, p. 561-571, 2004.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, n.1, p.70-76, 1996.

BERTON-CARABIN, C.C.; ROPERS, M.H.; GENOT, C. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: involvement of the interfacial layer. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 13, n. 5, p. 945-977, 2014.

BREWER, M.S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 10, p. 221-247, 2011.

CANEPPELE, M.A.B.; CANEPPELE, C.; MUSIS, C.R.D.; SANTOS, P. Avaliação da qualidade sensorial de manga passa obtida sob diferentes formas de processamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 128-133, 2000.

CHAN, C.L.; GAN, R.Y.; CORKE, H. The phenolic composition and antioxidant capacity and bound extracts in selected dietary spices and medicinal herbs. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v. 51, n. 3, p. 565-573, 2016.

CHEN, B.C.; MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Minor components in food oils: a critical review of their roles on lipid oxidation chemistry in bulk oils and emulsions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 51, n. 10, p. 901-916, 2011.

CHUN, S.S.; VATEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, London, v. 40, n. 2, p. 809-816, 2005.

CUVELIER, M.E.; RICHARD, H.; BERSET, C. Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 73, n. 5, p. 645-652, 1996.

DEL RÉ, P.V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.

EMBUSCADO, M.E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants: a mini review. **Journal of Functional Foods**, Hunt Valley, v. 18, p. 811-819, 2015.

ESPIN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J.; GARCÍA-VIGUERA, C. Anthocyanin-based natural colorants: a new source of antiradical activity for foodstuff. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 5, p. 1588-1592, 2000.

FRANGE, R.C.C.; GARCIA, M.T.J. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 30, n. 3, p. 263-271, 2009.

FRANKEL, E.N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 4, n. 7, p. 220-225, 1993.

GRAY, J.I. Simple chemical and physical methods for measuring flavor quality of fats and oils. In: MIN, D.B.; SOMOUSE, T.H. **Flavor chemistry of fats and oils**. Champaign: AOCS, 1985. chap. 12, p. 223-240.

HRAS, A.R.; HADOLIN, M.; KNEZ, Z.; BAUMAN, D. Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α -tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. **Food Chemistry**, Barking, v. 71, n. 2, p. 229-233, 2000.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 48, n. 59, p. 205-215, 1996.

HOSSAIN, M.; BRUNTON, N.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A.B.; WILKINSON, M. Antioxidant activity of spice extracts and phenolics in comparison to synthetic antioxidants. **Rasayan Journal of Chemistry**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 751-756, 2008.

JUSTOS, O.R.; MORAES, A.M.; BARRETO, G.P.M.; MERCADANTE, A.Z.; ROSA, P.T.V. Avaliação do potencial antioxidante de extratos ativos de plantas obtidos por extração com fluido supercrítico. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1699-1705, 2008.

KIOKIAS, S.; VARZAKAS, T.H.; ARVANITOYANNIS, I.S.; LABROPOULOS, A.E. Lipid oxidation and control of oxidation. In: YILDIZ, F. (Ed.). **Advances in food biochemistry**. Boca Raton: CRC Press, 2009. chap. 12, p. 383-408.

KRISTOTT, J. Fats and oils. In: KILCAST, D.; SUBRAMANIAM, P. (Ed.). **The stability and shelf-life of food**. Cambridge: Woodhead Publ., 2000. chap. 12, p. 279-310.

LEE, S.J.; UMANO, K.; SHIBAMOTO, T.; LEE, K.G. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, Barking, v. 91, p. 131–137, 2005.

LI, H.; FAN, Y.; LI, J.; TANG, L.; HU, J.; DENG, D. Evaluating and predicting the oxidative stability of vegetable oils with different fatty acid compositions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 78, n. 4, p. 633-641, 2013.

LUZIA, D.M.M.; JORGE, N. Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (*Citrus limon*) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 946-949, 2009.

MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes naturais da família Lamiaceae. aplicação em produtos alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.

_____. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, 68, n.1, p.1-11, 2009.

MASUI, T.; HIROSE, M.; IMAIDA, K.; FUKUSHIMA, S.; TAMANO, S. Sequential changes of the stomach of rats, hamsters and mice treated with BHA. **Journal of the Japanese Cancer Research**, Tokyo, v. 77, n. 1, p. 1083-1090, 1986.

MERRYWEATHER, L.M.; HILL, S.H.A.; ROBINSON, A.L.; SPENCER, H.A.; RUDGE, K.A.; TAYLOR, G.R.J. **Dictionary of food science and technology**. Oxford: Blackwell, 2005. 413 p.

MOLINEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Hat Yai, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

NOGALA-KALUCKA, M.; KORCZAK, J.; DRATWIA, M.; LAMPSRT-SZCZAPA, E.; SIGER, A.; BUCHOWSKI, M. Food Changes in antioxidant activity and free radical scavenging potential of rosemary extract and tocopherols in isolated rapeseed oil triacylglycerols during accelerated tests. **Chemistry**, Missouri, v. 93, p. 227-235, 2005.

OMURA, K. Antioxidant synergism between butylated hydroxy anisole and butylated hydroxyl toluene. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 72, n. 12, p. 1565–1570, 1995.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R. L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.49, n.10, p.4619-4626, 2001.

PAREDES-LÓPEZ, O.; CERVANTES-CEJA, M. L.; VIGNA-PÉREZ, M.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, T. Berries: improving human health and healthy aging, and promoting quality life: a review. **Plant Foods Human Nutrition**, Dordrecht, v. 65, n. 3, p. 299–308, 2010.

PARK, E.H.; CHANG, H.H.; CHA, Y.N. Induction of hepatic tumors with butylated hydroxyanisole in the self-fertilizing hermaphroditic fish *Rivulus ocellatus marmoratus*. **Japanese Journal of Cancer Research**, Tokyo, v. 81, n. 8, p. 738-741, 1990.

PIZZALE, L.; BORTOLOMEAZZI, R.; VICHI, S.; UBEREGGER, E.; CONTE, L.S. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onites* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 82, p. 1645–1651, 2002.

POYATO, C.; NAVARRO-BLASCO, I.; CALVO, M.I.; CAVERO, R.Y.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. Oxidative stability of O/W and W/O/W emulsions: Effect of lipid composition and antioxidant polarity. **Food Research International**, Amsterdam, v. 51, p. 132–140, 2013.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n.4, p. 755-760, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REGINATO-D'ARCE, M.A.B. Deterioração de lipídeos – ranço. In: OETTERER, M.; REGINATO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. (Org.). **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. cap. 6, p. 243-299.

REISCHE, D.W. Antioxidants. In: AKOH, C.; MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1998. chap. 5, p. 433-444.

REISCHE, D.W.; LILLARD, D.A.; EITENMILLER, R.R. Antioxidants. In: AKOH, C.C.; MIN, D.B. (Ed.). **Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology**. 3rd ed. New York: CRC Press, 2008. cap. 15, p. 409-434.

ROBINS, M.M.; WATSON, A.D.; WILDE, P.J. Emulsions: creaming and rheology. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, London, v.7, n. 5/6, p. 419-425, 2002.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMÉNEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS.+** . Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007. 4 p. (Comunicado Técnico, 128).

SCHAICH, K.M. Lipid oxidation: theoretical aspects. In: **Bailey's industrial oil and fat products**. New York: John Wiley, 2005. pt. 1: Edible oil & fat products: chemistry, properties, and health effects. chap. 7, p. 269-355.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A.N. Analysis of condensed tannins: A review. In: BLAINSKI, A.; LOPES, G.C.; MELLO, J.C.P. Application and analysis of the folin ciocalteu method for the determination of the total phenolic content from *Limonium brasiliense* L. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 6, p. 6852-6865, 2013.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, London, v. 39, n. 11, p. 4067–4079, 2010.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P.K.; WANASUNDARA, P.D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 32, n. 1, p. 67-103, 1992.

SILVIA, F.A.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SOARES, D.J.; TAVARES, T.M.; BRASIL, I.M.; FIGUEIREDO, R.W.; SPUSA, P.H.M. Processos oxidativos na fração lipídica de alimentos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 30, n. 2, p. 263-272, jul./dez. 2012.

TSAI, T.H.; TSAI, P.J.; SU, S.C. Antioxidant and antiinflammatory activities of several commonly used spices. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 93-97, 2005.

VALENZUELA, A.; SANHUEZA, J.; NIETO, S. Cholesterol oxidation: health hazard and the role of antioxidants in prevention. **Biological Research**, Santiago, v. 36, n. 3/4, p. 291-302, 2003.

YANG, Y.; SONG, X.; SUI, X.; QI, B.; WANG, Z.; LI, Y.; JIANG, LIANZHOU. Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 80, p. 141–147, 2016.

ZHENG, W.; WANG, S. Antioxidant activity and phenolic composition in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.

3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE ALECRIM, ORÉGANO E TOMILHO ADICIONADOS EM EMULSÕES

Resumo

A possível toxicidade dos antioxidantes sintéticos utilizados em produtos de base lipídica direciona os estudos em busca de alternativas para a sua substituição dos mesmos. Diversas fontes naturais são relatadas por possuírem atividade antioxidante, como as ervas e especiarias. A família *Labiatae* é uma das principais famílias de ervas e especiarias com potencial antioxidante, com espécies como o orégano (*Origanum vulgare* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.). Objetivou-se nesta etapa determinar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos hidroalcoólicos dessa três ervas e sua capacidade antioxidante em emulsões lipídicas óleo em água (O/A). Para tal, extratos de ervas desidratadas foram extraídos por extração com soluções etanólicas 50% (v/v), submetidos ao banho termostático sob agitação. Os extratos foram adicionados a emulsões lipídicas tipo maionese, seguindo um delineamento experimental do tipo Centroide Simplex para avaliação das melhores combinações. Os resultados foram avaliados pela evolução do teor de hidroperóxido durante teste acelerado em estufa. O extrato de orégano apresentou o maior teor de compostos fenólicos e as maiores atividades antioxidantes pelo método do DPPH e ABTS. Entretanto, ao adicionar os extratos em emulsões, o extrato de alecrim e suas misturas binárias, apresentaram melhor efeito protetor, evitando a formação de hidroperóxido, em níveis comparáveis ao antioxidante sintético BHA. A substituição do BHA por misturas de antioxidantes naturais é viável tecnicamente, além de não apresentarem os possíveis efeitos tóxicos a saúde do consumidor.

Palavras-chave: Tomilho; Orégano; Alecrim; BHA; Atividade antioxidante

Abstract

The potential toxicity of synthetic antioxidants used in lipid-based products directs studies in searching alternatives based on natural products. Several natural sources are reported to present antioxidant activity, such as herbs and spices. The Labiatae family is one of the main families of herbs with high antioxidant potential, with species such as oregano (*Origanum vulgare* L.), rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) mainly studied. The aim of this chapter was to determine *in vitro* antioxidant activity of hydroalcoholic extracts from three herbs and their antioxidant capacity in lipid emulsions. Extracts with high phenolic contents were prepared from dried herbs extracted with 50% (v / v) ethanolic solutions subject to thermostatic bath with stirring. The extracts were added to mayonnaise-like emulsion, following an experimental Centroid Simplex design in order to evaluate the best extracts combinations to avoid oxidation. The results were evaluated by the development of hydroperoxide content during accelerated storage test. Oregano extract showed the highest content of total phenolic and the highest antioxidant activity by DPPH and ABTS methods. However, rosemary extracts and their binary mixtures showed better protective effect, avoiding the formation of hydroperoxide during accelerated test, at levels comparable to the synthetic antioxidant BHA. The replacement of the BHA by natural antioxidant mixtures is technically feasible and can contribute to reduce toxic effects on consumer health.

Keywords: Thym; Origanun; Rosemary; BHA; Antioxidant activity

3.1 Introdução

A utilização de óleos vegetais como ingredientes de emulsões alimentícias pode acarretar em problemas tecnológicos, devido à susceptibilidade oxidativa dos lipídeos, ocasionando perda da qualidade, alterações sensoriais indesejáveis e redução da vida útil dos alimentos. Também há alteração da qualidade nutricional, podendo afetar a segurança alimentar (GALLEGO et al., 2013; ARUOMA, 1997; POYATO et al., 2013).

Para retardar ou minimizar o processo oxidativo, torna-se necessário o uso de antioxidantes. Atualmente, os mais utilizados pela indústria alimentícia são os de origem sintética, que apresentam grande eficiência e estabilidade. Por outro lado, há estudos que relatam a possível toxicidade dos mesmos (GALLEGO et al., 2013). Em paralelo a estes estudos, surge a tendência dos consumidores por uma melhor qualidade de vida, através da mudança de hábitos alimentares, aumentando o consumo de produtos naturais (BREWER, 2011; FRANKEL, 1993).

Para a indústria de alimentos, é interessante encontrar meios de atender a essa demanda dos consumidores, desenvolvendo produtos que agreguem valor tecnológico e apelo nutricional. Em consequência destes fatores, ocorreu um aumento de pesquisas voltadas para o uso de antioxidantes naturais.

Gallego e seus colaboradores (2013), estudando a atividade antioxidante de ervas aromáticas (alecrim, tomilho e lavanda) em emulsões óleo-em-água, encontraram altos níveis de compostos fenólicos. Os extratos obtidos a partir das folhas de alecrim e tomilho foram os mais eficazes, apresentando maior atividade antioxidante quando adicionados a emulsões, retardando o processo oxidativo e demonstrando a eficácia e possível alternativa para substituição de antioxidantes sintéticos.

Estudo visando relatar os efeitos antioxidantes de extratos de ervas em comparação com antioxidantes sintéticos, foi realizado por Hossain et al. (2008). Foi relatado que a capacidade antioxidante do ácido rosmarínico, polifenol encontrado em especiarias da família *Lamiaceae*, apresentou capacidade antioxidante mais elevada que os antioxidantes sintéticos butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroxi-quinona (TBHQ) e galato de propila (PG).

Chipault et al. (1952), estudando o efeito da adição de extratos etanólicos e extratos de éter de petróleo de trinta e duas especiarias em banha de porco, relataram que o alecrim, a sálvia e o orégano apresentaram o maior poder antioxidante em ambos os extratos. O perfil

de ácidos graxos dos óleos e gorduras está diretamente relacionado com a oxidação lipídica; quanto maior for a quantidade de ácidos graxos insaturados, maior susceptibilidade ao ataque oxidativo, uma vez que a oxidação se desenvolve nas duplas ligações (MASUCHI et al., 2008; SHAHIDI; ZHONG, 2010; VALENZUELA; SANHUEZA; NIETO, 2003).

O óleo de girassol é um dos óleos vegetais mais susceptíveis a oxidação lipídica, devido à presença de elevados teores de ácidos graxos insaturados. A composição do óleo de girassol normalmente é de 66-72% de ácido linoleico, 12% de ácidos saturados (palmítico e esteárico), 16-20% de ácido oleico, e menos do que 1% de ácido α -linolênico. Apresenta um dos mais elevados teores de ácido linoleico entre todos os óleos comerciais (AYDENIZ; GUNESSEN; YLMAZ; 2014). Esta composição torna fundamental a presença de compostos antioxidantes para retardar a reação de oxidação (MASUCHI et al., 2008).

Diante do exposto, neste trabalho foram utilizadas emulsões elaboradas a partir do óleo de girassol e leite para avaliação do efeito da adição de extratos de alecrim, tomilho e orégano em retardar a oxidação durante teste acelerado. Foi escolhido o óleo de girassol devido ao seu alto teor de ácidos graxos insaturados, tornando-o susceptível a oxidação. Adicionalmente a este fator, o óleo de girassol não apresenta características sensoriais marcantes, não interferindo na aceitação sensorial, que foi avaliada no capítulo 4.

3.2 Objetivos

Os objetivos deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de extratos de ervas – alecrim, tomilho e orégano em sistemas *in vitro* e, posteriormente, a capacidade antioxidante destes extratos e suas misturas binárias e ternárias em emulsões do tipo óleo em água, a fim de identificar as combinações com maior potencial de aplicação em produtos alimentícios tipo maionese.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Material

As amostras desidratadas de orégano (*Origanum vulgare* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) foram fornecidas pela empresa Cia das Ervas, localizada em Morungaba, SP. As amostras foram produzidas em abril de 2015. Os reagentes e solventes utilizados são descritos em métodos.

O óleo de girassol refinado sem antioxidantes e o leite desnatado foram obtidos por empresa do setor. Todos os reagentes e solventes apresentaram o grau de pureza de acordo com o exigido pelas metodologias a serem aplicadas.

3.3.2 Preparo dos extratos

As amostras foram trituradas em moinho e 10,0 g de cada erva foram adicionadas em Erlenmeyers, juntamente com 100 mL de solvente etanol:água (1v/1v). Posteriormente, foram submetidos a um banho termostático com agitação. As temperaturas utilizadas para extração foram as reladas nos estudos de Shimano (2012), que definiu condições otimizadas de extração para orégano, tomilho e alecrim, permitindo obter extratos com alto teor de compostos fenólicos. Utilizou-se 45°C para o preparo dos extratos de alecrim e tomilho e 30°C para o preparo do extrato de orégano, durante 50 minutos. Em seguida, os extratos foram centrifugados a 2000 g por 20 minutos a 10°C em centrífuga refrigerada (Hitachi Koki, Japão) e filtrados em papel filtro tipo Whatman nº 2, mantidos sob refrigeração (5° C) até o momento da utilização.

3.3.3 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

3.3.3.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram determinados através do método que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu de acordo com a metodologia proposta por Singleton et al. (1999). Para a determinação do teor de fenólicos totais, 0,5 mL dos extratos foram adicionados de 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) 2,0 mL de Na₂CO₃ 4% (m/v). Após 2 h de incubação no escuro à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV 1240, Japão) a 740 nm. O branco do sistema foi preparado da mesma forma, porém sem a alíquota da amostra. Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g), calculados por meio de uma curva construída com concentrações variando de 5 a 100 µg/mL.

3.3.3.2 Atividade antioxidante pelo método do DPPH

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical livre relativamente estável, que, em solução, apresenta coloração púrpura. Ao receber um átomo de hidrogênio de um antioxidante, sofre reação de redução e perda da coloração. Essa descoloração pode ser acompanhada através da medida de absorbância (BLOIS, 1958; MOLINEUX, 2004).

A atividade antioxidante foi determinada segundo o método proposto por Brand-Williams et al. (1995). Em tubos de ensaio foram adicionados 500 µL de extrato diluído, 3 mL de etanol 99% e 300 µL do radical DPPH (Sigma-Aldrich) 0,5 mM, diluído em solução de etanol. As análises foram feitas em triplicata. Uma amostra em branco foi preparada utilizando-se 3,5 mL de etanol 99% e 300 µL de DPPH. Após incubação por 45 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo de luz foi realizada leitura da absorbância a 570 nm em espectrofotômetro UV-1230 (Shimadzu, modelo UV 1203, Japão). Os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas (0,01 a 0,10 µMol/0,5 mL) de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico, Sigma-Aldrich) e expressos como atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC - µMol/g de amostra).

3.3.3.3 Atividade antioxidante pelo método ABTS

A Atividade antioxidante foi determinada a partir da descoloração do radical catiônico ABTS (2,2-azinobis- (3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico). Por meio de uma reação com persulfato de potássio, o ABTS é oxidado a um radical catiônico ABTS, que é um cromóforo verde/azul. Na presença de um antioxidante, esse radical é reduzido, e a medida é obtida como porcentagem de inibição da absorbância a 734 nm, sendo os resultados expressos em equivalente de Trolox (RE et al., 1999). Em tubos de ensaio foram adicionados 20 µL de extrato diluído e 2 mL de solução de ABTS (Sigma-Aldrich). Uma amostra em branco foi preparada utilizando-se 20 µL de etanol 99%. As análises foram feitas em triplicata, com leitura da absorbância realizada em espectrofotômetro UV-1230 (Shimadzu, modelo UV 1203, Japão) após seis minutos de reação. Os resultados foram calculados a partir de uma curva padrão com concentrações conhecidas (0,04 a 0,01 µMol/mL) de Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico, Sigma-Aldrich). Os resultados foram expressos como atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC - µMol/g de amostra).

3.3.4 Preparo das emulsões, aplicação de teste acelerado e avaliação da capacidade antioxidante

Os extratos antioxidantes foram aplicados em emulsão de acordo com Huang et al. (1996) nas concentrações estabelecidas no delineamento experimental (tabela 1). Para evitar a quebra da emulsão pela presença do etanol os extratos foram submetidos à evaporação em evaporador rotativo (Buchi, Modelo R-215, Suíça) a temperatura máxima de 45°C. Para o preparo da emulsão, foram misturados óleo girassol refinado, sem adição de antioxidantes sintéticos ou naturais (200 mL), leite desnatado (100 mL) e os extratos rotaevaporados, obtendo-se uma emulsão do tipo óleo em água (O/A) após homogeneização em liquidificador.

Para avaliar a atividade antioxidante, a emulsão com os extratos antioxidantes foi submetida a aquecimento em estufa a $40 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, para que não ocorresse a quebra da emulsão (LACHMAN et al., 2001). As amostras foram mantidas em estufa por nove dias. A cada 3 dias amostras de cada tratamento foram retiradas aleatoriamente para determinação do hidroperóxido (tempos 0, 3, 6 e 9). Foi utilizada metodologia proposta por Shanta e Decker (1994), com modificações propostas por Branco e Castro (2011), a partir da construção de uma curva padrão com concentrações conhecidas de hidroperóxido de cumeno, com resultados expressos em mmol.kg^{-1} . O mesmo procedimento foi empregado para o antioxidante sintético BHA a fim de comparar a eficiência dos extratos.

3.3.5 Delineamento experimental

Foi aplicado planejamento experimental Centroid Simplex para avaliação da atividade antioxidante de extratos de ervas e suas misturas conforme a Tabela 1.

Tabela 1 - Delineamento experimental Centroid Simplex para estabilidade oxidativa de emulsões em teste acelerado

Ensaio	Valores codificados (x1 x2, x3)	Concentrações reais mg fenólicos kg^{-1} (x1, x2, x3)
Tomilho (x1)	(1,0,0)	(100, 0, 0)
Orégano (x2)	(0,1,0)	(0, 100, 0)
Alecrim (x3)	(0,0,1)	(0, 0, 100)
Tomilho + Orégano	(1/2, 1/2, 0)	(50, 50, 0)
Tomilho+ Alecrim	(1/2, 0, 1/2)	(50, 0, 50)
Orégano+Alecrim	(0,1/2,1/2)	(0, 50, 50)
Tomilho+Orégano+Alecrim	(1/3, 1/3, 1/3)	(33, 33, 33)

Além dos ensaios previstos no delineamento experimental, foi incluída uma amostra contendo 100 mg kg⁻¹ de BHA e uma amostra sem adição de quaisquer antioxidantes.

3.3.6 Análise estatística

Os ensaios acelerados em estufa possibilitaram a identificação e a seleção das combinações dos extratos com maior capacidade antioxidante, após análise de regressão múltipla ajuste do modelo matemático. Os modelos obtidos no estudo de misturas foram avaliados com base no coeficiente de determinação (R^2) e no teste F, realizado por meio da análise de variância com auxílio do programa *Statistica* 12 (StatSoft, Inc. 2012). Após o ajuste do modelo foi realizada a validação prática da equação obtida, por meio da realização de testes com as misturas selecionadas. Os dados físico-químicos foram avaliados pelo programa Statistical Analysis System modelo 9.2 (SAS, 2005) e submetidos à análise de variância (ANOVA) para o teste F. A diferença estatística das médias, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), foi determinada pelo teste de Tukey (SAS, 2005).

3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Compostos fenólicos e atividade antioxidante dos extratos

Os maiores teores de compostos fenólicos, 120,61 mg de GAE g⁻¹ amostra, foram observados no extrato de orégano, seguido das amostras de tomilho com 54,07 e alecrim com 13,51 mg de GAE g⁻¹ amostra (Tabela 2). Shimano (2012), estudando a otimização da extração de compostos fenólicos de ervas, com as mesmas condições utilizadas neste trabalho encontrou valores maiores para os extratos de tomilho (66,59 mg de GAE g⁻¹ amostra) e alecrim (43,60 mg de GAE g⁻¹ amostra). Já o extrato de orégano apresentou valores menores que o presente estudo (90,73 mg de GAE g⁻¹ amostra).

Verifica-se na literatura diferentes resultados de compostos fenólicos para uma mesma espécie de ervas, em decorrência dos diferentes solventes utilizados na extração, e devido às variações naturais, tais como a variedade, local de plantio, fertilização, clima, entre outros (EMBUSCADO, 2015). O total de compostos fenólicos de extrato de tomilho também foi analisado por Almeida (2013), que utilizou solução etanólica 80% para extração, encontrando valores inferiores a este estudo (33,55 mg de GAE g⁻¹ amostra).

Tabela 2 - Teor de compostos fenólicos dos extratos de alecrim, orégano e tomilho

Extrato	mg de GAE/grama de amostra
Alecrim	13,51 ± 0,79
Orégano	120,61 ± 4,54
Tomilho	54,07 ± 0,79

Nota: Médias das triplicatas seguidas do desvio padrão.

Observou-se que o extrato de orégano foi o que apresentou maior atividade antioxidante frente a ambos os radicais, DPPH e ABTS, com valores de 213,63 μmol de Trolox g^{-1} amostra e 365,38 μmol de Trolox g^{-1} amostra, respectivamente (Tabela 3). Su et al. (2007), estudando extrato de orégano obtido com extração com acetona 50%, obtiveram valores menores para a atividade antioxidante pelo método do radical ABTS, de 337 μmol de Trolox g^{-1} .

O extrato de tomilho apresentou 151,03 μmol de trolox g^{-1} amostra para atividade antioxidante pelo método do radical ABTS, valor inferior ao encontrado por Almeida (2013), que foi de 265 μmol de Trolox g^{-1} de amostra, em seus estudos com extratos obtidos com uso de etanol 80%. Entre os três extratos estudados, o de alecrim foi o que apresentou a menor atividade antioxidante para o radical ABTS, com valor médio de 9,49 μmol de Trolox g^{-1} de amostra. Este se mostra inferior aos resultados encontrados por Erkan et al. (2008), que em estudos com extrato de alecrim obtido com metanol 100%, encontrou valores em torno de 15,5 μmol de Trolox g^{-1} de amostra seca.

Tabela 3 - Atividade sequestrante dos radicais DPPH (μmol de Trolox/ g amostra) e ABTS (μmol de Trolox/ g amostra) para os extratos de alecrim, orégano e tomilho

	Alecrim	Tomilho	Orégano
Atividade antioxidante DPPH (μmol de Trolox/ g amostra)	44,1 ± 7,16	45,91 ± 5,25	213,63 ± 3,57
Atividade antioxidante ABTS (μmol de Trolox/ g amostra)	17,59 ± 1,54	151,03 ± 2,35	365,38 ± 8,57

Nota: Médias das triplicatas seguidas do desvio padrão

Figura 1 – extratos antioxidantes (50% água: 50% álcool) de alecrim, tomilho e orégano, respectivamente.

Aplicou-se o coeficiente de correlação de Pearson (r) para medir o grau de correlação linear entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante dos radicais DPPH e ABTS. Observou-se alta correlação entre os fenóis e os dois radicais estudados, demonstrando que quanto maior o teor de compostos fenólicos maior a atividade antioxidante (DPPH e ABTS), conforme demonstrado na Figura 2. Os resultados demonstram que o teor de compostos fenólicos pode ser utilizado como um indicador importante da atividade antioxidante das ervas estudadas.

Alves (2013), correlacionando o teor de fenólicos totais com o método de DPPH em frutas nativas do Cerrado, observou correlação positiva igual a 0,9981, concluindo que o aumento de um está relacionado diretamente com o aumento do outro.

Figura 2 - Correlação de Pearson entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do radical ABTS e ABTS

Ao compararmos os dois radicais entre si, notamos uma correlação menor que as obtidas com os compostos fenólicos, 0,92844 (Figura 3).

Figura 3 - Correlação de Pearson entre a atividade antioxidante do radical DPPH e ABTS

3.4.2 Aplicação dos extratos em emulsão lipídica

Doses isoladas e misturas de extratos de especiarias, no total de 0 a 200 mg Kg⁻¹ (com base no teor de compostos fenólicos totais nos extratos) foram adicionadas às emulsões seguindo o delineamento experimental tipo Simplex (Tabela 1) seguido de armazenamento em estufa a 40°C. Após cada período de tempo, determinou-se o teor de hidroperóxido das amostras (em triplicata) para verificação do estágio oxidativo.

Tabela 4 - Teor de hidroperóxido em emulsões a base de óleo de girassol adicionadas de extratos de especiarias e suas misturas em condições aceleradas em estufa a 40 °C

Ensaio	Hidroperóxidos (mmol/Kg)			
	0 dias	3 dias	6 dias	9 dias
Tomilho	3,12 ± 0,80 ^{Ab}	3,31 ± 1,55 ^{BCb}	4,20 ± 0,19 ^{Db}	12,89 ± 1,52 ^{ABa}
Orégano	1,74 ± 0,39 ^{Ad}	3,75 ± 0,71 ^{BCc}	34,85 ± 5,29 ^{Aa}	18,18 ± 3,24 ^{Ab}
Alecrim	2,37 ± 0,12 ^{Ab}	2,59 ± 0,75 ^{Cb}	4,59 ± 0,45 ^{Da}	3,27 ± 0,98 ^{CDab}
To. + Or.	1,68 ± 0,97 ^{Ad}	4,02 ± 0,20 ^{BCc}	4,74 ± 0,47 ^{CDb}	9,10 ± 1,19 ^{Ba}
To. + Al.	2,65 ± 1,21 ^{Ac}	4,16 ± 0,32 ^{Bc}	7,56 ± 1,87 ^{Ca}	5,76 ± 0,10 ^{Cb}
Or. + Al.	2,01 ± 0,09 ^{Ac}	4,13 ± 0,77 ^{Bb}	10,71 ± 3,72 ^{BCa}	4,15 ± 1,06 ^{CDb}
To. + Or. + Al.	2,63 ± 0,60 ^{Ad}	4,60 ± 0,56 ^{Bc}	6,14 ± 0,85 ^{Cb}	16,49 ± 4,89 ^{Aa}
BHA	2,17 ± 0,55 ^{Ab}	3,81 ± 0,92 ^{BCa}	1,11 ± 0,63 ^{Ebc}	2,07 ± 1,16 ^{Dab}
Controle	2,73 ± 0,54 ^{Ac}	5,77 ± 0,04 ^{Ab}	17,73 ± 4,06 ^{Ba}	14,52 ± 3,23 ^{ABa}

Legenda: To. = Tomilho, Or. = Orégano, Al. = Alecrim

Nota: Valores expressos em média das triplicatas, seguidos do desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes nas colunas e minúsculas diferentes nas linhas diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

A partir de 3 dias de armazenamento, notou-se diferença entre as amostras, sendo que a amostra adicionada de extrato de alecrim manteve, em média, os menores teores de hidroperóxidos até o final do período de armazenamento, apresentando perfil antioxidante semelhante ao BHA nos tempos 0, 3 e 9, diferindo apenas no tempo 6. Entretanto, os baixos teores de hidroperóxido da amostra contendo BHA no tempo 6, pode estar relacionada com erros de amostragem, como a alocação das amostras dentro da estufa, podendo estar em locais de menor exposição a luz e ao oxigênio, ocasionando menor oxidação. Ao compararmos os três antioxidantes naturais notamos que as amostras que contém extrato de alecrim, em doses isoladas ou em misturas, apresentaram os menos teores de hidroperóxidos (Tabela 4). Resultados semelhantes foram relatados por Almeida-Doria e Reginato-D'Arce (2000) em seus estudos com extratos etanólicos de alecrim e orégano, os quais apresentaram a mesma eficiência que a mistura de antioxidantes sintéticos BHA+BHT em óleo de soja submetido ao *Oven Test*. Chang et al. (1977) observaram que extratos de alecrim foram eficaz em retardar a oxidação de gorduras animais da mesma forma que misturas de BHA, BHT, galato de propilo e ácido cítrico.

Observando as amostras individualmente ao longo do tempo, nota-se evolução da oxidação, com aumento do teor de hidroperóxidos até 6 dias de teste acelerado. A partir desse período, algumas amostras apresentaram redução nos valores médios, o que pode ser relacionado à formação de compostos secundários da oxidação, com consequente redução dos

peróxidos já formados, uma vez que eles se ligam entre si para originar os compostos secundários (Figura 4).

Figura 4 - Teor de hidroperóxido (mmol/kg) de emulsões adicionadas de antioxidantes (200 mg/kg) durante teste acelerado em estufa a 40°C (TO+OR: 50% de tomilho e 50% orégano, TO+AL: 50% de tomilho e 50% de alecrim, OR+AL: 50% orégano e 50% alecrim, TO+OR+AL: 33,3% de tomilho, 33,3% de orégano e 33,3% de alecrim)

Verificou-se que o extrato de alecrim apresentou os menores teores de antioxidantes quando analisado *in vitro* (baixos teores de compostos fenólicos e radicais DPPH e ABTS), porém pelo teste de acompanhamento da oxidação das emulsões apresentou os melhores resultados para retardar a oxidação. Segundo Ban et al. (2016), os métodos *in vitro* são utilizados para avaliar inicialmente a atividade antioxidante, porém, não são eficientes para avaliar a capacidade antioxidante *in vivo*, pois vários fatores impactam no desempenho de um antioxidante: solubilidade dos ingredientes em um determinado sistema de alimentos, concentrações locais dos ingredientes nas áreas propensas a oxidação, interações dos ingredientes, níveis de exposição a luz e ao oxigênio e a estabilidade química.

A comparação dos resultados *in vitro* com os resultados em teste acelerado permite concluir que a presença de antioxidantes não necessariamente está relacionada com a atividade antioxidante destes compostos dentro do sistema modelo. A diferença nas estruturas destes compostos antioxidantes pode estar relacionada com a interação que ele sofre no meio reacional, além dos demais componentes presentes nos extratos, que podem interferir na capacidade antioxidante.

Ban e seus colaboradores (2016), estudando a influência dos metabólitos do alecrim na atividade antioxidante em gorduras de aves, notaram que ao retirar o ácido carnósico, principal componente antioxidante presente no alecrim, o extrato ainda apresentava atividade antioxidante, levando à conclusão de que há interações entre os diferentes metabólitos da planta, com impacto sobre a capacidade antioxidante global do extrato de alecrim.

Resultados positivos da adição de extrato de alecrim em produtos de base lipídica foram relatados por Chammem e seus colaboradores (2015). A adição do extrato de alecrim em uma mistura de óleo de soja e óleo de girassol submetido a termo-oxidação a 180 °C por 30 horas, manteve valores de peróxido em 38% mais baixos quando comparado ao controle (sem adição de quaisquer antioxidantes), demonstrando maior estabilidade oxidativa.

Yang e seus colaboradores (2016), em estudos com aplicação de antioxidantes sintéticos e naturais em óleos, relataram que óleos adicionados de extratos de alecrim apresentaram uma maior estabilidade oxidativa, com valores de índice de peróxido reduzidos quando comparados aos óleos adicionados de antioxidantes sintéticos (BHA+BHT).

Com os dados obtidos no dia 6, que representa valores de estágio intermediário de oxidação, foi realizada a análise de regressão múltipla, através do ajuste do modelo cúbico especial, incluindo as interações binárias e ternárias:

$$\begin{aligned} \text{Teor de Hidroperóxidos (mmol/Kg de óleo)} = & 4,15 * \text{Tomilho} + 34,80 * \text{Orégano} + \\ & 4,56 * \text{Alecrim} - 58,12 * \text{Tomilho} * \text{Orégano} + 13,68 * \text{Tomilho} * \text{Alecrim} - \\ & 35,00 * \text{Orégano} * \text{Alecrim} \end{aligned}$$

Pela análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 6, notou-se que o coeficiente de correlação (R^2) encontrado foi de 0,96, indicando que a porcentagem de variação explicada pelo modelo foi de 96%. O teste F, indica que os modelos propostos são válidos, pois o $F_{\text{calculado}} > F_{\text{tabelado}}$, demonstrando que as regressões são estatisticamente significativas. Os resultados da ANOVA permitem concluir que o modelo pode ser utilizado para fins preditivos.

Tabela 6 - Análise de variância (ANOVA) para o ajuste do modelo aos valores de índice de peróxido (mmol/Kg de óleo de girassol) em estufa por nove dias

Fonte de variação	Soma dos Quadrados	GL	Quadrado Médio	F
Regressão	2182,987	5	436,5974	69,58409
Resíduo	94,116	15	6,2744	
Total	2277,103	20	113,8551	

$R^2 = 0,96$ $F_{0,95;5;15} = 2,90$

Analizando a superfície de resposta, que representa graficamente o modelo ajustado (Figura 5), é possível verificar a região com menores teores de compostos da oxidação (região ideal), indicando que maiores concentrações de extrato de alecrim e pequenas quantidades de extratos de tomilho e/ou orégano possibilitam o controle do processo oxidativo em condições aceleradas. O extrato de orégano empregado em doses isoladas ou em maiores proporções não foi eficiente em proteger a emulsão da oxidação, pois maiores concentrações deste resultam em teores de hidroperóxido maiores que 26 mmol/kg.

Figura 5 - Gráfico de contorno para teores de hidroperóxidos (mmol/Kg de óleo) de emulsões adicionadas de extratos antioxidantes submetidas a teste acelerado em estufa a 40°C por seis dias

Figura 6 - Superfície de resposta para teores de hidroperóxidos (mmol/Kg de óleo) de emulsões adicionadas de extratos antioxidantes submetidas a teste acelerado em estufa a 40°C por seis dias

A análise da superfície de resposta permitiu a identificação da região em que as combinações dos extratos apresentaram um efeito positivo no teor dos compostos de oxidação, apresentando efeito sinérgico (Figura 6). Quanto maiores forem as concentrações de alecrim, menores serão os teores de hidroperóxidos.

A Figura 7 apresenta os perfis de concentração de cada extrato sobre o teor dos compostos de oxidação determinados nas amostras. Os resultados evidenciam que o extrato de alecrim é essencial para a estabilidade oxidativa da emulsão em condições aceleradas. A combinação de 75% de extrato de alecrim e 25% de extrato de tomilho, foi selecionada, mostrando ser uma combinação promissora para a substituição dos antioxidantes sintéticos. Essa combinação, juntamente com extratos em doses isoladas, foi aplicada nos estudos subsequentes para verificação do impacto sensorial sobre emulsões alimentícias. Não foi escolhido apenas a amostra contendo 100% de alecrim, pois o perfil sensorial poderia ser rejeitado no teste de aceitação sensorial. Assim, justifica a escolha de mais de um tipo de erva para o estudo da aceitação.

Figura 7 - Valores preditos para prevenir a oxidação lipídica de emulsões a base de óleo girassol em teste de estufa a 40°C

3.5 Conclusões

Embora o extrato de orégano apresente maiores resultados para atividade antioxidante *in vitro* (DPPH, ABTS) quando comparado aos extratos de alecrim e tomilho, sua aplicação isolada em emulsão lipídica não apresentou efeito em retardar a oxidação. Os resultados do estudo de misturas mostraram que as combinações de extratos que possuem altas concentrações de alecrim apresentam melhor efeito em retardar a oxidação da emulsão lipídica submetida a teste acelerado, exercendo papel fundamental na estabilização da reação de oxidação. As melhores combinações para retardar a oxidação lipídica foram emulsões adicionadas de extratos contendo 100% de alecrim e emulsões com a misturas de extratos de alecrim e tomilho na proporção de 75% para 25%, respectivamente. Os resultados evidenciam a importância da realização de testes com produtos alimentícios para a seleção de antioxidantes naturais mais promissores.

Referências

- ALMEIDA, F.A. **Atividade antioxidante e microencapsulação de extrato etanólico de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. 2013. 70 p. Monografia - (Trabalho de conclusão de curso de Bacharelado em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato-Branco, 2013.
- ALMEIDA-DORIA, 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**, Campinas, v. 20, n. 2, p. 197-203, 2000.
- ALVES, M.A. **Caracterização física e química, compostos bioativos e capacidade antioxidante de frutas nativas do cerrado**. 2013. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.
- AYDENIZ, B.; GUNESER, O.; YILMAZ, E. Physico-chemical, sensory and aromatic properties of cold press produced safflower oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 91, n. 1, p. 99-110, 2014.
- BAN, L.; NARASIMHAMOORTHY, B.; ZHAO, L.; GREAYES, J.A.; SCHROEDER, W.D. Antioxidant activities from different rosemary clonal lines. **Food Chemistry**, Barking, v. 201, p. 259-263, 2016.
- BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.
- BRANCO, G.F.; CASTRO, I.A. Optimization of oil oxidation by response surface methodology and the application of this model to evaluate antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, New York, v. 88, n. 11, p. 1747-1758, 2011.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BREWER, M.S. Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, Chicago, v. 10, n. 4, p. 221-247, 2011.
- CHANG, S.S.; OSTRIC-MATIJESEVIC, B.; HSIEH, O.A.L.; HUANG, C. Natural antioxidants from rosemary and sage. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 42, n. 4, p. 1102-1106, 1977.
- CHAMMEM, N.; SAOUDI, S.; SIFAOU, I.; SIF, S.; PERSON, M.; ABDERRABA, M.; MOUSSA, F. HAMDI, M. Improvement of vegetable oils quality in frying conditions by adding rosemary extract. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 74, n. 15, p. 592–599, 2015.
- CHIPAULT, J.R.; MIZUNO, G.K.; HAWKINS, J.M.; LUNDBERG, W.O. The antioxidant properties of natural spices. **Food Research**, Toronto, v. 17, p. 46-55, 1952.

EMBUSCADO, M.E. Spices and herbs: natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**, Hunt Valley, v. 18, p. 811–819, 2015.

ERKAN, N.; AYRANCI, G.; AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus Officinalis* L.) extract, black seed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. **Food Chemistry**, Barking, v. 110, n. 1, p. 76-82, 2008.

FRANKEL, E.N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 4, n. 7, p. 220-225, 1993.

GALLEGO, M.G.; GORDON, M.H.; SEGOVIA, F.J.; SHOWRYA, M.; ALMAJANO, M.P. Antioxidant properties of three aromatic herbs (rosemary, thyme and lavender) in oil-in-water emulsions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Madison, v. 90, n. 10, p. 1559–1568, 2013.

HOSSAIN, M.; BRUNTON, N.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A.B.; WILKINSON, M. Antioxidant activity of spice extracts and phenolics in comparison to synthetic antioxidants. **Rasayan Journal of Chemistry**, Oxford, v. 1, n. 4, p. 751-756, 2008.

HUANG, S.W.; HOPIA, A.; SCHWARE, K.; FRANKEL, W.N.; GERMAN, J.B. Antioxidant activity of r-tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oils vs oil-in-water emulsions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 44, n. 2, p. 444-452, 1996.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H.A.; KANIG, J. L. **Teoria e prática na indústria farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, 1617 p.

MASUCHI, M.H.; CELEGHINI, R.M.S.; GONÇALVES, L.A.G.; GRIMALDI, R. Quantificação de TBHQ (terc butil hidroquinona) e avaliação da estabilidade oxidativa em óleos de girassol comerciais. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1053-1057, 2008.

MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.

POYATO, C.; NAVARRO-BLASCO, I.; CALVO, M.I.; CAVERO, R.Y.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. Oxidative stability of O/W and W/O/W emulsions: effect of lipid composition and antioxidant polarity. **Food Research International**, Amsterdam, v. 51, p. 132–140, 2013.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, Oxford, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

REGINATO-D'ARCE, M.A.B. Deterioração de lipídeos – ranço. In: OETTERER, M.; REGINATO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. (Org.). **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Barueri: Manole, 2006. cap. 6, p. 243-299.

SHANTA, N.C.; DECKER, E.A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of lipids. **Journal of the AOAC International**, Maryland, v. 77, n. 2, p. 421-424, 1994.

SHARIDI, F.; WANASUNDARA, U.N. Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. In AKOH, C. MIN, D.B. **Food lipids: chemistry, nutrition, and bio-technology**. New York: Marcel Dekker, 1998. chap. 14, p. 387-393.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, London, v. 39, p. 4067–4079, 2010.

SHIMANO, M.Y.H. **Ação antioxidante de extratos de especiarias e suas misturas binárias e ternárias sobre a estabilidade oxidativa de óleo de soja**. 2012. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzimology**, Bethesda, v. 299, p. 152-178, 1999.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE. **SAS/QC software**: usage and reference (version 9.2). Cary, 2005. 1 CDROM.

SU, L.; YIN, J.; CHARLES, D.; ZHOU, K.; MOORE, J.; YU, L. Total phenolic contents, chelating capacities, and radical-scavenging properties of black peppercorn, nutmeg, rosehip, cinnamon and oregano leaf. **Food Chemistry**, Barking, v. 100, p. 990-997, 2007.

VALENZUELA, A.; SANHUEZA, J.; NIETO, S. Cholesterol oxidation: health hazard and the role of antioxidants in prevention. **Biological Research**, Santiago, v. 36, p. 291-302, 2003.

YANG, Y.; SONG, X.; SUI, X.; QI, B.; WANG, Z.; LI, Y.; JIANG, LIANZHOU. Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 80, p.141–147, 2016.

4 PERFIL SENSORIAL E ACEITAÇÃO DE EMULSÕES ADICIONADAS DE EXTRATOS DE ALECRIM E TOMILHO

Resumo

A adição de substâncias antioxidantes naturais em produtos de base lipídica, pode acarretar em diferenças no perfil sensorial, tornando-se necessário estudos que avaliem estas possíveis alterações. Nesse trabalho objetivou-se descrever o perfil sensorial de emulsões adicionadas dos extratos de ervas que apresentaram melhor capacidade antioxidante em teste acelerado e verificar a aceitabilidade das mesmas, a fim de analisar se há diferença sensorial entre as amostras adicionadas de antioxidante naturais em comparação com as adicionadas de antioxidantes sintéticos. Foram utilizadas emulsões formuladas com 100 mL de leite desnatado e 200 mL de óleo refinado de girassol, adicionadas de extratos antioxidantes de alecrim (100%), tomilho (100%), alecrim (75%) mais tomilho (25%) ou BHA, todos em concentrações totais de 200 mg Kg⁻¹ (base no teor de compostos fenólicos). Estas amostras foram submetidas ao teste descritivo (Análise Descritiva Quantitativa) e ao teste de aceitação com escala hedônica. Verificou-se que o perfil sensorial das amostras diferiu apenas para os atributos aparência consistente e sabor ervas, sendo a amostra de alecrim diferente da de BHA para ambos, e a de tomilho apenas para o sabor ervas. Porém, para a mistura de antioxidantes naturais, não houve diferença em nenhum atributo. Em relação a aceitação das amostras, a única que apresentou diferença estatística em relação ao BHA foi a adicionada de alecrim (100%) para os atributos aparência e textura. Os resultados indicam que quaisquer combinações de extrato nas doses utilizadas nesse estudo seriam aceitas pelo consumidor, o que representa possibilidade de substituição do antioxidante sintético BHA.

Palavras-chave: Perfil sensorial; Aceitação; Análise descritiva quantitativa; Teste hedônico

Abstract

The addition of natural antioxidants in lipid-based products may result in differences in sensory profile, making it necessary studies to evaluate these possible changes. In the present study, the objective was to describe the sensory profile of the emulsion samples added of antioxidant in doses determined in the previous chapter and check their acceptability, in order to determine sensory differences among samples added of natural antioxidant compared to the synthetic ones. Four emulsions were used, all with a base of 100 mL milk to 200 mL RBD sunflower oil, and rosemary (100%), thyme (100%), rosemary (75%) and thyme (25%) extracts, and BHA. All antioxidants were added at doses of 200 mg.Kg⁻¹ (based on the content of phenolic compounds). It was found that the sensory profile of the samples differed only to the attributes consistent appearance and flavor, being the sample of Rosemary different from BHA for both, and the only thyme for flavor. But to the mix, there is no difference in any attribute. Regarding the acceptance of samples, the only one that presents statistical difference in relation to the BHA was Rosemary (100%) for the appearance and texture attributes.

Keywords: Sensory profile; Acceptance; Quantitative descriptive analysis; Hedonic test

4.1 Introdução

Os lipídeos são responsáveis por importantes características nos alimentos em que são utilizados, conferindo propriedades sensoriais desejáveis de sabor, odor, cor e textura. Em emulsões tipo maionese, são essenciais para a textura e sabor exigidos pelo consumidor (SALGADO et al., 2006).

Entretanto, apesar de conferir características agradáveis, a oxidação lipídica que ocorre nestas emulsões pode acarretar em características indesejáveis conhecidas como ranço, provocando perda da qualidade sensorial e nutricional dos alimentos, causando rejeição dos produtos por parte do consumidor (EMBUSCADO, 2015; GALLEGO et al., 2013; LI et al., 2013).

Para retardar tais efeitos, a indústria utiliza os antioxidantes sintéticos. Entretanto, seus efeitos sobre a saúde têm sido questionados. Junto a este aspecto, a exigência de consumidores por produtos naturais, faz com que pesquisas estejam voltadas para encontrar alternativas aos antioxidantes sintéticos (YANG et al., 2016).

Os antioxidantes naturais encontrados em ervas estão sendo relatados como eficientes para retardar o processo de oxidação de produtos lipídicos, são relatados como seguros e apresentem menores exigências regulatórias (GALLEGO et al., 2013). Entretanto, torna-se necessário verificar se a substituição destes antioxidantes será aceita pelo consumidor, sendo necessário acompanhar sensorialmente as interferências que esta substituição provoca no produto final.

Segundo a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 1993) a análise sensorial é definida como a disciplina científica usada para evocar, medir, analisar e interpretar reações das características dos alimentos e materiais como são percebidas pelos sentidos da visão, olfato, gosto, tato e audição.

As sensações de prazer, palatabilidade ou aceitabilidade de um alimento avaliados a partir dos órgãos do sentido, não podem ser substituídas por medições de quaisquer outros instrumentos laboratoriais (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999).

Características como aparência, sabor, aroma e textura estão relacionadas com a boa aceitação de um produto pelo consumidor. A avaliação destas características é feita através do emprego de métodos de análises sensoriais, os quais contribuem como ferramentas no desenvolvimento de produtos alimentícios por meio do julgamento humano através dos órgãos do sentido (CANEPPELE et al., 2000). A constante procura dos consumidores por alimentos práticos, seguros e de qualidade leva o processo de desenvolvimento de produtos

interagir com a análise sensorial, a qual é capaz de fornecer informações que definem até qual nível pode variar um atributo do produto sem que sua imagem seja prejudicada perante ao consumidor (MARTINS, 2002).

A avaliação sensorial utiliza um painel sensorial, composto por um grupo de pessoas que analisam as diferentes características sensoriais dos alimentos (MARTINS, 2002). Existem diversos tipos de métodos sensoriais, que são escolhidos conforme o objetivo da análise. Os métodos discriminativos, conhecidos também como testes de diferença, avaliam a diferença qualitativa e/ou quantitativa entre duas ou mais amostras (MEILGAARD et al., 1991). Os métodos afetivos, avaliam a aceitação ou preferência do consumidor. De acordo com Minim (2006) estes testes são usados para avaliar quanto os julgadores gostam ou desgostam de um produto. Entre os testes afetivos, encontra-se o teste de escala hedônica (teste de aceitação), onde o consumidor expressa sua aceitação pelo produto, conforme uma escala estabelecida previamente que varia de acordo com a intensidade do quanto ele gostou ou desgostou de cada amostra (MEILGAARD et al., 1991).

Outros métodos sensoriais de grande importância para a indústria de alimentos são os descritivos, que são utilizados para definir a qualidade sensorial de um produto (MINIM et al., 2006). Os testes descritivos envolvem a detecção e a descrição qualitativa e quantitativa dos componentes sensoriais de um produto. Os aspectos qualitativos incluem a aparência, aroma, sabor e textura, que serão quantificados em suas intensidades pelos julgadores treinados (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1991).

A análise sensorial descritiva pode ser utilizada no controle da qualidade, na comparação de produtos, para entender as respostas dos consumidores em relação aos atributos sensoriais do produto, para acompanhar o prazo de validade, para identificar efeitos dos ingredientes ou outras variáveis do processo sobre a qualidade sensorial final, e, também, investigar percepções dos julgadores no produto estudado (MURRAY; DELAHUNTY; BAXTER; 2001; GACULA, 1997).

Análise descritiva quantitativa (ADQ) é um método que permite identificar e quantificar as características de um produto. É apropriada quando se desejam obter informações detalhadas sobre o perfil sensorial, identificação e quantificação de atributos do produto em estudo. Este tipo de análise sensorial permite comparar produtos semelhantes, correlacionar seus resultados, e podem ser utilizados para definir o padrão de controle de qualidade do produto. Esta metodologia é realizada com julgadores treinados, os quais fornecem resultados confiáveis e consistentes (BENDINI et al., 2011, MINIM et al., 2006).

4.2 Objetivo

Os objetivos deste trabalho foram obter a formação de uma equipe sensorial treinada para avaliar o perfil descritivo das emulsões adicionadas de extratos antioxidantes de alecrim e tomilho a fim de verificar se o seu perfil sensorial apresenta diferenças em comparação com as emulsões adicionadas de BHA. Também teve como objetivo verificar a aceitação das amostras adicionadas de antioxidantes naturais.

4.3 Material e Métodos

4.3.1. Preparo das emulsões e extratos antioxidantes

Para o preparo da emulsão, foram misturados óleo de girassol refinado, sem adição de antioxidantes sintéticos ou naturais (200 mL) com leite desnatado (100 mL) e obteve-se uma emulsão do tipo óleo em água (O/A) após homogeneização em liquidificador. Os extratos antioxidantes adicionados foram produzidos a partir de ervas desidratadas fornecidas pela empresa Cia das Ervas (Morungaba, SP), por meio da extração com soluções etanólicas, conforme descrito no Capítulo 3. As emulsões utilizadas para a avaliação sensorial foram adicionadas de extrato de alecrim (100%), extrato de tomilho (100%), mistura de extratos de alecrim (75%) e tomilho (25%), todos nas doses totais de 200 mg kg⁻¹ (com base no teor de compostos fenólicos totais). Para fins de comparação, foi utilizada uma emulsão com a adição de BHA, também na concentração de 200 mg kg⁻¹.

Os reagentes e insumos utilizados nas análises foram de grau de pureza compatíveis com os métodos empregados.

4.3.2 Análise microbiológica

Avaliações microbiológicas exigidas pela RDC n°12 da ANVISA (Brasil, 2001) foram realizadas nas amostras de emulsão antes da aplicação dos testes.

4.3.2.1 Coliformes totais e *Escherichia coli*

Determinado utilizando-se o kit SimPlate®, aprovado pela AOAC (2005), seguindo o manual da BioControl.

4.3.2.2 Pesquisa de *Salmonella sp.*

Foi utilizado o kit Tecra™ Unique *Salmonella* aprovado pela AOAC (2005), seguindo o manual de instrução da 3M™. Os poços positivos apresentam coloração esverdeada. Os resultados foram expressos em presença/ausência de *Salmonella sp.* em 25 g de amostra. A análise foi realizada no tempo zero, para cada tratamento, a fim de verificar a qualidade inicial do produto.

4.3.3 Análise Sensorial – Análise Descritiva Quantitativa (ADQ)

O método empregado foi a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) desenvolvida por Stone (1992). O teste foi realizado no laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) (Piracicaba, SP, Brasil).

Primeiramente, o projeto foi enviado para o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da ESALQ/USP, sendo aceito pela comissão, com parecer número 1.024.782 (Anexo A).

Todas as amostras dos testes sensoriais foram apresentadas em copos plásticos de 50 mL, codificadas com números aleatórios de três algarismos, sob temperatura de refrigeração de aproximadamente 7°C. Os testes foram conduzidos em cabines sensoriais individuais com luz branca.

4.3.3.1 Recrutamento de julgadores

Como primeira etapa da Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), foram recrutados 26 candidatos, entre os funcionários e alunos da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), os quais preencheram o questionário apresentado na Figura 1. Os candidatos foram selecionados e convocados para a etapa seguinte da ADQ, de acordo com a disponibilidade, interesse, poder discriminativo, ausência de aversão ao produto e capacidade de trabalhar em grupo. Candidatos que possuíam problemas de saúde relacionados a ingestão de gorduras, como altos níveis de colesterol e triglicérides, hipertensão e alergia foram eliminados.

Questionário de Recrutamento de Provadores

Você está sendo convidado para participar do treinamento de Análise Sensorial de maionese, através do método “Análise Descritiva Quantitativa”. A equipe de provadores se reunirá uma vez por semana em torno de 45 minutos. Contamos com você para a formação desta nova equipe de provadores. Caso aceite, por favor preencha este formulário.

Nome: _____

Faixa etária: ____ 15-20 ____ 21-30 ____ 31-40 ____ 41-50 ____ 51-60

Sexo: ____ Feminino ____ Masculino

Fumante: ____ Sim ____ Não

Toma frequentemente cafezinho? ____ Sim ____ Não

E-mail: _____

Telefone para contato: _____

- Horários disponíveis:

	Segunda	Terça	Quarta	Quinta	Sexta
Manhã 8:30-12:00hs					
Tarde 14:00-18:00hs					

- Você consome maionese?

- Você gosta de maionese?

- Você sabe o que é um produto cremoso? Cite três exemplos.

- Indique se você possui:

Altos níveis de colesterol: _____

Altos níveis de triglicérides: _____

Alergia a alimentos: _____

Hipertensão: _____

Doenças bucais: _____

Outras doenças relacionadas com ingestão de produtos oleosos: _____

- Marque na linha direita de cada figura um traço que indique a proporção da figura que foi rachurada (não use régua, use apenas sua capacidade visual de avaliar)

nenhuma

toda

nenhuma

toda

nenhuma

toda

Figura 1 - Questionário de recrutamento de julgadores para o teste descritivo de emulsões adicionadas de antioxidantes

4.3.3.2 Seleção dos julgadores

Primeiramente, foi aplicado o teste de gostos básicos, em que cada julgado recebeu soluções quimicamente puras dos cinco gostos básicos: doce (sacarose a 2%), ácido (ácido cítrico a 0,07%), salgado (cloreto de sódio a 0,2%), amargo (cafeína a 0,07%) e neutro (água potável), seguindo a recomendação de Stone et al. (1998). Foi solicitado que cada julgador identificasse na ficha o gosto percebido nas amostras (Figura 2).

Nome: _____		Data: ____/____/____	
<p>Por favor, prove as amostras, identifique os gostos básicos (doce, salgado, ácido, amargo e neutro) e escreva na frente as respectivas numerações das amostras. Favor ingerir água após provar cada amostra. Obrigada.</p>			
<p>Sabor</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>	<p>Amostra n°</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p> <p>_____</p>		

Figura 2 - Modelo da ficha do teste de gostos básicos

Posteriormente, foi aplicado o teste triangular, onde cada julgador recebeu três amostras, informando que duas entre elas eram iguais. O julgador teve apenas que identificar a amostra diferente (Figura 3), não sendo necessário apontar a diferença (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2006). As amostras utilizadas foram água com diferentes quantidades de cloreto de sódio (0% e 0,2%). O teste foi repetido 7 vezes.

Nome: _____		Data: ____/____/____	
<p>Por favor, prove as amostras codificadas da esquerda para a direita. Duas amostras são iguais e uma é diferente. Identifique com um círculo qual amostra é a diferente.</p>			
<p>_____</p>	<p>_____</p>	<p>_____</p>	
<p>Comentários: _____</p>			

Figura 3 - Modelo da ficha do teste triangular

4.3.3.3 Levantamento e agrupamento de atributos

Foi utilizado o método de rede descrito por (MOSKOWITZ, 1983). Este método consiste na identificação dos atributos presentes no produto a ser estudado. Foram utilizadas três amostras de emulsão: uma adicionada extrato de alecrim, outra adicionada extrato de orégano e outra com extrato de tomilho, nas doses de 200 mg kg⁻¹ (com base no teor de compostos fenólicos dos extratos). Os julgadores tiveram que descrevê-las quanto a sua aparência, aroma, sabor e textura, comparando duas a duas (Figura 4), para que o maior número de atributos fosse levantado.

<u>Levantamento de atributos</u>	
Nome: _____	Data: ____/____/____
Descreva todas as características que você observar nas amostras de emulsão tipo maionese para cada amostra e atributo abaixo:	
<u>Da amostra 238 em relação a amostra 674:</u>	
Aparência:	
Aroma:	
Sabor:	
Textura:	
<u>Da amostra 674 em relação a amostra 196:</u>	
Aparência:	
Aroma:	
Sabor:	
Textura:	
<u>Da amostra 238 em relação a amostra 196:</u>	
Aparência:	
Aroma:	
Sabor:	
Textura:	

Figura 4 - Modelo da ficha de levantamento de atributos

Os atributos apontados foram agrupados pelo analista sensorial, conforme suas similaridades, com o objetivo de manter os termos que melhor descrevem o produto final. Estes termos foram utilizados para elaboração do material de referência (descrição dos termos). Dados discrepantes foram eliminados (DAMÁSIO, 1990).

Posteriormente ao agrupamento de atributos, foi elaborada a ficha de avaliação a ser utilizada na aplicação da análise sensorial no produto, empregando-se escala não estruturada de 10 cm, variando de pouco (nota 1) a muito (nota 9).

4.3.3.4 Treinamento dos julgadores

O treinamento foi conduzido com três tipos de amostras: emulsão com adição de extrato de alecrim (100%), emulsão com adição de extrato de tomilho (100%) e uma maionese comercial. Nesta etapa ficou à disposição dos julgadores o material de referência e definições, elaborados anteriormente (DUTCOSKY, 1996; MOSKOWITZ, 1998).

Durante o treinamento, foram apresentadas amostras que serviam de referência qualitativa e quantitativa para cada atributo. Esta etapa foi realizada três vezes, a fim de que os julgadores apresentassem respostas mais confiáveis.

4.3.3.5 Avaliação do desempenho dos julgadores

A fim de verificar o desempenho dos julgadores, com base nos critérios de exclusão definidos por Damásio e Costell (1991), os três tipos de amostras utilizadas no treinamento foram avaliadas em três repetições do teste, sem que os julgadores soubessem que se tratava de amostras repetidas.

Posteriormente, foi realizada análise de variância (ANOVA) com duas fontes de variação, amostra e repetição. Foram selecionados para compor a equipe final os julgadores que apresentaram bom poder discriminativo dos atributos ($pF_{\text{amostras}} \leq 0,3$), boa repetitividade nos julgamentos ($pF_{\text{repetições}} \geq 0,05$) e consenso com os demais membros da equipe (DAMÁSIO; COSTELL, 1991).

4.3.3.6 Avaliação descritiva quantitativa das amostras

Nesta etapa, foram apresentadas aos julgadores finais as quatro amostras estudadas para traçar o perfil sensorial.

O julgador teve que indicar a intensidade percebida por ele para cada atributo, para todas as amostras estudadas (DUTCOSKY, 1996; MOSKOWITZ, 1998)

4.3.4 Teste de aceitação

Foi realizado o teste de aceitação com escala hedônica estruturada mista de sete pontos, onde o julgador indica o quanto gostou ou desgostou de cada amostra para cada atributo: aparência, aroma, sabor, textura e impressão global. O valor sete equivale a gostei muito e o valor um equivale a desgostei muito (Figura 5) (MEILGAARD et al., 1991).

A equipe sensorial foi composta por 45 julgadores não treinados, de ambos os sexos. Os julgadores eram alunos e funcionários da Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN) da ESALQ/USP.

O teste foi conduzido no Laboratório de Análise Sensorial do LAN, em cabines individuais com a utilização de luz branca. Foram apresentadas quatro amostras de emulsão tipo maionese: uma com adição de alecrim, outra com adição de tomilho, outra com adição de alecrim e tomilho e uma com BHA (semelhante as amostras da ADQ). A diferença destas amostras para o teste de ADQ realizado, é que neste teste de aceitação foi utilizado 1% de sal (cloreto de sódio).

As amostras foram servidas em copos plásticos de 50 mL, codificados com números aleatórios de três algarismos, juntos com biscoito água e sal para o consumo.

Nome:			Data:		
Você está recebendo quatro amostras de produto tipo maionese. Avalie cada uma das amostras codificadas e use a escala abaixo para identificar o quanto você gostou ou desgostou de cada uma:					
7- Gostei muito			3- Desgostei ligeiramente		
6- Gostei moderadamente			2- Desgostei moderadamente		
5- Gostei ligeiramente			1- Desgostei muito		
4- Não gostei, não desgostei					
Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Impressão Global

Figura 5 - Modelo da ficha de análise sensorial utilizando escala hedônica de sete pontos

4.3.5 Análise estatística

Os resultados referentes às análises sensoriais foram avaliados utilizando programa Statistical Analysis System modelo 9.2 (SAS, 2005) e submetidos à análise de variância (ANOVA) para o teste F. A diferença estatística das médias, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), foi determinada pelo teste de Tukey.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Análise descritiva quantitativa

Dos vinte e um julgadores pré-selecionados na etapa anterior, três desistiram de continuar na ADQ. Os dezoito restantes passaram pelo teste de reconhecimento de gostos básicos, sendo todos aprovados. O critério de aprovação foi 100% de acertos.

Após esse teste, os julgadores selecionados seguiram para a prova de sensibilidade para o gosto. Foi utilizado o teste triangular com análises sequenciais, utilizando amostras com diferentes teores de cloreto de sódio (concentração de 0% e 0,2%). Para a realização do teste, foi feita a casualização das amostras. O método foi aplicado sete vezes para cada julgador. Para uma classe de 7, o número mínimo de acertos para a aprovação é de seis. Foi construído o gráfico referente ao teste sequencial triangular (Figura 6), obtendo-se as retas de aceitação (A) e rejeição (R) referentes a cada um dos julgadores.

Figura 6 - Teste sequencial triangular na seleção de julgadores com $p_0 = 1/3$, $p_1 = 2/3$, $\alpha = 0,05$ e $\beta = 0,10$

Este teste permitiu selecionar os candidatos em função de suas habilidades em discriminar duas amostras diferentes e repetição dos resultados. Foram aprovados 17 candidatos.

4.4.1.1 Levantamento e agrupamento de atributos

Para o levantamento de atributos, após a verificação da segurança microbiológica, foram utilizadas três amostras: emulsão tipo maionese contendo alecrim, emulsão tipo maionese contendo tomilho e uma maionese comercial.

Após o levantamento dos atributos, foi realizado o agrupamento dos mesmos, conforme suas semelhanças (Tabela 1). Este agrupamento resultou nos atributos finais a serem utilizados no presente trabalho, sendo três atributos de aparência (esverdeada, amarelada e consistente), quatro atributos de aroma (alecrim, tomilho, ervas e orégano), quatro atributos de sabor (alecrim, tomilho, ervas e orégano) e dois atributos de textura (cremosa e oleosa).

Foi elaborada a ficha de referência (Figura 7) com a definição dos atributos para o treinamento dos julgadores. Para a avaliação das amostras, foi construída a ficha de escala e intensidade para cada atributo levantado (Figura 8).

Tabela 1 - Agrupamento de atributos, com indicação do número de vezes em que foi citado

	Termos	Número de vezes	Atributos finais
Aparência	Esverdeada	6	Esverdeada
	Amarelada	5	Amarelada
	Branco	10	
	Consistente	2	Consistente
Aroma	Alecrim	2	Alecrim
	Tomilho	2	Tomilho
	Ervas	5	Ervas
	Oxidada		Oxidada
Sabor	Alecrim	3	Alecrim
	Tomilho	1	Tomilho
	Ervas	14	Ervas
	Tempero	2	
	Vegetal	1	
	Folhas	3	
	Especiarias	3	
	Oxidada	2	Oxidada
Textura	Cremosa	1	Cremosa
	Consistente	17	
	Compacta	1	
	Densa	1	
	Espessa	1	
	Leve	3	
	Encorpada	1	
	Firme	5	
	Viscosa	2	
	Aerada	2	Aerada
	Homogênea	1	Homogênea
	Oleosa	2	Oleosa

APARÊNCIA

Esverdeada: emulsão com adição de ervas finas:

Pouco: emulsão sem adição de ervas.

Muito: emulsão com adição de ervas.

Amarelada: emulsão com cor característica de maionese:

Pouco: emulsão sem adição de mostarda.

Muito: emulsão com adição de mostarda.

Consistente: emulsão com consistência viscosa, encorpada:

Pouco: maionese comercial marca Hellmann's adicionada de 10% de leite.

Muito: maionese comercial marca Hellmann's.

AROMA

Alecrim: emulsão com adição de alecrim:

Pouco: emulsão com adição de 0,1% de alecrim.

Muito: emulsão com adição de 0,4% de alecrim.

Tomilho: emulsão com adição de tomilho:

Pouco: emulsão com adição de 0,1% de tomilho.

Muito: emulsão com adição de 0,4% tomilho.

Ervas emulsão com adição de ervas finas:

Pouco: emulsão com adição de 0,1% de ervas finas.

Muito: emulsão com adição de 0,4% ervas finas.

Oxidado: emulsão com aroma característico de gordura oxidada:

Pouco: emulsão recém batida no liquidificador com óleo de girassol.

Muito: emulsão recém batida no liquidificadores com óleo de girassol pré-aquecido a 180°C por 5 minutos.

SABOR

Alecrim: emulsão com adição de alecrim:

Pouco: emulsão com adição de 0,1% de alecrim.

Muito: emulsão com adição de 0,4% de alecrim.

Tomilho: emulsão com adição de tomilho:

Pouco: emulsão com adição de 0,1% de tomilho.

Muito: emulsão com adição de 0,4% de tomilho.

Ervas emulsão com adição de ervas finas:

Pouco: emulsão com adição de 0,1% de ervas finas.

Muito: emulsão com adição de 0,4% de ervas finas.

Oxidado: emulsão com aroma característico de gordura oxidada:

Pouco: emulsão recém batida no liquidificador com óleo de girassol.

Muito: emulsão recém batida no liquidificadores com óleo de girassol pré-aquecido a 180°C por 5 minutos.

TEXTURA

Cremosa: propriedade de resistência ao escoamento da emulsão sentida na boca:

Pouco: maionese comercial marca Hellmann's adicionada de 10% de leite.

Muito: maionese comercial marca Hellmann's.

Oleosa: emulsão com sensação de óleo na boca:

Pouco: emulsão 200 mL de óleo e 100 mL de leite.

Muito: emulsão 200 mL de óleo e 100 mL de leite, com adição posterior de óleo.

Aerada: emulsão com bolhas de ar no interior:

Pouco: emulsão 200 mL de óleo e 100 mL de leite.

Muito: chantilly.

Homogênea: emulsão uniforme (cor, grânulos, gotículas de óleo, manchas):

Pouco: emulsão com grânulos, cor desuniforme, gotas de óleo.

Muito: emulsão filtrada.

Figura 7 - Definição e referência dos atributos finais

Nome: _____ Data: _____ Idade: _____

Por favor, avalie cada um dos atributos abaixo, indicando com um traço vertical, o ponto da escala que melhor quantifique a intensidade de cada atributo.

APARÊNCIA

ESVERDEADA

Amostra	pouco		muito

AMARELADA

Amostra	pouco		muito

CONSISTENTE

Amostra	pouco		muito

AROMA

ALECRIM

Amostra	pouco		muito

TOMILHO

Amostra	pouco		muito

ERVAS

Amostra	pouco		muito

OXIDADO

Amostra	pouco		muito

SABOR

ALECRIM

[illegible]TOMILHO[illegible]

ERVAS

[illegible]OXIDADO[illegible]

TEXTURA

CREMOSA

Amostra pouco muito

OLEOSA

[illegible]

AERADA

[illegible]

HOMOGENEA

[illegible]

Figura 8 - Ficha utilizada na análise final com as escalas de intensidade para cada atributo

4.4.1.2 Treinamento e avaliação do desempenho dos julgadores

Foram realizadas três sessões de treinamento e foram selecionados os julgadores que apresentaram 80% dos valores dentro dos padrões (Tabelas 2 e 3) e consenso com a equipe (Tabela 4). Os provadores receberam as três amostras citadas no item 4.3.3.4, nas três sessões de treinamento, porém, não foi informado que eram as mesmas, permitindo verificar a repetibilidade.

Foram excluídos os julgadores 1, 6 e 9. A equipe sensorial final foi composta por 8 pessoas, sendo 1 do sexo masculino e 7 do sexo feminino, com idades de 20 a 32 anos.

Os atributos textura homogênea e textura aerada foram excluídos, pois os resultados do treinamento não estavam em consenso entre a maioria dos membros da equipe sensorial.

Tabela 2 - Desempenho dos julgadores em relação a seu poder discriminativo ($pF_{amostras}$). Valor desejável: $pF_{amostras} < 0,50$

Atributos	Julgador										
	1*	2	3	4	5	6*	7	8	9*	10	11
Aparência											
Esverdeada	11,23	0,83	2,83	7,90	0,94	13,20	55,72	0,09	71,25	0,00	0,02
Amarelada	38,63	0,01	1,66	1,38	5,87	2,62	2,37	3,36	0,24	13,03	0,15
Consistente	27,65	0,00	0,06	0,02	0,00	0,01	72,12	0,00	0,75	0,78	1,07
Aroma											
Alecrim	32,87	0,00	4,82	23,62	5,90	25,67	0,58	11,66	24,75	24,17	5,57
Tomilho	44,44	0,00	3,23	3,55	6,55	0,15	3,77	16,00	0,79	28,81	12,64
Ervas	32,60	8,03	4,03	3,57	4,95	18,96	0,75	23,18	20,82	28,78	4,92
Oxidado	100,00	13,44	41,42	44,44	16,80	0,05	18,18	0,00	12,75	80,76	14,99
Sabor											
Alecrim	13,04	0,06	17,77	29,34	2,18	53,53	14,00	14,96	65,47	0,00	0,16
Tomilho	45,51	0,05	3,86	0,17	0,70	0,17	8,21	0,01	2,16	0,02	0,02
Ervas	0,04	14,51	7,47	1,07	0,40	41,78	2,41	0,28	8,69	0,00	38,39
Oxidado	84,03	28,44	73,10	54,87	11,48	0,21	25,50	0,93	17,86	18,30	44,44
Textura											
Cremona	32,75	0,00	4,03	0,05	0,00	0,23	47,99	11,11	97,12	0,16	3,14
Oleosa	64,83	0,03	18,65	39,67	17,96	0,00	31,40	13,01	0,76	0,66	12,61
ND	3	1	1	1	0	1	2	0	3	1	0

Nota: Valores em negrito não atende os valores especificados de $pF_{amostras}$.

ND: Número de vezes que o julgador não discriminou as amostras a $pF_{amostras} < 0,50$.

Tabela 3 - Desempenho dos julgadores em relação a repetibilidade dos resultados ($pF_{\text{repetições}}$). Valores desejáveis: $pF_{\text{repetições}} > 0,05$

Atributos	Julgador										
	1*	2	3	4	5	6*	7	8	9*	10	11
Aparência											
Esverdeada	46,79	37,45	26,52	49,67	27,70	45,64	66,44	44,44	73,51	18,31	43,64
Amarelada	73,30	12,67	15,62	71,21	51,87	49,43	55,66	84,20	14,02	42,57	5,70
Consistente	30,89	14,10	8,13	45,52	5,62	7,86	57,04	11,11	15,02	28,59	6,46
Aroma											
Alecrim	44,76	61,79	66,66	44,89	44,44	81,86	96,35	44,44	43,16	44,44	80,99
Tomilho	44,44	69,44	16,42	16,00	31,27	33,11	23,33	44,44	17,69	44,44	74,32
Ervas	42,88	18,08	12,89	51,82	19,86	26,17	59,03	40,54	62,68	44,44	20,65
Oxidado	44,44	84,03	73,92	25,51	40,61	2,00	30,98	44,44	10,05	87,49	11,15
Sabor											
Alecrim	36,49	38,15	47,04	93,68	42,21	43,42	44,28	33,20	91,71	68,99	57,65
Tomilho	45,51	43,19	21,40	12,31	55,15	30,78	27,82	58,87	71,98	40,90	64,68
Ervas	92,12	67,82	62,29	81,92	57,13	58,59	86,98	12,93	50,92	63,80	27,01
Oxidado	84,03	79,01	75,04	90,70	0,13	2,48	36,55	44,44	12,13	45,90	1,78
Textura											
Creмоса	36,35	11,37	33,01	89,17	97,35	68,87	26,10	44,44	92,51	10,59	48,80
Oleosa	73,61	42,68	67,10	74,42	3,63	0,35	49,34	44,44	0,10	90,05	11,33
NR	0	0	0	0	2	3	0	0	1	0	1

Nota: Valores em negrito não atende os valores especificados de pF_{amostras}

NR: Número de vezes que o julgador não discriminou as amostras a $pF_{\text{amostras}} > 0,05$

Tabela 4 - Média das três repetições para cada julgador e amostra

(continua)

		Julgador											
Atributos		1*	2	3	4	5	6*	7	8	9*	10	11	M.E
Aparência													
Esverdeada	A	2,73	0,23	6,27	1,03	1,37	2,13	3,50	2,53	2,27	6,93	6,40	3,22
	B	0,13	1,87	1,23	0,13	0,67	0,30	1,40	0,00	1,27	0,53	0,73	0,75
	C	0,20	0,20	0,97	0,10	0,27	0,20	2,03	0,00	1,00	0,00	0,27	0,48
Amarelada	A	2,63	6,87	3,47	4,33	1,07	5,60	4,10	2,30	3,27	2,20	5,60	3,77
	B	3,73	0,27	0,33	0,30	1,27	0,70	0,37	0,00	0,10	3,10	6,67	1,53
	C	7,00	4,27	6,27	4,20	3,23	3,30	5,33	3,73	5,43	7,30	8,47	5,32
Consistente	A	3,10	0,37	3,13	0,50	1,67	1,73	4,27	0,07	2,47	0,80	3,97	2,01
	B	4,30	0,37	1,13	1,60	1,70	1,73	3,17	0,07	2,57	3,87	4,17	2,24
	C	7,07	8,53	7,83	8,23	8,63	8,57	5,27	9,00	8,10	8,13	8,40	7,98
Aroma													
Alecrim	A	3,03	0,30	1,03	0,83	0,67	0,23	4,40	0,60	2,73	3,07	1,13	1,64
	B	0,17	5,27	0,20	0,13	0,80	0,33	0,27	0,00	0,57	0,00	3,57	1,03
	C	0,13	0,20	0,03	0,17	0,20	0,10	0,83	0,00	0,83	0,00	4,57	0,64
Tomilho	A	0,10	5,03	0,67	0,80	1,07	4,20	3,13	1,90	3,47	3,13	4,50	2,55
	B	0,13	0,23	0,23	0,27	0,40	0,50	0,13	0,00	0,10	0,00	0,70	0,25
	C	0,10	0,23	0,03	0,13	0,03	0,50	0,60	0,00	0,60	0,00	0,87	0,28
Ervas	A	3,03	0,43	1,70	1,10	1,73	0,87	3,50	1,23	2,87	3,13	4,53	2,19
	B	0,17	0,90	0,60	0,10	0,80	1,07	0,13	2,00	0,57	0,00	1,30	0,69
	C	0,17	0,23	0,00	0,13	0,17	0,17	0,97	0,00	0,60	0,00	1,50	0,36
Oxidado	A	0,13	0,30	0,07	0,07	0,57	5,07	0,97	0,00	0,73	0,20	1,20	0,85
	B	0,13	0,37	1,00	0,07	0,57	5,70	0,17	0,00	0,10	0,37	0,33	0,80
	C	0,13	0,20	0,97	0,23	1,40	0,87	1,13	2,07	1,13	0,17	1,37	0,88

Legenda: *= julgador excluído, A= emulsão com adição de tomilho (200 mg kg⁻¹ - base no teor de compostos fenólicos) B= emulsão com adição de alecrim (200 mg kg⁻¹ - base no teor de compostos fenólicos), C= maionese comercial, M.E= média da equipe, NR: número de vezes que o julgador estava fora de consenso com a equipe.

Nota 2: Valores em negrito são considerados valores fora do consenso com a equipe

Tabela 4 - Média das três repetições para cada julgador e amostra

(conclusão)

Atributos	Julgador											M.E	
	1*	2	3	4	5	6*	7	8	9*	10	11		
Sabor													
Alecrim	A	5,27	0,30	2,60	1,00	0,83	0,37	3,73	2,27	2,67	7,90	0,43	2,49
	B	0,70	5,63	0,47	2,77	1,60	0,70	0,30	2,87	2,30	1,23	3,63	2,02
	C	0,13	0,20	0,03	0,07	0,20	0,13	2,30	0,00	0,57	0,00	2,17	0,53
Tomilho	A	2,87	5,73	1,67	4,33	5,73	4,63	4,43	5,53	4,93	7,53	8,03	5,04
	B	0,23	0,30	1,13	1,10	0,27	0,43	0,27	0,87	0,20	1,27	1,03	0,65
	C	0,13	0,20	0,03	0,10	0,13	0,13	2,67	0,00	0,73	0,00	0,47	0,42
Ervas	A	8,20	0,73	2,60	3,37	6,03	0,90	3,67	1,53	4,20	7,80	2,17	3,75
	B	0,77	0,70	0,50	2,63	1,53	1,60	0,17	4,17	1,60	0,67	2,57	1,54
	C	0,10	0,17	0,00	0,43	0,17	0,20	1,50	0,00	0,53	0,00	0,90	0,36
Oxidado	A	0,13	0,23	0,53	0,20	0,63	5,57	0,83	0,00	0,60	1,57	0,33	0,97
	B	0,10	0,27	0,23	0,10	0,63	6,63	0,17	0,00	0,10	0,63	0,30	0,83
	C	0,10	0,17	0,30	0,17	1,00	1,07	0,97	1,30	0,97	0,00	0,33	0,58
Textura													
Cremosa	A	3,47	0,60	2,20	0,80	1,63	1,33	3,17	0,00	5,27	1,23	2,20	1,99
	B	4,53	0,60	1,83	1,07	1,63	1,43	3,13	0,00	5,10	2,40	1,80	2,14
	C	6,93	8,80	6,57	8,63	8,33	7,70	5,47	6,00	5,87	8,23	5,93	7,13
Oleosa	A	3,70	1,77	3,27	0,83	2,83	6,67	1,93	0,00	1,33	7,33	4,97	3,15
	B	4,33	3,17	1,77	0,83	2,87	6,80	2,57	0,00	1,23	6,50	4,13	3,11
	C	2,43	0,20	0,17	2,03	4,73	1,00	0,73	4,10	0,83	1,47	5,10	2,07
NR		2	4	2	0	0	3	0	4	1	3	2	

Legenda: *= julgador excluído, A= emulsão com adição de tomilho (200 mg kg⁻¹ - base no teor de compostos fenólicos) B= emulsão com adição de alecrim (200 mg kg⁻¹ - base no teor de compostos fenólicos), C= maionese comercial, M.E= média da equipe, NR: número de vezes que o julgador estava fora de consenso com a equipe.

Nota: Valores em negrito são considerados valores fora do consenso com a equipe.

4.4.1.3 Análise Descritiva quantitativa das amostras

A análise descritiva quantitativa foi realizada nas emulsões adicionadas das concentrações de extratos que apresentaram as melhores capacidades antioxidantes em teste acelerado: emulsão adicionada de extrato de alecrim (100%), emulsão adicionada de extrato de tomilho (100%), emulsão adicionada de mistura de extrato de alecrim e tomilho na proporção de 75% e 25% respectivamente, e, com o intuito de comparação, foi utilizada uma emulsão com adição de BHA. Todas as emulsões foram elaboradas com 100 mL de leite desnatado e 200 mL de óleo de girassol, adicionadas dos antioxidantes na dose de 100 mg kg⁻¹ (com base no teor de compostos fenólicos totais) (Figura 9). As amostras foram avaliadas no mesmo dia do processamento e todas foram apresentadas juntas aos julgadores.

Figura 9 – emulsões com 100% de extrato de tomilho, 100% de extrato de alecrim, 75% de extrato de alecrim mais 25% de extrato de tomilho e BHA, respectivamente.

Houve diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$) apenas para os atributos aparência consistente e sabor ervas. A maior média encontrada para aparência consistente foi para a amostra adicionada de tomilho, porém esta não diferiu significativamente ($p > 0,005$) das amostras adicionadas de extratos de tomilho e alecrim e de BHA (Tabela 5).

Já em relação ao atributo sabor ervas, a maior média encontrada foi para a amostra adicionada de extrato de alecrim, a qual não diferiu significativamente das demais que continham adição de extratos de ervas, apenas da amostra de BHA (Tabela 5).

Tabela 5 - Atributos relacionados a aparência, aroma, sabor e textura de emulsões adicionadas de extratos antioxidantes

		Tratamentos			
Atributos		Alecrim	Tomilho	Tom. + Al.	BHA
Aparência	Esverdeada	1,06 ^A	1,74 ^A	1,34 ^A	0,73 ^A
	Amarelada	0,53 ^A	0,84 ^A	0,98 ^A	0,73 ^A
	Consistente	1,30 ^B	3,20 ^A	2,30 ^{AB}	2,94 ^A
Aroma	Alecrim	0,49 ^A	0,50 ^A	0,53 ^A	0,56 ^A
	Tomilho	0,80 ^A	0,68 ^A	0,48 ^A	0,39 ^A
	Ervas	0,44 ^A	0,48 ^A	0,56 ^A	0,53 ^A
	Oxidado	0,39 ^A	0,26 ^A	0,30 ^A	0,23 ^A
Sabor	Alecrim	1,03 ^A	1,26 ^A	0,68 ^A	0,26 ^A
	Tomilho	0,85 ^A	1,64 ^A	0,78 ^A	0,73 ^A
	Ervas	1,90 ^A	1,75 ^A	0,70 ^{AB}	0,51 ^B
	Oxidado	0,24 ^A	0,56 ^A	0,53 ^A	0,38 ^A
Textura	Cremosa	1,33 ^A	1,73 ^A	1,26 ^A	1,77 ^A
	Oleosa	1,09 ^A	1,01 ^A	1,14 ^A	1,21 ^A

Legenda: DP = Desvio Padrão das médias; Tom.+Al. = Tomilho + alecrim

Nota: Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo Teste de Tukey

Nota: Os dados foram transformados pelo teste de homogeneidade (BOX-COX) para análise estatística. Os dados apresentados na tabela acima são os dados reais (sem transformação).

Observou-se que a amostra que contém BHA não diferiu da amostra que contém tomilho e alecrim para todos os atributos. Já em comparação com a amostra adicionada de tomilho, dos treze atributos comparados, somente houve diferença no sabor ervas, e, para a amostras com alecrim, para os atributos aparência consistente e sabor ervas (Tabela 5).

Pelos resultados obtidos, observa-se que a substituição do antioxidante sintético BHA pelos extratos de ervas nas doses utilizadas não interfere nos atributos sensoriais do produto estudado. Essa observação é importante, pois demonstra que o uso de antioxidantes a base de tomilho e alecrim, em doses isoladas ou em misturas, além de serem eficientes em retardar a oxidação, não limitariam as possibilidades de uso em alimentos por alterações sensoriais.

4.4.2 Perfil sensorial das amostras

Os dados obtidos permitiram a elaboração do perfil sensorial das amostras de produto tipo maionese adiconado de diferentes antioxidantes.

Para tanto, cada atributo foi representado por um eixo que se iniciou no centro da figura, onde o valor é zero, e, à medida que aumenta a intensidade do mesmo, ele tem sua escala deslocada do centro para fora. Os valores médios foram representados nos eixos

correspondentes a cada atributo, onde o perfil sensorial de cada amostra é traçado pela conexão dos pontos referentes a intensidade das médias (STONE et al., 1974).

Figura 10 - Perfil sensorial das emulsões tipo maionese adicionadas de antioxidantes

O perfil sensorial das amostras apresentou valores mais altos para o atributo consistência. O atributo sabor tomilho apresenta valores mais intensificados do que o sabor alecrim, sendo assim mais perceptível seu sabor, se confundindo até mesmo na amostra que só possui alecrim. O sabor oxidado é muito baixo e semelhante em todos os tratamentos. A cremosidade e a oleosidade das amostras possuem valores próximos entre os tratamentos. Já em relação a cor esverdeada, observa-se nas amostras com adição de ervas valores ligeiramente maiores, intensificados principalmente na presença de tomilho, o que não acontece com a cor amarelada, pois a amostra de alecrim apresentou valor mais baixo que a amostra com BHA (Figura 10).

Os valores encontrados para todos os atributos de aroma são muito próximos, não apresentando elevações nas amostras com adição de ervas, sendo seu perfil parecido com a amostra que contém BHA.

4.4.3 Análise sensorial – Teste de aceitação com escala hedônica

O teste de aceitação das emulsões adicionadas de antioxidantes foi realizado no tempo 0 (mesmo dia do processamento). Foram utilizadas as mesmas amostras da ADQ, porém para este teste foi adicionado 1% de cloreto de sódio em cada uma. A equipe sensorial foi composta por 45 julgadores, entre eles alunos e funcionários do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição (LAN/ESALQ), sendo 73% do sexo feminino e 27% do sexo masculino.

Os resultados do teste de aceitação com escala hedônica revelaram que não houve diferença estatística ($p>0,05$) para os atributos aroma e sabor entre os diferentes tipos de antioxidantes utilizados (Tabela 6).

Já em relação a aparência, a amostra contendo alecrim apresentou menor aceitação (5,23), porém não difere estatisticamente da amostra de tomilho ($p<0,05$). A amostra de maior aceitação em relação a este atributo foi a de BHA, a qual não difere das amostras contendo tomilho e tomilho/alecrim (Tabela 6).

Ao relacionarmos os dados de aparência do teste hedônico com a aparência consistente da ADQ, notamos que as notas mais baixas foram para a amostra contendo alecrim. Tal fato pode estar relacionado com a quantidade maior de água nesta amostra, pois como os teores de compostos fenólicos foram menores para o alecrim, a quantidade de extrato utilizado para atingir os 100mgKg^{-1} de compostos fenólicos foi maior, consequentemente aumentando o teor de água interferindo na consistência da amostra.

Ao analisar a textura, a amostra de maior aceitação foi a com adição de BHA (6,14), a qual se assemelha com a amostra adicionada de tomilho/alecrim (5,94) (Tabela 6). Já quando adicionado apenas alecrim, ocorre menor aceitação. Tal fato pode estar relacionado com a quantidade de água presente neste extrato, pois como o alecrim apresenta menores teores de compostos fenólicos. Para alcançar a concentração de 200ppm, foi acrescentado maiores volumes de extrato, consequentemente, aumentando o volume de água na amostra final, acarretando em uma menor consistência, interferindo na aceitação do produto.

Comparando os resultados de impressão global, as maiores notas foram encontradas para a amostra com tomilho (5,39), a qual não difere estatisticamente ($p<0,05$) das amostras de BHA e tomilho/alecrim (Tabela 6).

Neste estudo, os valores de aparência foram classificados na escala “gostei ligeiramente” e “gostei moderadamente”. Em relação ao aroma, todas as amostras foram classificadas como “não gostei, não desgostei”, indicando uma opinião não concreta na

aceitação. Para os demais atributos (sabor, textura e impressão global), a amostra adicionada de alecrim posicionou-se na escala “não gostei, não desgostei”, e as demais amostras na escala “gostei ligeiramente” (Tabela 6).

Tabela 6 - Teste de aceitação com escala hedônica (7 = gostei muito, 1 = desgostei muito) para diferentes atributos de emulsões tipo maionese adicionadas de extratos antioxidantes

Trat.	Atributos				
	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Imp. Global
Tomilho	5,75 ± 1,35 ^{AB}	4,77 ± 1,16 ^A	5,11 ± 1,32 ^A	5,75 ± 1,24 ^A	5,39 ± 1,22 ^{AB}
Alecrim	5,23 ± 1,43 ^B	4,61 ± 1,04 ^A	4,61 ± 1,38 ^A	4,95 ± 1,52 ^B	4,73 ± 1,28 ^B
Tom.+Al.	5,93 ± 1,04 ^A	4,75 ± 1,14 ^A	5,14 ± 1,69 ^A	5,91 ± 1,12 ^A	5,36 ± 1,46 ^A
BHA	6,14 ± 1,03 ^A	4,8 ± 1,27 ^A	5,07 ± 1,48 ^A	5,91 ± 1,18 ^A	5,3 ± 1,36 ^{AB}
CV	35,92	24,41	49,43	38,10	42,87

Legenda: DP= Desvio padrão, CV= Coeficiente de variação, Tom = tomilho, Al= alecrim

Nota: Os dados foram transformados pelo teste de homogeneidade (BOX-COX)

Salgado et al. (2006), estudando a aceitação da adição de ervas em maionese, observaram que a amostra contendo tomilho foi a que apresentou maiores valores em relação aos atributos de aceitação geral do produto, sabor e consistência, quando comparada com as amostras de contendo alecrim e manjerição. Estes atributos foram classificados na escala hedônica como “gostei extremamente”.

Dias, Menis e Jorge (2014), avaliaram a aceitação de extratos de alecrim adicionados ao óleo de soja. Notou-se que os consumidores aceitaram igualmente o óleo puro e o óleo adicionado do antioxidante, não ocorrendo diferença estatística entre as amostras, concluindo que pode ser utilizado na indústria de alimentos em substituição aos antioxidantes sintéticos.

Os resultados demonstraram que as amostras adicionadas de tomilho e tomilho/alecrim não diferiram na aceitação de todos os atributos quando comparados com a amostra adicionada de antioxidante sintético (BHA). Em relação a amostra que contém alecrim, ocorreu diferença de aceitação apenas para os atributos aparência e textura. Conclui-se assim que a substituição dos antioxidante sintético avaliado pelos antioxidantes naturais tomilho e a mistura tomilho e alecrim não influencia na aceitação dos atributos sensoriais, sendo promissora a sua utilização.

4.5 Conclusões

Dos treze atributos avaliados na ADQ, apenas em dois apresentaram diferença resultante da adição de extratos de ervas: sabor ervas (para amostras de tomilho e de alecrim individuais) e aparência consistente (para amostra de alecrim), demonstrando que interferiram no perfil sensorial das emulsões.

Em relação a aceitação das amostras, apenas a adicionada de extrato de alecrim diferiu da amostra adicionada de BHA para os atributos de aparência e textura. As demais não apresentaram diferença em nenhum dos atributos.

Conclui-se que a substituição dos BHA pelos extratos naturais, nas doses utilizadas, praticamente não interferiu no perfil sensorial e na aceitação do produto final, sendo promissora sua utilização.

Referências

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 12, 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União**, Brasília, 10 jan. 2001.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR ISSO 5492:2014**: análise sensorial dos alimentos. Rio de Janeiro, 1993. 25 p.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis**. 18th ed. Gaithersburg, 2005. 1200 p.
- BENDINI, A.; BARBIERI, S.; VALLI, E.; BUCHECKER, K.; CANAVARI, M.; TOSCHI, T.G. Quality evaluation of cold pressed sunflower oils by sensory and chemical analysis. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Frankfurt, v. 113, n. 11, p. 1375-1384, 2011.
- CANEPELE, M.A.B.; CANEPELE, C.; MUSIS, C.R.D.; SANTOS, P. Avaliação da qualidade sensorial de manga passa obtida sob diferentes formas de processamento. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 128-133, 2000.
- DAMÁSIO, M.H. **Medidas das propriedades mecânicas e da textura de géis mistos de k-carragenato, goma garrufim e goma guar**: influência da composição e relação entre os dados instrumentais e sensoriais. 1990. 263 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1990.
- DAMÁSIO, M. H.; COSTELL, E. Análisis sensorial descriptivo: generación de descriptores y selección de catadores. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, Valencia, v. 31, n. 2, p. 165-178, 1991.

DIAS, L.S.; MENIS, M.E.C.; JORGE, N. Effect of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extracts on the oxidative stability and sensory acceptability of soybean oil. **Journal of the science of food and agriculture**, London, v. 95, n. 10, p. 2021-2027, 2015.

DUTCOSKY, S.D. **Análise sensorial de alimentos**. Curitiba: Champagnat, 1996. 123 p.

GACULA, M.C. **Descriptive sensory analysis in practice**. Trumbull: Food and Nutrition, 1997. 711 p.

EMBUSCADO, M.E. Spices and herbs: natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**, Hunt Valley, v. 18, n., p.811–819, 2015.

GALLEGO, M.G.; GORDON, M.H.; SEGOVIA, F.J.; SHOWRYA, M.; ALMAJANO, M.P. Antioxidant properties of three aromatic herbs (rosemary, thyme and lavender) in oil-in-water emulsions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Madison, v. 90, n. 10, p. 1559–1568, 2013.

HARPER, A.M.; KOWALSKI, B.L. Individualized differences scaling, the analysis of independent sets of measurements: an application in environmental analytical chemistry. **Analytical Letters**, New York, v. 12, n. 7, p. 693-697, 1979.

LI, H.; FAN, Y.; LI, J.; TANG, L.; HU, J.; DENG, D. Evaluating and predicting the oxidative stability of vegetable oils with different fatty acid compositions. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 78, n. 4, p. 633-641, 2013.

MARTINS, C.M.R. **Proposta metodológica para otimização experimental de formulações**: um estudo de caso no setor alimentício. 2002. 182 p. Dissertação (Mestrado Profissionalizante em Engenharia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 1991. 354 p.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. **Sensory evaluation techniques**. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press, 1999. 387 p.

_____. **Sensory evaluation techniques**. 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2006. 464 p.

MINIM, V.P.R. **Análise sensorial**: estudos com consumidores. Viçosa: Ed. UFV, 2006. 225 p.

MOSKOWITZ, H.R. **Product testing and sensory evaluation of foods**. Westport: Food & Nutrition Press, 1983. 605 p.

MURRAY, J.M.; DELAHUNTY, C.M.; BAXTER, I.A. Descriptive sensory analysis: past, present and future. **Food Research International**, Amsterdam, v. 34, n. 6, p. 461–471, 2001.

SALGADO, J.M.; CARRER, J.C.; DANIELI, F. Avaliação sensorial de maionese tradicional e maionese enriquecida com ervas aromáticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 4, p.731-734, 2006.

SCARMINIO, I.S. **Desenvolvimento de um sistema Quimiométrico para microcomputadores e algumas aplicações**. 1989. 124 p. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1989.

SOUNIS, E. **Bioestatística**; princípios fundamentais, metodologia estatística, aplicação às ciências biológicas. 2. ed. São Paulo: McGraw-Hill, 1975. 230 p.

STONE, H. Quantitative descriptive analysis (QDA). In: HOOTMAN, R.C. **Manual on descriptive analysis testing**. West Conshohocken: ASTM International, 1992. p. 15-21.

STONE, H.; SIDEL, J.L.; OLIVER, S.; WOOLSEY, A.; SINGLETON, R.C. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technology**, Champaign, v. 28, n. 11, p. 24-34, 1974.

_____. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technology**, Champaign, v. 52, n. 2, p. 48-52, 1998.

YANG, Y.; SONG, X.; SUI, X.; QI, B.; WANG, Z.; LI, Y.; JIANG, LIANZHOU. Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 80, p. 141–147, 2016.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos sobre os antioxidantes naturais são de grande importância para avaliar o potencial de substituição em relação aos antioxidantes sintéticos. É importante não apenas avaliar a atividade antioxidante *in vitro*, mas também sua capacidade em retardar o processo oxidativo em produtos alimentícios, comprovando a eficácia destes compostos naturais.

O estudo permitiu comprovar que é possível a aplicação de extratos naturais ricos em compostos fenólicos e com considerável atividade antioxidante em sistemas *in vitro* em emulsão alimentícia. Os extratos obtidos a partir do alecrim apresentaram efeitos antioxidantes semelhantes ao BHA quando adicionados em emulsões alimentícias, em doses isoladas ou em misturas binárias com extrato de tomilho.

É de grande importância um produto apresentar aceitação pelo consumidor. Qualquer adição de substância diferente do padrão encontrado no mercado pode acarretar em rejeição. O estudo permitiu concluir que a adição de extratos de ervas em emulsões alimentícias praticamente não interfere no perfil descritivo das amostras, em que 85% dos atributos sensoriais avaliados não apresentaram diferença estatística em relação as emulsões adicionadas de antioxidantes sintéticos. Além disto, o teste de aceitação mostrou resultados positivos.

O presente estudo permitiu comprovar a eficácia dos antioxidantes obtidos a partir de extratos de ervas, mostrando promissora sua utilização em substituição aos antioxidantes sintéticos.

Como a adição dos extratos antioxidantes obtidos a partir de ervas praticamente não interferiram no perfil descritivo e na aceitação do produto final, sugere-se para futuros estudos o aumento das doses utilizadas, com o intuito de aumentar o potencial antioxidante.

Sugere-se também, a análise de cromatografia para quantificar quais antioxidantes estão presentes em cada tipo de amostra, para poder verificar qual está contribuindo para maior capacidade antioxidante *in vivo*.

Além das sugestões acima, verificar a permissão de uso na Farmacopéia brasileira.

ANEXO

Parecer Comitê de ética em Pesquisa com Seres Humanos

"ESCOLA SUPERIOR DE
AGRICULTURA "LUIZ DE
QUEIROZ" - ESALQ DA

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estabilidade oxidativa e avaliação sensorial de emulsões com extratos de ervas antioxidantes

Pesquisador: Thais Maria Ferreira de Souza Vieira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43634715.8.0000.5395

Instituição Proponente: "Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ da Universidade

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.024.782

Data da Relatoria: 15/04/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto visa encontrar alternativas aos antioxidantes sintéticos utilizados para retardar o processo de oxidação em produtos alimentícios de base lipídica, por extratos etanólicos das especiarias orégano (*Origanum vulgare* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.), que apresentam compostos fenólicos e atividade antioxidante em sistemas in vitro, aplicados a esses produtos. Será avaliada a capacidade antioxidante de extratos destas especiarias e suas misturas binárias e ternárias em sistemas modelo (óleo e emulsões alimentícias) e o impacto da adição de extratos de ervas sobre o perfil sensorial dos produtos. As misturas que apresentarem maior potencial antioxidante serão analisadas para o perfil sensorial pela análise descritiva quantitativa (ADQ).

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a estabilidade oxidativa de produtos de base lipídica, adicionados de antioxidantes naturais em suas misturas, os quais serão a partir de ervas aromáticas (alecrim, orégano e tomilho) em substituição aos antioxidantes sintéticos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Para minimização dos riscos serão realizadas, análises físicas, químicas e microbiológicas do produto elaborado antes do mesmo ser oferecido aos provedores.

Endereço: Avenida Pádua Dias, 11 Caixa Postal 9
Bairro: Pavilhão Ciências Humanas CEP: 13.418-900
UF: SP Município: RIBACABA
Telefone: (19)3429-4376 E-mail: mepegara@usp.br

**"ESCOLA SUPERIOR DE
AGRICULTURA "LUIZ DE
QUEIROZ" - ESALQ DA**

Continuação do Parecer: 1,204,782

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A incorporação de antioxidantes prolonga a vida útil dos produtos que contêm lipídios em sua composição retardando o processo de oxidação. A oxidação é responsável pelos odores e sabores desagradáveis nos produtos. O presente estudo visa avaliar a estabilidade oxidativa de antioxidantes naturais em produtos de base lipídica em substituição aos antioxidantes sintéticos devido a possível toxicidade dos mesmos.

O presente projeto visa a obtenção de alternativas promissoras para o consumo de produtos de base lipídica com segurança e qualidade nutricional. Com relação a seres humanos a avaliação sensorial segue os critérios reconhecidos pela ABNT.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentados com todos os requisitos necessários de forma clara.

Recomendações:

Nada a declarar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O trabalho apresenta todos os itens solicitados pelo Comitê.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

PIRACICABA, 15 de Abril de 2015

Assinado por:

**Maria Elisa de Paula Eduardo Garavello
(Coordenador)**

Endereço: Avenida Pádua Dias, 11 Caixa Postal 9

Bairro: Prédio Ciências Humanas

CEP: 13,418-900

UF: SP

Município: PIRACICABA

Telefone: (19)3429-4376

E-mail: mepegara@usp.br