

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

**Extração, microencapsulação e aplicação de antioxidantes de  
alecrim-do-campo e própolis verde em matrizes alimentares**

**Renata Iara Cavalaro**

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

**Piracicaba  
2021**

**Renata Iara Cavalaro**  
**Bacharela em Ciências de Alimentos**

**Extração, microencapsulação e aplicação de antioxidantes de alecrim-do-campo e própolis verde em matrizes alimentares**

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

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

**Piracicaba**  
**2021**

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

Cavalaro, Renata Iara

Extração, microencapsulação e aplicação de antioxidantes de alecrim-do-campo e própolis verde em matrizes alimentares / Renata Iara Cavalaro.  
-- Piracicaba, 2021.

123 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1.: *Baccharis dracunculifolia* 2. Própolis verde 3. Otimização 4. Microencapsulação 5. Check-all-that-apply. I. Título

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Eli e Antonio;  
Aos meus irmãos Raul e Renan;  
Aos meus sobrinhos Isabela, Eduardo, Olivia, Cecília e Augusto;  
Ao meu esposo Rodolfo;  
**Dedico.**

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por minha vida, saúde, por todas as graças e oportunidades que eu recebi durante toda minha trajetória.

Aos meus amados pais Eli e Antonio, por serem grandes incentivadores, por acreditarem em mim e nunca duvidarem que eu fosse capaz. Obrigada por todos os ensinamentos passados, amor e confiança depositada!

Aos meus irmãos Raul e Renan por sempre terem uma palavra de apoio, me incentivarem a seguir em frente e nunca desistir de meus sonhos. As minhas cunhadas Denise e Milena, por me proporcionarem risadas sem fim e serem grandes companheiras sempre.

Aos meus sobrinhos Isabela, Eduardo, Olivia, Cecília e Augusto, por me mostrarem que a alegria se apresenta nos momentos mais simples da vida. Obrigada pelo amor de vocês!

Ao meu companheiro de vida, meu esposo Rodolfo Viriato, agradeço por caminhar ao meu lado, por ser meu refúgio e sempre ter uma palavra de apoio para todos as ocasiões. Obrigada por todo amor que me dá todos os dias!

A minha família, entre avós, tios e primos por serem pessoas tão especiais e incentivadores.

A todos os meus amigos, por se fazerem presentes durante toda essa dura e empolgante jornada de obtenção do título de doutora. Obrigada por momentos de felicidade e boas risadas!

As minhas grandes amigas e irmãs de coração Anelique, Ana e Isadora, que estiveram ao meu lado desde pequena, me proporcionando meus melhores momentos e lembranças de amizade.

A família Viriato (Gérsula, Ronan (in memoriam), Bárbara e Vinícius) por orarem e torcerem por mim, por me aceitarem tão bem como membro da família e por tanto carinho.

Aos amigos que a ESALQ me proporcionou e que levo comigo sempre no coração. Obrigada àqueles que estiveram por perto quando eu precisei!

A professora e orientadora Dra. Thais Maria Ferreira de Souza Vieira por todos os ensinamentos passados, por me mostrar o que é ter alegria em repassar conhecimentos e por sua paciência no dia a dia.

Ao Técnico Luís Felipe, que colaborou muito com o desenvolvimento desse projeto e acabou se tornando um amigo do peito.

A todas as pessoas de contribuíram de forma direta e indireta para a realização deste trabalho, em especial Izabela Alvim, Thiago Yuki e Erick Almeida.

Aos membros titulares e suplentes da banca de defesa do doutorado por todas as correções e discussões, necessárias para a obtenção do projeto final desta tese.

Ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição pelo uso de sua infraestrutura para realização de aulas e análises.

A Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” / Universidade de São Paulo (ESALQ/USP) pela oportunidade de crescer como profissional e realizar pós graduações de qualidade em uma renomada Universidade.

A CAPES pela oportunidade e concessão da bolsa de Doutorado, que muito contribuiu para que fosse possível criar raízes em Piracicaba.

A cidade de Piracicaba, onde tenho tanto orgulho de dizer que residi ao longo de 5 anos entre mestrado e doutorado e pude ter experiências que levarei comigo no coração para o resto da vida.

A empresa Natucentro pelo fornecimento das amostras de alecrim-do-campo e própolis verde e por serem sempre tão solícitos e educados.

## EPÍGRAFE

“Tudo é uma questão de manter  
A mente quieta  
A espinha ereta  
E o CORAÇÃO tranquilo.”

Walter Franco

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
1.1 OBJETIVO GERAL .....	13
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>14</b>
<b>2. OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ALECRIM-DO-CAMPO E PRÓPOLIS VERDE COMO ANTIOXIDANTES NATURAIS</b> .....	<b>17</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>17</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>18</b>
2.1 REVISÃO DE LITERATURA .....	19
2.1.1 Oxidação lipídica .....	19
2.1.2 Antioxidantes .....	20
2.1.3 Antioxidantes naturais .....	22
2.1.4 Alecrim-do-campo ( <i>Baccharis dracunculifolia</i> ) .....	24
2.1.5 Própolis verde .....	26
2.1.6 Ultrassom .....	28
2.1.7 Microencapsulação .....	30
2.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	32
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>33</b>
<b>3. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE ANTIOXIDANTES DE <i>BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA</i> E PRÓPOLIS VERDE</b> .....	<b>43</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>43</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>44</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	45
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	46
3.2.1 Reagentes e químicos .....	46
3.2.2 <i>Baccharis dracunculifolia</i> e própolis verde .....	46
3.2.3 Desenho experimental .....	47
3.2.4 Produção de extratos de <i>Baccharis dracunculifolia</i> e própolis verde .....	48
3.2.5 Determinação do teor de compostos fenólicos totais .....	48
3.2.6 Determinação da capacidade antioxidante .....	48
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
3.3.1 Otimização da extração .....	49
3.3.3 Produção de extratos de alecrim-do-campo e própolis verde em condições otimizadas .....	55
3.3.4 Comparação entre os extratos otimizados de alecrim-do-campo e própolis verde .....	57
3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	58
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>59</b>
<b>4. ENCAPSULAÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E ALECRIM-DO-CAMPO POR SPRAY DRYING E AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS</b> .....	<b>63</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>63</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>64</b>
4.1. INTRODUÇÃO .....	65
4.2. MATERIAL E MÉTODOS .....	66
4.2.1 Obtenção do extrato .....	66
4.2.2 Secagem por spray dryer .....	67
4.2.3 Caracterização das micropartículas .....	67
4.2.4 Avaliação da retenção de compostos bioativos microencapsulados durante o armazenamento .....	69



4.2.6 Estabilidade oxidativa de emulsões adicionadas de extratos livres e microencapsulados..	71
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	73
4.3.1 Caracterização das micropartículas .....	73
4.3.2 Estabilidade dos compostos bioativos durante a estocagem .....	78
4.3.3 Estabilidade oxidativa de extratos livres e microencapsulados de própolis verde.....	81
4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	87
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>88</b>
<b>5. POTENCIAL DA ADIÇÃO DE ALECRIM-DO-CAMPO E PRÓPOLIS VERDE COMO ANTIOXIDANTES NATURAIS SOB O PERFIL SENSORIAL DE CONSUMIDORES DE MAIONESE .....</b>	<b>95</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>95</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>96</b>
5.1 INTRODUÇÃO .....	97
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	99
5.2.1 Obtenção e preparo dos extratos antioxidantes.....	99
5.2.2 Secagem dos extratos antioxidantes por spray drying.....	99
5.2.3 Painel Sensorial.....	100
5.2.4 Metodologia Check-All-That-Apply (CATA).....	104
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	106
5.3.1 Painel sensorial - Levantamento de atributos e concentrações.....	106
5.3.2 Check-all-that-apply (CATA).....	107
5.3.3 Aceitação geral.....	114
5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	116
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>117</b>
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS DO TRABALHO .....	123
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	123

## RESUMO

### Extração, microencapsulação e aplicação de antioxidantes de alecrim-do-campo e própolis verde em matrizes alimentares

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência como antioxidante, incluindo a percepção sensorial, de extratos livres e encapsulados de alecrim-do-campo e própolis verde, aspirando seu uso em alimentos. Foi realizada inicialmente uma otimização do processo de extração de compostos antioxidantes de botões florais de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) com uso do ultrassom, aplicando-se delineamento experimental e ajuste de modelos matemáticos para identificação de valores preditos e desejabilidade. Dessa forma foram produzidos extratos em condições otimizadas, avaliados quanto à capacidade antioxidante em comparação a extratos da própolis verde. As variáveis utilizadas nesse processo foram tempo de extração e concentração de etanol na solução extratora, com as respostas teor de fenólicos totais (*Total Phenolic Content* - TPC) e capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*). A condição otimizada foi definida com uso de etanol 99% durante 120 minutos de extração. Os extratos de *Baccharis dracunculifolia* e de própolis verde foram utilizados para obtenção de micropartículas por meio de *spray drying*. Os dados indicaram que a microencapsulação foi eficiente para proteger e liberar progressivamente os compostos de interesse. Os resultados de caracterização e análise de *shelf life* dos extratos livres e das micropartículas indicaram que o produto encapsulado obtido a partir da própolis verde se destacou quanto à liberação gradual dos compostos, por isso foi utilizado nos ensaios de aplicação em matriz lipídica, comparado ao antioxidante sintético TBHQ (Terc-butilhidroquinona). Verificou-se que o extrato encapsulado de própolis verde (200 ppm) apresentou desempenho similar ao TBHQ em reduzir o processo oxidativo ao final dos 25 dias de ensaio. Além dos ensaios para avaliação do efeito antioxidante em condições controladas, foram realizados ensaios de aplicação de extratos líquidos e em pó (produzidos a partir de própolis verde e alecrim-do-campo) em maionese para análise sensorial utilizando o método *Check-all-that-apply* (CATA). Constatou-se que, tanto as amostras com adição de antioxidante a base de própolis verde quanto aquelas adicionadas de antioxidante a base de alecrim-do-campo apresentaram peculiaridades percebidas pelos consumidores. Além disso, alguns atributos verificados nas amostras com antioxidante de própolis verde foram relacionados ao incremento no índice de aceitação da maionese. Os resultados evidenciam que os ingredientes produzidos nessa tese são alternativas tecnicamente viáveis ao antioxidante sintético TBHQ para aplicação em emulsão alimentícia. Dentre as duas matérias primas avaliadas, as micropartículas de própolis verde mostram-se mais promissoras para uso como antioxidante natural pela indústria de alimentos, dado seu poder antioxidante e aceitação sensorial.

**Palavras-chave:** *Baccharis dracunculifolia*; Própolis Verde; Otimização; Microencapsulação; *Shelf life*; *Check-all-that-apply*

## ABSTRACT

### Extraction, microencapsulation and application of rosemary-of-field and green propolis antioxidants in food matrices

This study aimed to evaluate the efficiency, antioxidant capacity and sensory perception of free and encapsulated extracts of rosemary-of-field and green propolis, aspiring their use as antioxidants in food. Initially, an optimization of antioxidants compounds from rosemary-of-field (*Baccharis dracunculifolia*) by ultrasound extraction process was performed, applying experimental design and adjustment of mathematical models to identify predicted values and desirability. Thus, extracts were produced under optimized conditions, and assessed for antioxidant capacity compared to data of green propolis extracts. The variables used in this process were extraction time and concentration of ethanol in the extraction solution to obtain responses of total phenolic content (TPC) and antioxidant capacity by the methods of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power). The optimized condition was defined using 99% ethanol during 120 minutes of extraction. *Baccharis dracunculifolia* and green propolis extracts were spray dried for micro-particles production. Micro-encapsulation was efficient to the protection and progressively releasing of compounds. The results of characterization and shelf-life analysis of the extracts and micro-particles indicated that the encapsulated product obtained from green propolis stood out regarding the gradual release of the compounds. For this reason, it was used for the application tests in food matrix, compared to the synthetic antioxidant TBHQ (Terc-butylhydroquinone). It was verified that the green propolis encapsulated extract (200 ppm) showed a performance similar to TBHQ in reducing the oxidative process at the end of the 25 days of experiments. In addition to the evaluation trials of the antioxidant effect under controlled conditions, application studies (liquid and powder extracts produced from green propolis and rosemary-of-field) were performed in mayonnaise for sensory analysis using the Check-all-that-apply (CATA) method. Both the samples (with added antioxidant based on green propolis and with the antioxidant based on rosemary-of-field) presented peculiarities perceived by consumers. In addition, some attributes verified in the samples with green propolis antioxidant were related to the increase in the acceptance of the mayonnaise. The results showed that the ingredients produced in this thesis are a technically feasible alternative to the synthetic antioxidant TBHQ for application in food emulsions. Among the two raw materials evaluated, the green propolis micro-particles show to be especially attractive for use as a natural antioxidant by the food industry, due to its antioxidant power and sensorial acceptance.

**Keywords:** *Baccharis dracunculifolia*; Green Propolis; Optimization; Micro-encapsulation; Shelf life; Check-all-that-apply

## 1. INTRODUÇÃO

A oxidação lipídica representa uma das alterações mais desafiadoras para a indústria de alimentos, afetando negativamente o valor nutritivo, as características sensoriais e a qualidade geral de produtos que contenham lipídios em sua composição (VARGAS-SÁNCHEZ et al., 2014), acarretando grandes perdas durante o armazenamento ao longo do *shelf life*. Visando evitar ou retardar a ocorrência desta reação de oxidação, os antioxidantes são empregados como recurso principal e mais efetivo na indústria (SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015).

A adição de antioxidantes naturais pode ser uma alternativa eficiente para solucionar os desafios gerados pela oxidação lipídica e por isso seu estudo é de grande importância, além disso, a indústria de alimentos está altamente focada em substituir os antioxidantes sintéticos por fontes naturais (CALEJA et al., 2017). Seu uso é bastante focado em emulsões do tipo óleo em água (O/A), que são comuns em alimentos como leite, creme, sopas, molhos, dentre outros alimentos processados (NOON, MILLS e NORTON, 2020), por isso o estudo do comportamento do antioxidante quando aplicado nesse sistema faz-se necessário.

A planta *Baccharis dracunculifolia* (Bd), também popularmente conhecida como alecrim-do-campo ou vassourinha, vem sendo estudada quanto às suas atividades biológicas, tais como atividade antimicrobiana (FERRONATTO et al., 2007) e antioxidante (MARTINEZ-CORREA et al., 2012; PAULA et al., 2017). É reconhecida no Brasil como a principal fonte botânica da própolis verde do Sudeste, que por sua vez também está no campo dos estudos relacionados a atividades biológicas como capacidade antioxidante e antifúngica abordada por Augusto-Obarae et al. (2019). Apesar de dados existentes quanto à capacidade antioxidante de ambas as fontes, os estudos de sua aplicação como antioxidantes naturais microencapsulados, a estabilidade oxidativa em alimentos e efeito sensorial abordando simultaneamente a própolis verde e sua fonte botânica ainda são pouco conhecidos.

A forma de extração influencia a quantidade e os tipos de compostos fenólicos com significativa capacidade antioxidante encontrados nas amostras. As técnicas de extração que vêm sendo utilizadas para amostras vegetais, tais como ultrassom, extração assistida por micro-ondas, por fluido supercrítico e acelerada com solvente (forma de extração com solvente pressurizado), objetivam principalmente encurtar o tempo de extração, diminuir o consumo de solvente, aumentar o rendimento e melhorar a qualidade dos extratos (WANG e WELLER, 2006). O principal método já utilizado para o gênero *Baccharis* foi a extração por CO<sub>2</sub> supercrítico (SILVA et al., 2009; PIANTINO et al., 2008; MARTINEZ-CORREA et al., 2012), sendo os estudos com ultrassom ainda escassos. No caso da própolis, a técnica de

extração assistida por ultrassom chegou a ser recentemente estudada por Reis et al. (2019) utilizando a própolis vermelha e própolis verde em estudo de Cavalaro et al. (2019).

Dentre as características do gênero *Baccharis* destaca-se o odor floral e amadeirado facilmente reconhecível (DÔRES et al., 2006), enquanto na própolis verde é observado com maior intensidade o aroma resinoso e balsâmico (FIGUEIREDO et al., 2015). Portanto, tais propriedades devem ser melhor exploradas visando seus usos como antioxidantes naturais aplicados em alimentos.

Os compostos fenólicos encontrados em plantas e afins são considerados os principais responsáveis pelo sabor amargo e sensação de adstringência em produtos como chás, vinho tinto, frutas, nozes e chocolate (LESSCHAEVE e NOBLE, 2005). Em algumas plantas, o *flavor* característico também representa um problema em potencial quando o intuito é aplicar o extrato antioxidante como ingrediente funcional (ARES et al., 2009). Portanto, alternativas para reduzir tais características são necessárias, considerando que sua aplicação em alimentos como ingrediente funcional pode mudar o produto final.

A tecnologia de microencapsulação por *spray dryer* tem sido utilizada por alguns autores que visam em seus estudos mascarar atributos indesejáveis de ingredientes alimentícios, como o amargor em caseína hidrolisada (SUBTIL et al., 2014) e amargor e adstringência em extrato de canela (OSTROSCHI et al., 2018), o que sugere que esta tecnologia possa ser eficiente na atenuação do flavor característico da *Baccharis dracunculifolia* e da própolis verde. O encapsulamento de compostos como os antioxidantes contribui com proteção dos mesmos, além da liberação controlada destes compostos e de seus respectivos odores e sabores fortes (VINCEKOVIĆ et al., 2017).

Tendo em vista a aplicabilidade de compostos ativos encapsulados naturais na indústria alimentícia, é importante conhecer seu comportamento quando adicionados em alimentos, bem como sua aceitação sensorial por parte do consumidor. Neste sentido, a metodologia *Check-All-That-Apply* (CATA), é utilizada quando é desejável que os consumidores indiquem atributos que mais se aplicam a um determinado produto (BRUZZONE, ARES e GIMÉNEZ, 2011).

Com este estudo, espera-se um avanço mais aprofundado sobre a viabilidade dos compostos antioxidantes presentes na própolis verde e sua principal fonte botânica (alecrim-do-campo), solucionando seus possíveis entraves à aplicação.

O Capítulo 1 introduz os conhecimentos gerais necessários para posterior aprofundamento e análises dos temas.

O Capítulo 2 apresenta um compilado de dados dos principais assuntos abordados no projeto em forma de revisão bibliográfica, salientando as lacunas existentes na literatura que serão abordadas ao longo de todo estudo. O Capítulo 3 aborda a otimização do processo de extração por ultrassom de compostos antioxidantes do alecrim-do-campo (*Baccharis*

*dracunculifolia*) frente a dados preliminares de otimização da própolis verde. O Capítulo 4 refere-se ao estudo de microencapsulação do alecrim-do-campo e própolis verde previamente otimizados, bem como a caracterização físico-química e estudo de *shelf life* das micropartículas, além de análises específicas de estabilidade oxidativa da amostra que apresentou melhor comportamento de liberação dos compostos do núcleo mantendo alta capacidade antioxidante. Por fim, o Capítulo 5 encerra o desenvolvimento do trabalho abordando a análise sensorial de maioneses adicionadas de alecrim-do-campo e própolis verde utilizando a metodologia *Check-all-that-apply* (CATA) para o levantamento de atributos quanto ao aroma, textura e aparência, analisando posteriormente a aceitação geral do produto.

## **1.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a eficiência, capacidade antioxidante e percepção sensorial de extratos encapsulados de alecrim-do-campo e própolis verde, aspirando seu uso como antioxidantes naturais em alimentos.

## REFERÊNCIAS

- Ares, G., Barreiro, C., Deliza, R. & Gámbaro, A. (2009). Alternatives to reduce the bitterness, astringency and characteristic flavour of antioxidant extracts. *Food Research International*, 42 (7), 871-878.
- Augusto-Obara, T. R., Oliveira, J. D., Gloria, E. M. D., Spoto, M. H. F., Godoy, K., Vieira, T. M. F. S. & Scheuermann, E. (2019). Benefits of superfine grinding method on antioxidant and antifungal characteristic of Brazilian green propolis extract. *Scientia Agricola*, 76 (5), 398-404.
- Bruzzone, F., Ares, G. & Giménez, A. N. A. (2012). Consumers' texture perception of milk desserts. II— Comparison with trained assessors' data. *Journal of Texture Studies*, 43 (3), 214-226.
- Caleja, C., Barros, L., Antonio, A. L., Oliveira, M. B. P. & Ferreira, I. C. (2017). A comparative study between natural and synthetic antioxidants: Evaluation of their performance after incorporation into biscuits. *Food chemistry*, 216, 342-346.
- Cavalaro, R. I., da Cruz, R. G., Dupont, S., de Moura, J. M. L. N. & Vieira, T. M. F. S. (2019). In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction. *Food chemistry: X*, 4, 100054.
- Dôres, R. G. R.; Casali, V. W. D.; Finger, F. L. & Cecon, P. R. (2006). Organoleptic analyses in capsules of carqueja [*Baccharis genistelloides* (Lam.) Pers.]. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 8, 125-129.
- Ferronato, R.; Marchesan, E. D.; Pezenti, E.; Bednarski, F. & Onofre, S. B. (2007). Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* DC e *Baccharis uncinella* DC (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17 (2), 224-230.
- Figueiredo, F. J. B., Dias-Souza, M. V., Nascimento, E. A., & De Lima, L. R. P. (2015). Physicochemical characterization and flavonoid contents of artisanal Brazilian green propolis. *International Journal of Pharmaceutics*, 7 (3), 64-68.
- Lesschaeve, I. & Noble, A. C. (2005). Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *The American journal of clinical nutrition*, 81 (1), 330S-335S.
- Martinez-Correa, H. A., Cabral, F. A., Magalhães, P. M., Queiroga, C. L., Godoy, A. T., Sánchez-Camargo, A. P., & Paviani, L. C. (2012). Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*

- obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 63, 31-39.
- Noon, J., Mills, T. B., & Norton, I. T. (2020). The use of natural antioxidants to combat lipid oxidation in O/W emulsions. *Journal of Food Engineering*, 110006.
- Ostroschi, L. C.; De Souza, V. B.; Echalar-Barrientos, M. A.; Tulini, F. L.; Comunian, T. A.; Thomazini, M. & Favaro-Trindade, C. S. (2018). Production of spray dried proanthocyanidin-rich cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) extract as a potential functional ingredient: Improvement of stability, sensory aspects and technological properties. *Food Hydrocolloids*, 79, 343-351.
- Paula, J. T.; Sousa, I. M.; Foglio, M. A. & Cabral, F. A. (2017). Selective fractionation of supercritical extracts from leaves of *Baccharis dracunculifolia*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 127, 62-70.
- Piantino, C. R.; Aquino, F. W.; Follegatti-Romero, L. A. & Cabral, F. A. (2008). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47 (2), 209-214.
- Reis, J. H. D. O., Barreto, G. D. A., Cerqueira, J. C., Anjos, J. P. D., Andrade, L. N., Padilha, F. F., Machado, B. A. S. (2019). Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. *PloS one*, 14(7), e0219063.
- Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Acedo-Félix, E., Carvajal-Millán, E., González-Córdova, A. F., Vallejo-Galland, B., ...& Sánchez-Escalante, A. (2014). Antioxidant and antimicrobial activity of commercial propolis extract in beef patties. *Journal of Food science*, 79(8), C1499-C1504.
- Vinceković, M.; Viskić, M.; Jurić, S.; Giacometti, J.; Kovačević, D. B.; Putnik, P. & Jambrak, A. R. (2017). Innovative technologies for encapsulation of Mediterranean plants extracts. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 1-12.
- Shahidi, F. & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.
- Silva, D. C.; Bresciani, L. F.; Dalagnol, R. L.; Danielski, L.; Yunes, R. A. & Ferreira, S. R. (2009). Supercritical fluid extraction of carqueja (*Baccharis trimera*) oil: Process parameters and composition profiles. *Food and Bioproducts Processing*, 87 (4), 317-326.



Subtil, S. F.; Rocha-Selmi, G. A.; Thomazini, M.; Trindade, M. A.; Netto, F. M. & Favaro-Trindade, C. S. (2014). Effect of spray drying on the sensory and physical properties of hydrolysed casein using gum arabic as the carrier. *Journal of food science and technology*, 51 (9), 2014-2021.

Vargas-Sánchez, R. D., Torrescano-Urrutia, G. R., Acedo-Félix, E., Carvajal-Millán, E., González-Córdova, A. F., Vallejo-Galland, B., & Sánchez-Escalante, A. (2014). Antioxidant and antimicrobial activity of commercial propolis extract in beef patties. *Journal of Food Science*, 79(8), C1499-C1504.

Wang, L. & Weller, C. L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (6), 300-312.

## 2. OBTENÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ALECRIM-DO-CAMPO E PRÓPOLIS VERDE COMO ANTIOXIDANTES NATURAIS

### RESUMO

A indústria de alimentos está em constante transformação, buscando aprimorar seus conceitos, seguir as demandas dos consumidores, sem deixar de se preocupar com a segurança alimentar. O uso de antioxidantes naturais para evitar degradação por meio da reação de oxidação lipídica é um dos requisitos recentes. Por isso, estudos aprofundados são necessários, visando aprimorar de maneira otimizada toda cadeia de obtenção desse aditivo, desde a extração de compostos fenólicos de interesse, verificação da sua capacidade antioxidante ao longo de todo processo de *shelf life* e suas propriedades sensoriais quando aplicado em alimentos. A própolis verde e sua principal fonte botânica alecrim-do-campo são relatados como fontes de compostos antioxidantes e podem ser utilizados para substituir antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos. Por isso, lacunas devem ser solucionadas a ponto de compreender melhor a funcionalidade dessas duas fontes como aditivos alimentares quando microencapsulados.

Palavras-chave: Antioxidantes naturais; Própolis Verde, Alecrim-do-campo, Microencapsulação

## **ABSTRACT**

The food industry is constantly changing, moving to improve its concepts, following the demands of consumers, while remaining concerned with food security. The use of natural antioxidants to prevent degradation through the lipid oxidation reaction is one of the recent requirements. Therefore, more studies are necessary, aiming to optimize the entire chain of obtaining this additive, from the extraction of phenolic compounds of interest, verification of its antioxidant capacity throughout the shelf-life process and what are its sensory properties when it was applied to food. Green propolis and its main botanical source rosemary-of-field are reported as sources of antioxidant compounds and can be used to replace synthetic ones in the food industry. Hence, gaps must be addressed to the point of better understanding the functionality of these two sources as food additives when microencapsulated.

Keywords: Natural antioxidants; Green Propolis, Rosemary-of-field, Microencapsulation

## 2.1 Revisão de literatura

### 2.1.1 Oxidação lipídica

A oxidação lipídica é uma reação bastante comum e pode ser responsável pela produção de sabores e odores rançosos em alimentos que contenham óleos e gorduras (TAGHVAEI e JAFARI, 2015). Os autores supracitados afirmaram que a auto-oxidação é a reação de oxidação mais comum durante o armazenamento de óleos comestíveis. Esta reação ocorre a partir da reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados e pode modificar atributos sensoriais e nutricionais dos alimentos (GOMES et al., 2017).

A auto-oxidação é dividida em três estágios: inicial, de propagação e terminal. Inicialmente, o oxigênio ativado interage com um iniciador, reagindo com um ácido graxo insaturado, havendo a retirada de um átomo de hidrogênio do carbono metilênico adjacente à ligação dupla carbono-carbono. Durante a propagação, ocorre a formação de hidroperóxidos e esta etapa da reação se propaga até o esgotamento de oxigênio e ácidos graxos insaturados. A fase terminal é caracterizada, a partir da decomposição dos hidroperóxidos, pela formação de produtos finais estáveis ou não reativos como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos (FERRARI, 1998; KIRK, 1984). Os hidroperóxidos, apesar de deletérios à saúde, não geram alterações organolépticas nos alimentos, entretanto, quando decompostos em produtos finais, há um impacto pela formação de sabores e odores indesejáveis (SHAHIDI, 1998). Durante a formação de hidroperóxidos a partir dos ácidos graxos insaturados, deve-se verificar a variação de dienos e trienos conjugados, que são produzidos a partir do rearranjo das duplas ligações. Neste sentido, os hidroperóxidos e dienos conjugados são relativos aos produtos primários de oxidação lipídica, enquanto os trienos conjugados referem-se aos produtos secundários da reação (CHEONG, TAN e NYAM, 2017).

Uma das principais causas de deterioração de alimentos é a rancidez oxidativa gerada pela oxidação lipídica, criando certa rejeição do produto devido a mudanças na textura, odor, sabor, coloração e até mesmo compostos perigosos (DECKER, ELIAS e MCCLEMENTS, 2010). Tais produtos perigosos são produzidos por radicais livres e reativos ao oxigênio, que podem estar associados à carcinogênese, mutagênese, inflamação, envelhecimento e doenças cardiovasculares (ROBLES-RAMÍREZ et al., 2016).

Alguns fatores podem atuar favorecendo a reação de oxidação e por consequência a deterioração, como por exemplo: presença de oxigênio e metais pesados, temperatura, calor, luz e o número de insaturações (TAGHVAEI e JAFARI, 2015). A composição de ácidos graxos insaturados contribui na determinação da estabilidade oxidativa final. Dentre os óleos

existentes, destaca-se o óleo de soja especificamente com alto conteúdo de ácido linoleico, que acelera a reação de oxidação (MASUCHI et al., 2008).

Não somente a instauração deve ser considerada na determinação do grau de estabilidade oxidativa de um óleo vegetal, mas também sua composição inicial, grau de processamento, condições de armazenamento e a concentração de compostos antioxidantes ou pro-oxidantes (CRAPISTE, BREVEDAN e CARELLI, 1999). O monitoramento e controle da oxidação possibilita um aumento do *shelf life* e aceitabilidade dos produtos pelos consumidores. Neste sentido, a aplicação de antioxidantes se faz necessária para produtos alimentícios, visando aumentar seu *shelf life*. Kiokias, Varzakas e Oreopoulou (2008) afirmaram em seu estudo, que os compostos antioxidantes devem ser, além de eficazes, baratos, não tóxicos, eficazes em baixas concentrações, altamente estáveis e capazes de sobreviver ao processamento, além de serem fáceis de incorporar no produto alimentício.

### **2.1.2 Antioxidantes**

A denominação de antioxidantes refere-se a substâncias capazes de preservar o alimento contra deteriorações, rancidez e descolorações produzidas na oxidação (SHAHIDI, JANITHA e WANASUNDARA, 1992), ou ainda, como definido por Andreo e Jorge (2006), são substâncias capazes de prevenir a oxidação lipídica de matrizes alimentares ricas em óleos e gorduras.

Os antioxidantes podem atuar na reação de oxidação através da diminuição da concentração de oxigênio, interceptação do oxigênio singlet, eliminação de radicais iniciadores como a hidroxila; podem atuar se ligando aos catalisadores de íons metálicos, decompondo produtos primários de oxidação em espécies não radicais e quebrando a reação em cadeia para se evitar a abstração contínua de hidrogênio a partir de substratos (SHAHIDE, 2015; SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015).

Atta, Mohamed e Abdelgawad (2017) exemplificam a atuação dos antioxidantes como neutralizadores de radicais livres ao se tornarem oxidados. Dividem tais antioxidantes, de acordo com sua função, em dois grupos: (1) quebra de cadeia e (2) preventivo.

O primeiro processo ocorre quando um radical livre libera ou abstrai um elétron e um segundo radical é formado. Esta etapa se repete com uma terceira molécula, gerando produtos mais estáveis e continua até a terminação ou o radical ser estabilizado por um antioxidante, que é responsável por quebrar a cadeia ou se decompõe em um produto inofensivo. Já o grupo preventivo atua reduzindo a taxa de iniciação da cadeia, eliminando radicais iniciantes ou estabilizando os radicais de metais de transição.

Os antioxidantes podem ser classificados em sintéticos ou naturais, sendo estes últimos provenientes de extratos de plantas e afins, extraídos com diferentes solventes e tecnologias de extração (SHAH, BOSCO e MIR, 2014). Os antioxidantes sintéticos são aqueles que não ocorrem na natureza e são produzidos quimicamente para serem adicionados ao alimento (ATTA, MOHAMED e ABDELGAWAD, 2017).

Os antioxidantes sintéticos são estritamente regulados pelos órgãos regulatórios devido ao seu potencial efeito de toxicidade, além disso seu uso pela indústria de alimentos tem declinado de acordo com o aumento da busca do consumidor por produtos naturais (SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015). Alguns casos relatados com os antioxidantes sintéticos Butil-hidroxianisol (BHA), terc-butilhidroquinona (TBHQ), 2-terc-butil-4-metilfenol (TBMP) e Propil Galato (PG) já foram associados a danos na estrutura do DNA, já que podem formar complexos moleculares com a estrutura do ácido nucleico (DOLATABADI e KASHANIAN, 2010).

Dentre os antioxidantes citados anteriormente, o antioxidante TBHQ já foi avaliado por Khan e Shahidi (2001) como mais eficaz em relação ao (BHA) e *butylated hydroxytoluene* (BHT) quando aplicados em óleo de primula. Independente da eficácia, os antioxidantes sintéticos geram uma série de discussões relacionadas à sua toxicidade a longo prazo e, por isso, a concentração permitida para adição em alimentos é regulamentada em alguns países (TAGHVAEI e JAFARI, 2015). Em alguns locais como o Japão e União Européia o TBHQ é estritamente proibido, enquanto no Brasil seu uso é restrito ao máximo de 200 mg.kg<sup>-1</sup> de alimento (KAROVIČOVÁ e ŠIMKO, 2000; DING e ZOU, 2015; BRASIL, 2005).

Apesar de antioxidantes como BHA e BHT serem considerados GRAS (geralmente aceitos como seguros), desde estudos realizados nos anos 80 o BHT é relatado como promotor de tumor quando ministrado em altos níveis em ratos (WITSCHI, 1981). Em contraste, Franco, Navarro e Martínez-Pinilla (2019) defendem que os antioxidantes sintéticos, cuja nomenclatura na Europa é representada com E mais números (EXXX), têm sido estudados cuidadosamente para serem considerados seguros nas doses permitidas de uso. Esses autores justificaram que o uso de antioxidantes sintéticos é melhor do que consumir um alimento em decomposição. Assim, é importante rever alguns conceitos quanto à interação dos antioxidantes com outros ingredientes quando adicionados ao alimento, sua toxicidade em determinadas concentrações e, até mesmo, o conhecimento de novos antioxidantes que venham suprir esta necessidade atual do consumidor de consumir produtos naturais.

### 2.1.3 Antioxidantes naturais

Os antioxidantes naturais podem ser separados em dois grandes grupos: enzimáticos e não enzimáticos. Os enzimáticos interrompem a reação da cadeia oxidante ou doam seus elétrons para os radicais livres, atuando na redução da energia destes radicais. Em contraste, os antioxidantes não enzimáticos são aqueles derivados de plantas como é o caso de compostos fenólicos (ATTA, MOHAMED e ABDELGAWAD, 2017).

Os compostos fenólicos são compostos bioativos e podem ser classificados como antioxidantes dependendo de sua concentração (KARAKAYA, 2004), tais compostos estão presentes como metabólicos secundários de plantas e podem agir como terminadores de radicais livres e até mesmo quelando metais (NACZK e SHAHIDI, 2004; SHAHIDI e AMBIGAIPALAN, 2015). Os principais fenólicos antioxidantes das plantas são: ácidos fenólicos, diterpenos, flavonoides e óleos voláteis (SHAN et al., 2005).

Diversas fontes de compostos fenólicos vêm sendo estudadas como antioxidantes naturais, sendo obtidos de frutas, ervas, especiarias e plantas (BISWAS, CHATLI e SAHOO, 2012; FADDA et al., 2017; DVORACKOVA et al., 2015; SHAH, BOSCO e MIR, 2014; BHUYAN et al., 2015; SABIR et al., 2017). Estes compostos estão diretamente relacionados com a absorção de nutrientes, síntese de proteínas, atividade enzimática, fotossíntese, formação de componentes estruturais, alelopatia e defesa contra fatores ambientais diversos das fontes previamente citadas. A Tabela 1 apresenta estudos recentes que utilizaram produtos naturais de diversas fontes para aplicação como antioxidante em alimentos.

**Tabela 1.** Classificação de antioxidantes e suas aplicações em alimentos

<b>Tipo</b>	<b>Fonte do antioxidante</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Título do trabalho</b>	<b>Referência</b>
<b>Ervas</b>	Orégano	Frango	Effect of direct adding oregano essential oil ( <i>Origanum syriacum</i> L.) on quality and stability of chicken meat patties	Al-Hijazeen (2018)
	Sálvia e orégano	Almôndegas de frango	The use of natural antioxidants (oregano and sage) to reduce hexanal production in precooked chicken during chill storage	Marques Pino et al. (2013)
<b>Especiarias</b>	Alho	Salsicha de frango	Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage	Sallam, Ishioroshi e Samejima (2004)
	Gengibre, canela, cravos e outros	Porco	Comparison of the antioxidant activities of 22 commonly used culinary herbs and spices on the lipid oxidation of pork meat	Tanabe, Yoshida e Tomita (2002)
<b>Frutas</b>	Mirtilo	Pão	Andean blueberry ( <i>Vaccinium floribundum</i> ) bread: physicochemical properties and bioaccessibility of antioxidants	Guijarro-Fuertes et al. (2019)
	Kiwi	Patê de presunto	Development and Quality of Ham Pâté with Added Natural Antioxidant Kiwi Fruit ( <i>Actinidia deliciosa</i> ) Skin	Soquetta et al. (2017)
<b>Plantas</b>	Damsissa ( <i>Ambrosia maritima</i> )	Carne moída	Antioxidant and antimicrobial potentials of Damsissa ( <i>Ambrosia maritima</i> ) leaf powder extract added to minced beef during cold storage	Said et al. (2018)
	Folha de pitangueira	Óleo de canola	Assessment of the Suitability of Pitanga Leaf Extract as a Natural Antioxidant for Enhancing Canola Oil Stability: Monitoring Lipid Oxidation Parameters	Vargas et al. (2019)



Os extratos vegetais, em sua maioria, não apresentam um componente fenólico único e sim uma mistura de vários deles. O perfil e a quantidade destes compostos bioativos extraídos das matrizes das plantas dependem diretamente do método e tempo de extração, além do tipo da polaridade do solvente utilizado (RODRÍGUEZ-PÉREZ et al., 2015).

A efetividade dos compostos bioativos com potencial antioxidante deve-se em alguns casos à sinergia com outros antioxidantes (fitoquímicos ou sintéticos) ou a altas concentrações utilizadas, podendo, assim, gerar alterações no sabor, cor, odor e textura (SONAM e GULERIA, 2017)

Alguns compostos fenólicos, como por exemplo os taninos, possuem características adstringentes (BENNICK, 2002), enquanto compostos sesquiterpenos podem ser responsáveis pelo amargor característico (BOIX et al., 2010).

#### **2.1.4 Alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*)**

A família Asteraceae representa plantas de aspectos variados, que no geral se caracterizam por se apresentarem como pequenas ervas e arbustos. Nesta família, inclui-se o gênero *Baccharis* spp., que é distribuído especificamente na América e no Brasil é amplamente encontrado nas regiões montanhosas do Sul e Sudeste (VERDI, BRIGHENTE e PIZZOLATTI, 2005), com mais de 120 espécies descritas em nosso país (SFORCIN et al., 2012).

Dentro do gênero, alguns estudos estão sendo desenvolvidos quanto às suas propriedades biológicas. Na medicina popular, são utilizadas plantas do gênero *Baccharis* spp. para tratamento digestivo, infecções de pele, diabetes, uso diurético, laxante, antisséptico, dentre outros (ABAD e BERMEJO, 2007). Um estudo recente de Sabir et al. (2017) ilustrou uma significativa capacidade antioxidante e teor de compostos fenólicos totais utilizando a *Baccharis trimera* como fonte, propondo que as plantas do gênero *Baccharis* são uma fonte promissora para aplicação em alimentos como antioxidante natural.

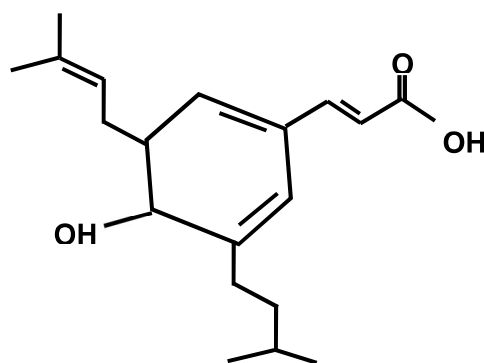
A *Baccharis dracunculifolia* é popularmente conhecida como alecrim-do-campo, vassourinha ou alecrim de vassoura (BARROSO, 1976). É uma planta da família Asteraceae que cresce no continente americano, em países como Argentina, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Brasil (PIANTINO et al., 2008). É considerada a principal fonte vegetal (Figura 1) da própolis do sudeste brasileiro, conhecida como própolis verde (PARK et al., 2004) e apresenta equivalentemente uma variedade de compostos fenólicos de interesse em sua composição. Estudos apontaram que a abelha *Apis mellifera* obtém material dos brotos ou exudados, substâncias voláteis e ceras preferencialmente desta planta para a produção de própolis (PARK, ALENCAR e AGUIAR, 2002).



**Figura 1.** Ramo de *Baccharis dracunculifolia* com botões florais. Fonte: Arquivo pessoal, 2018.

Dentre os compostos encontrados na *Baccharis dracunculifolia*, muitos também são verificados na própolis verde. Seus constituintes dividem-se em sesquiterpenos oxigenados (49,61%), sesquiterpenos (11,83%), sesquiterpenos oxigenados minoritários (7,59%) e monoterpenos (0,97%), tendo suas concentrações aumentadas progressivamente de julho a abril (SFORCIN et al., 2012). Paula et al. (2017) afirmam em seu estudo que dentre os componentes fenólicos majoritários já encontrados está o ácido 3,5-diprenil-1,4-hidroxicinâmico (Artepelin C), além de *kaempferol*, ácido p-cumárico, bacarina e outros.

O composto Artepelin C foi considerado majoritário em um estudo realizado por Maróstica Junior et al. (2008), além disso, os flavonoides foram encontrados em maior quantidade no extrato etanólico do broto da *Baccharis dracunculifolia* quando comparado ao extrato etanólico de própolis.



**Figura 2.** Estrutura química do Artepelin C. Fonte: Adaptado de Wysocky Júnior, 2013.

A composição química da planta é influenciada por fatores geográficos e ambientais, tais como a altitude e o local de coleta (BESTEN et al., 2012). A fenofase da planta é determinante no rendimento, composição química, características físicas e químicas do produto extraído (CAZELLA et al., 2019)

Visando atrair as abelhas pelo olfato, o alecrim-do-campo é caracterizado por possuir aroma forte e exótico, sendo que dentre os principais constituintes voláteis destaca-se o (E) nerolidol (SFORCIN et al., 2012). Há alguns anos, tal composto foi regulamentado nos Estados Unidos da América pela agência reguladora Food and Drug Administration (FDA) como um agente flavorizante utilizado em alimentos (ARRUDA; D´ALEXANDRI; ULIANA, 2005). Estes constituintes conferem características organolépticas específicas, tendo potencial para aplicação na indústria de novos produtos. No entanto, novos estudos que visam sua aplicação como compostos bioativos na indústria alimentícia ainda devem ser aprofundados, a fim de que estas características não interfiram no produto final.

Os compostos bioativos em geral são sensíveis a diversos fatores, como: oxigênio, luz, calor, água e podem se degradar formando *off-flavors*, *off-colors* e até mesmo compostos carcinogênicos limitando seu *shelf life* (ĐORĐEVIĆ et al., 2015). Além disso, alguns destes compostos apresentam, dentre suas características, aromas e sabores que podem interferir na aceitação de seus produtos derivados. Champagne e Fustier (2007) afirmam em seu estudo que é desejável que a adição de compostos bioativos como ingredientes em produtos alimentícios não afete as propriedades sensoriais.

A variação da flora utilizada pelas abelhas para a produção de própolis determina sua composição química, incluindo os voláteis responsáveis pelas suas características sensoriais.

### **2.1.5 Própolis verde**

A própolis é um material coletado por abelhas *Apis mellifera* de plantas, combinado com secreções salivares e enzimáticas além de ceras (FIGUEIREDO et al., 2015). Os autores supracitados relatam que a própolis é o terceiro principal produto apícola mais importante produzido pela colmeia, sendo composto majoritariamente por compostos resinosos e bálsamo (55%), 30% de cera de abelha, 10% de óleos etéreos e aromáticos, 5% de pólen e demais compostos orgânicos.

A produção de própolis pelas abelhas é necessária visando principalmente a proteção e defesa da colmeia de insetos e ventos, manutenção da temperatura interna (35°C), além de ser utilizada para embalsamar insetos invasores (BANKOVA, CASTRO e MARCUCCI, 2000; PASUPULETI et al., 2017).

Para obtenção da própolis, as abelhas coletam material de diversos locais das plantas como folhas, brotos, cascas e exsudados (Park et al., 1997). Sua fonte botânica e região geográfica de coleta são essenciais para determinar o tipo de própolis produzida, sendo que tais fatores são responsáveis pela diversidade de cores existentes variando entre amarelo claro, marrom escuro, vermelho e verde (SALATINO et al., 2011). Salatino e Salatino (2017) reuniram em seu estudo alguns tipos de própolis brasileira de acordo com sua composição e fonte: (1) própolis vermelha do Nordeste (exsudado de *Dalbergia ecastophyllum*), (2) própolis preta da Amazônia (exsudado de flores de *Clusia*), (3) amarela e marrom de diversas espécies botânicas.

No Brasil existem 13 classificações de própolis de acordo com suas características individuais de propriedades físico-químicas e área geográfica. Para cada classificação foi descrita uma diversidade de fontes botânicas utilizadas pelas abelhas, como por exemplo: *Baccharis dracunculifolia* ou alecrim-do-campo (própolis verde brasileira) (MARÓSTICA JUNIOR et al., 2008), *Dalbergia ecastophyllum* (própolis vermelha brasileira) (MACHADO et al., 2016), *Hyptis divaricata* (própolis marrom brasileira) e *Populus alba* (própolis do tipo álamo) (PARK et al., 2002). Além de outras descobertas como a própolis do Pacífico (*Macaranga spp.*), própolis mediterrânea (fonte vegetal: coníferas) e a própolis da Amazônia brasileira (fonte vegetal provável *Clusia sp.*) (KUMAZAWA et al., 2008; KALOGEROPOULOS et al., 2009; SALATINO et al., 2011).

Um dos principais países produtores de própolis é o Brasil, onde surpreendentemente o número de espécies de fontes botânicas utilizadas pelas abelhas para elaboração da própolis é bem baixo (SALATINO e SALATINO, 2017). Os autores supracitados relatam que as abelhas possuem alguns requisitos para escolherem a planta que fornecerá o material fonte de resina para a produção da própolis. Inicialmente, a composição química deve preencher o requisito de ser uma barreira contra patógenos e posteriormente a planta deve fornecer exsudados disponíveis e possíveis de serem coletados pelas abelhas, ou seja, material facilmente quebrável pelas mandíbulas desses insetos.

Neste sentido, amostras coletadas de diferentes partes do país apresentam variação nos componentes biologicamente ativos como é o caso dos compostos fenólicos (NUNES et al., 2009). Em geral, amostras de própolis brasileira apresentam uma variedade de compostos químicos, dentre eles, derivados dos ácidos cinâmico, benzóico, fenólico e também flavonoides (PARK et al., 2002).

Os compostos fenólicos da própolis têm recebido atenção devido as suas potenciais atividades biológicas como antioxidante, antimicrobiana, anti-viral e anticâncer (AKAO et al., 2003; JUG, KONČIĆ e KOSALEC, 2014), além de possuírem uma gama de aplicações na área da saúde, cosméticos e alimentos. Analisar o perfil cromatográfico da própolis é um

grande desafio, já que é um material que muda sua composição de acordo com a região, estação do ano e flora (CHANG et al., 2008).

Em regiões tropicais como o Brasil destaca-se a própolis verde brasileira, que tem sua atividade biológica ligada aos níveis elevados de ácidos prenilados p-cumáricos, principalmente o Artepellin C (ácido 3,5-diprenil-p-cumárico) e bacarina (3-prenyl-4-(dihydrocinnamoyloxy)-cinnamic acid) (VEIGA et al., 2017). O Artepellin C é reconhecido como o marcador químico da própolis verde e facilita a distinção da própolis verde dos outros tipos existentes (HUANG et al., 2014). Estudos contribuem para a definição da melhor época do ano para obtenção deste composto na própolis verde, relatando que a melhor época para colheita do material concentra-se entre fevereiro e abril (SFORCIN et al., 2012). Assim como na própolis verde, sua principal fonte vegetal *Baccharis dracunculifolia* ou alecrim-do-campo, apresenta um perfil cromatográfico semelhante (PARK et al., 2004).

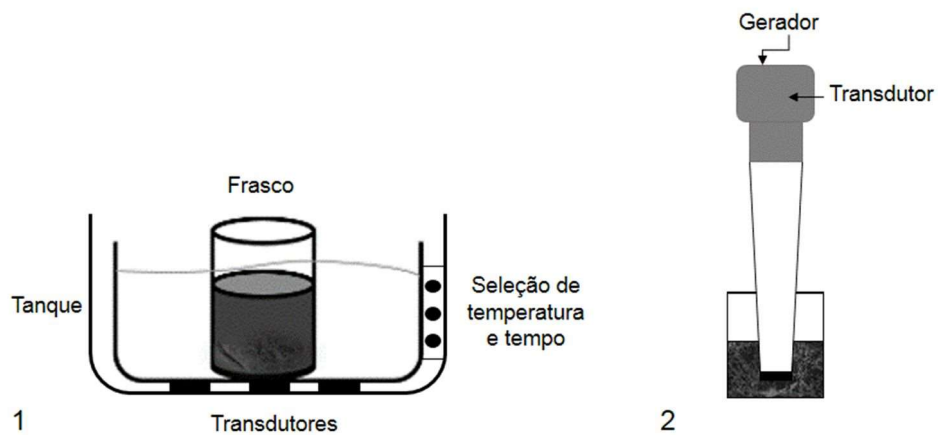
No caso dos compostos aromáticos, a própolis verde e o alecrim-do-campo apresentam principalmente o nerolidol e o composto aromático ácido benzenopropanóico (HUANG et al., 2013). O rendimento da extração de compostos aromáticos e antioxidantes é diretamente relacionado à forma de extração utilizada. A tecnologia de ultrassom permite não somente bom rendimento de extração, mas também atinge o objetivo de ser considerada uma extração sustentável “verde” (CHEMAT et al., 2017a).

### 2.1.6 Ultrassom

A utilização do ultrassom como metodologia de extração permite maximizar o rendimento dos compostos obtidos, tais como os antioxidantes, enquanto diminui o consumo de energia e tempo de extração (CHEMAT et al., 2017b).

Existem relatos da utilização do ultrassom como técnica de extração de compostos de plantas consideradas medicinais desde o início dos anos 50 (HUIE, 2002). No entanto, os estudos que utilizam esta metodologia vêm ganhando destaque por ser considerada uma tecnologia limpa e verde, já que elimina a necessidade de uso de solventes tóxicos ao meio ambiente e à saúde do ser humano (TIWARI, 2015).

Os sistemas utilizados são o banho ultrassônico e o equipamento de ultrassom tipo sonda (Figura 3), sendo o primeiro o mais comumente utilizado, já que pode ter sua temperatura adequadamente controlada e um maior número de amostras pode ser tratada simultaneamente (CHEMAT et al., 2017b).



**Figura 3.** Ilustração esquemática do banho de ultrassom (1) e sonda de ultrassom (2). Fonte: Adaptado de SÃO JOSÉ et al. (2014).

Devido à sua eficiência energética, tempo de extração reduzido, uso de pequenas quantidades de material, gasto mínimo e eficiente com solventes e aumento no rendimento da amostra, o ultrassom tem sido utilizado substituindo técnicas tradicionais de extração (VUONG et al., 2015; ISHTIAQ et al., 2009). Recentemente, a técnica de ultrassom vem sendo utilizada para extração de compostos bioativos de frutas como: jaboticaba, jussara e mirtilo (RODRIGUES et al., 2015; ROCHA et al., 2018), plantas como *Euphorbia tirucalli* e *Acacia confusa* (VUONG et al., 2015; TUNG et al., 2011) e ervas (HOSSEINI et al., 2018). No entanto, os estudos que exploram a técnica de ultrassom como metodologia de extração de compostos fenólicos da planta do gênero *Baccharis* spp. ainda são escassos.

Toma et al. (2001) descreveram o efeito do ultrassom na célula vegetal seca de diferentes plantas quando em contato com o solvente. O autor supracitado indica que a mistura do material vegetal com o solvente facilita o processo de inchamento e hidratação, aumentando assim a taxa de transferência de massa e a quebra das paredes celulares e liberação do conteúdo interno. Diversos fatores foram propostos para justificar o efeito da extração por ultrassom para liberação de compostos como: ruptura celular, penetração de solvente aprimorada, aumento do inchamento, efeito capilar e processo de hidratação (HUANENG et al., 2007).

O mecanismo de sonificação envolvido no ultrassom inicia-se com uma força de cisalhamento criada com o choque de bolhas de cavitação. Este colapso pode chegar a produzir efeitos físicos, químicos e mecânicos, rompendo as membranas celulares, liberando os compostos e facilitando seu contato com o solvente (MASON, PANIWNYK e LORIMER, 1996; ROSTAGNO, PALMA e BARROSO, 2003; SORIA e VILLAMIEL, 2010). O colapso produzido é facilitado devido ao processo de cavitação, descrito por Gupta, Naraniwal e Kothari (2012), que ocorre quando as forças intermoleculares são fortes e o líquido não é

capaz de manter sua estrutura intacta devido a intensidade criada pelo ultrassom e a produção de bolhas.

Estudos indicaram que as variáveis de estudo durante a extração assistida por ultrassom devem ser investigadas a fim de aumentar o rendimento de acordo com cada amostra analisada. Al-Dhabi, Punmurugan e Jeganathan (2017), em estudo sobre desenvolvimento e validação da extração por ultrassom de compostos fenólicos de resíduos de café torrado, citaram a variável temperatura como um fator crítico na extração de fenólicos. Os autores supracitados salientam que temperaturas altas podem aumentar o rendimento de extração, bem como promover a degradação dos compostos extraídos. Em um estudo de otimização para extração por ultrassom de compostos de *Euphorbia tirucalli* realizado por Vuong et al. (2015), as variáveis temperatura, tempo e potência do ultrassom afetaram significativamente a eficiência de extração de euphol.

Tung et al. (2011) comparando a eficiência de extração de compostos fenólicos do broto e da flor de *A. confusa* utilizando extração assistida por calor, extração de maceração e extração assistida por ultrassom, verificaram que o ultrassom possibilitou melhorar significativamente o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de ambas as amostras analisadas.

### **2.1.7 Microencapsulação**

A aplicação de compostos bioativos na indústria alimentícia requer tecnologias inovadoras que busquem solucionar possíveis problemas relacionados com sua perda da funcionalidade biológica devido ao tempo de processamento e armazenamento, bem como sua degradação quando em contato com a matriz alimentícia (UBBINK e KRÜGER, 2006). Neste sentido, a microencapsulação é uma ferramenta útil que pode superar tais entraves.

A microencapsulação é um processo que envolve micropartículas de sólidos, gotículas de líquido ou gases envolvidas por um material inerte (JYOTHI et al., 2010). Esta técnica permite proteger os compostos de interesse em uma matriz polimérica, por exemplo, liberando seu conteúdo durante período prolongado de tempo (CHAMPAGNE e FUSTIER, 2007; JYOTHI et al., 2010).

As partículas podem ser separadas em dois grupos: microcápsulas e microesfera. As microcápsulas apresentam um núcleo circundado por camada externa e são conhecidas por apresentar sistema de reservatório, enquanto as microesferas são do tipo matriz e o núcleo é homogeneamente integrado ao material de parede ou casca (AGUIAR, ESTEVINHO e SANTOS, 2016).

A seleção do material de parede é uma etapa importante, visto que protegerá o material do núcleo (CARMO, BARROS FERNANDES e BORGES, 2015). A escolha do material de parede dependerá de fatores como: natureza e estabilidade do material que pretende-se encapsular; o processo de encapsulação escolhido; funcionalidade desejada para a partícula; liberação desejada do material do núcleo; limitação da reatividade química com o núcleo e matriz alimentar durante o processamento e armazenamento prolongado; custo do material de parede; características eficientes de resistência, flexibilidade, impermeabilidade e estabilidade (GHARSALLAOUI et al., 2007; WANDREY, BARTKOWIAK e HARDING, 2010; SHARIDI e HAN, 1993).

A encapsulação possibilita a proteção e estabilidade dos compostos, bem como sua liberação controlada e mascaramento de sabor (VINCEKOVIĆ et al., 2017) e vem sendo amplamente utilizada para preservar ou melhorar a bioatividade de extratos naturais (NIKMARAM et al., 2017).

Um sistema eficiente de encapsulação deve poder incorporar os compostos bioativos de alimentos com alta estabilidade físico-química e com o mínimo de interferências organolépticas, proteger os compostos encapsulados daqueles presentes na matriz alimentar e da degradação, deve ser capaz de liberar os compostos controladamente de acordo com estímulos específicos e ser aplicável para escala industrial (McCLEMENTS, DECKER e WEISS, 2007).

O encapsulamento de compostos bioativos utilizados como ingredientes funcionais protege contra as condições de processamento a que estes são submetidos durante a produção de alimentos (HASANVAND et al., 2015). Souza et al. (2007) verificaram em seu estudo que não houve perda da capacidade antioxidante avaliada pelo método DPPH do extrato etanólico para o material encapsulado.

Ostroschi et al. (2018), visando preparar micropartículas a partir do extrato de canela rico em proantocianidina através da secagem por pulverização, verificaram que este processo utilizado foi capaz de reduzir o amargor e a adstringência da canela, contribuindo para a aceitação do consumidor.

O método de encapsulamento mais adequado é dependente da aplicação desejada e das propriedades físico-químicas do material do núcleo e daquele que o envolve (UBBINK KRUGER, 2006). As tecnologias de formação de partículas são separadas por Vinceković et al. (2017) em: processos físico-químicos, químicos e físicos. Os autores citados englobam, dentro da classificação de métodos mecânicos, as técnicas de *spray drying*, *spray cooling*, *spray chilling*, revestimento em leite fluidizado, extrusão e esferionização, extrusão centrífuga e procedimentos de fluidos supercríticos.



A técnica de *spray drying* é bem estabelecida na indústria de alimentos e representa cerca de 80 a 90% dos microencapsulados produzidos, englobando componentes alimentares como vitaminas, aromas, pigmentos, óleos, enzimas, dentre outros (NEDOVIĆ et al., 2013). Consiste em um processo de atomização da formulação em uma câmara submetida a altas temperaturas (OSTROSCHI et al., 2018). A rápida evaporação da água sofrida permite que os compostos bioativos sejam submetidos apenas por um curto período às altas temperaturas, podendo assim melhorar a eficiência do método em alguns casos.

Como vantagens, a técnica é classificada como segura, possui baixos custos operacionais, alta taxa de produção e fácil manuseio (OLIVEIRA e PETROVICK, 2010; MARISON, PETERS e HEINZEN, 2004).

## **2.2 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A escolha da fonte vegetal com propriedades antioxidantes é de extrema importância visando seu uso como antioxidante natural em alimentos, principalmente tratando-se do estudo de uma matéria-prima e sua principal fonte botânica (própolis verde e alecrim-do-campo). Mesmo havendo relatos de semelhança de seus compostos fenólicos, espera-se constatar as perspectivas de aplicação de cada um, quando toda a cadeia de obtenção de compostos de interesse foi estabelecida, desde a otimização da extração até a concepção do produto em pó, para difusão nos alimentos e observação das percepções sensoriais que proporcionam ao produto final.

## REFERÊNCIAS

- Abad, M. J., & Bermejo, P. (2007). Baccharis (Compositae): a review update. *Arkivoc*, 7(1), 76-96.
- Aguiar, J., Estevinho, B. N., & Santos, L. (2016). Microencapsulation of natural antioxidants for food application—The specific case of coffee antioxidants – A review. *Trends in Food Science & Technology*, 58, 21-39.
- Akao, Y., Maruyama, H., Matsumoto, K., Ohguchi, K., Nishizawa, K., Sakamoto, T. & Nozawa, Y. (2003). Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(7), 1057-1059.
- Al-Dhabi, N. A.; Ponmurugan, K.; Jeganathan, P. M. (2017). Development and validation of ultrasound-assisted solid-liquid extraction of phenolic compounds from waste spent coffee grounds. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 206-213.
- Al-Hijazeen, M. (2018). Effect of direct adding oregano essential oil (*Origanum syriacum* L.) on quality and stability of chicken meat patties. *Food Science and Technology*, 38, 123-130.
- Andreo, D.; Jorge, N. (2006). Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 24(2), 319-336.
- Arruda, D. C.; D'alexandri, A. M. K.; Uliana, S. R. B. (2005). Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(5), 1679-1687.
- Atta, E. M., Mohamed, N. H., & Abdelgawad, A. A. (2017). Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types. *European Chemical Bulletin*, 6, 365-375.
- Bankova, V. S., de Castro, S. L., & Marcucci, M. C. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Barroso, G.M. (1976) Compositae-subtribo Baccharidinae-Hoffman: Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. *Rodriguesia*, 40, 3– 273.
- Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(2), 184-196.
- Besten, M. A., Jasinski, V. C., Costa, Â. D. G., Nunes, D. S., Sens, S. L., Wisniewski Jr, A. & Granato, D. (2012). Chemical composition similarity between the essential oils isolated from male and female

specimens of each five *Baccharis* species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 23(6), 1041-1047.

Bhuyan, D. J.; Van Vuong, Q.; Chalmers, A. C.; Van Altena, I. A.; Bowyer, M. C. & Scarlett, C. J. (2015). Microwave-assisted extraction of *Eucalyptus robusta* leaf for the optimal yield of total phenolic compounds. *Industrial Crops and Products*, 69, 290-299.

Biswas, A. K.; Chatli, M. K.; Sahoo, J. (2012). Antioxidant potential of curry (*Murraya koenigii* L.) and mint (*Mentha spicata*) leaf extracts and their effect on colour and oxidative stability of raw ground pork meat during refrigeration storage. *Food Chemistry*, 133 (2), 467-472.

Boix, Y. F., Victório, C. P., Lage, C. L. S., & Kuster, R. M. (2010). Volatile compounds from *Rosmarinus officinalis* L. and *Baccharis dracunculifolia* DC. Growing in southeast coast of Brazil. *Química Nova*, 33(2), 255-257.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 23, de 15 de fevereiro de 2005. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 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, 16 fev. 2005. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br>>.

Carmo, E. L.; Barros Fernandes, R. V.; Borges, S. V. (2015). Microencapsulação por spray drying, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 1(2), 30-44.

Cazella, L. N., Glamoclija, J., Soković, M., Gonçalves, J. E., Linde, G. A., Colauto, N. B., & Gazim, Z. C. (2019). Antimicrobial activity of essential oil of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) aerial parts at flowering period. *Frontiers in plant science*, 10, 1-9.

Champagne, C. P. & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current opinion in biotechnology*, 18(2), 184-190.

Chang, R., Piló-Veloso, D., Morais, S. A., & Nascimento, E. A. (2008). Analysis of a Brazilian green propolis from *Baccharis dracunculifolia* by HPLC-APCI-MS and GC-MS. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(4), 549-556.

Chemat, F., Rombaut, N., Meullemiestre, A., Turk, M., Perino, S., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017a). Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 41, 357-377.

- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017b). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 540-560.
- Cheong, A. M., Tan, C. P., & Nyam, K. L. (2017). Physicochemical, oxidative and anti-oxidant stabilities of kenaf seed oil-in-water nanoemulsions under different storage temperatures. *Industrial Crops and Products*, 95, 374-382.
- Crapiste, G. H., Bredvan, M. I., & Carelli, A. A. (1999). Oxidation of sunflower oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(12), 1437.
- E.A. Decker, R.J. Elias, D.J. McClements. Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications. Woodhead Publishing Limited, Philadelphia (2010).
- Ding, M., & Zou, J. (2012). Rapid micropreparation procedure for the gas chromatographic–mass spectrometric determination of BHT, BHA and TBHQ in edible oils. *Food chemistry*, 131(3), 1051-1055.
- Dolatabadi, J. E. N., & Kashanian, S. (2010). A review on DNA interaction with synthetic phenolic food additives. *Food Research International*, 43(5), 1223-1230.
- Dorđević, V., Balanč, B., Belščak-Cvitanović, A., Lević, S., Trifković, K., Kalušević, A. & Nedović, V. (2015). Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Engineering Reviews*, 7(4), 452-490.
- Dvorackova, E.; Snoblova, M.; Chromcova, L. & Hrdlicka, P. (2015). Effects of extraction methods on the phenolic compounds contents and antioxidant capacities of cinnamon extracts. *Food Science and Biotechnology*, 24(4), 1201-1207.
- Fadda, C.; Usai, G.; Sanguinetti, A. M.; Mascia, I.; Del Caro, A.; Satta, D. & Piga, A. (2017). Effect of ripening stage at harvest, cold storage, and simulated marketing conditions on quality and antioxidant activity of peach fruit. *Acta Alimentaria*, 46(3), 275-282.
- Ferrari, C. K. B. (1998) Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. *Revista de Nutrição*, 11(1), 3-14.
- Figueiredo, F. J. B., Dias-Souza, M. V., Nascimento, E. A., & De Lima, L. R. P. (2015). Physicochemical characterization and flavonoid contents of artisanal Brazilian green propolis. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7, 64-68.

- Franco, R., Navarro, G., & Martínez-Pinilla, E. (2019). Antioxidants versus Food Antioxidant Additives and Food Preservatives. *Antioxidants*, 8(11), 542.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40(9), 1107-1121.
- Gomes, I. A., Gomes, F. D. S., Freitas-Silva, O., & da Silva, J. P. L. (2017). Ingredients of mayonnaise: Future perspectives focusing on essential oils to reduce oxidation and microbial counts. *Embrapa Agroindústria de Alimentos-Artigo em periódico indexado (ALICE)*.
- Guijarro-Fuertes, M., ANDRADE-CUVI, M. J., Bravo-Vasquez, J., Ramos-Guerrero, L., & VERNAZA, M. G. (2019). Andean blueberry (*Vaccinium floribundum*) bread: physicochemical properties and bioaccessibility of antioxidants. *Food Science and Technology*, 39, 56-62.
- Gupta, A., Naraniwal, M., & Kothari, V. (2012). Modern extraction methods for preparation of bioactive plant extracts. *International journal of applied and natural sciences*, 1(1), 8-26.
- Hasanvand, E., Fathi, M., Bassiri, A., Javanmard, M., & Abbaszadeh, R. (2015). Novel starch based nanocarrier for vitamin D fortification of milk: Production and characterization. *Food and Bioprocess Processing*, 96, 264-277.
- Hosseini, H., Bolourian, S., Yaghoubi Hamgini, E., & Ghanuni Mahababadi, E. (2018). Optimization of heat-and ultrasound-assisted extraction of polyphenols from dried rosemary leaves using response surface methodology. *Journal of food processing and preservation*, 42(11), e13778.
- Huaneng, X. U., Zhang, Y., & Chaohong, H. (2007). Ultrasonically assisted extraction of isoflavones from stem of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and its mathematical model. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 15(6), 861-867.
- Huang, S., Lu, Y. Y., Zhang, C. P., & Hu, F. L. (2013). Analysis chemical composition of volatile components before and after ethanol extracting of Brazilian green propolis. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 32, 680-685.
- Huang, S., Zhang, C. P., Wang, K., Li, G. Q., & Hu, F. L. (2014). Recent advances in the chemical composition of propolis. *Molecules*, 19(12), 19610-19632.
- Huie, C. W. (2002). A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 373(1-2), 23-30.

- Ishtiaq, F., Farooq, R., Farooq, U., Farooq, A., Siddique, M., Shah, H., & Mukhatar-UI-Hassan, M. A. S. (2009). Application of ultrasound in pharmaceuticals. *World Applied Sciences Journal*, 6(7), 886-893.
- Jyothi, N. V. N., Prasanna, P. M., Sakarkar, S. N., Prabha, K. S., Ramaiah, P. S., & Srawan, G. Y. (2010). Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency. *Journal of microencapsulation*, 27(3), 187-197.
- Jug, M., Končić, M. Z., & Kosalec, I. (2014). Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. *LWT-Food Science and Technology*, 57(2), 530-537.
- Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Troullidou, E., Mourtzinis, I., & Karathanos, V. T. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food chemistry*, 116(2), 452-461.
- Karakaya, S. (2004). Bioavailability of phenolic compounds. *Critical reviews in food science and nutrition*, 44(6), 453-464.
- Karovičová, J., & Šimko, P. (2000). Preservatives and antioxidants. *Food analysis by HPLC*, 575-620.
- Khan, M. A., & Shahidi, F. (2001). Effects of natural and synthetic antioxidants on the oxidative stability of borage and evening primrose triacylglycerols. *Food Chemistry*, 75(4), 431-437.
- Kiokias, S., Varzakas, T., & Oreopoulou, V. (2008). In vitro activity of vitamins, flavonoids, and natural phenolic antioxidants against the oxidative deterioration of oil-based systems. *Critical reviews in food science and nutrition*, 48(1), 78-93.
- KIRK, J.R. (1984). Biological availability of nutrients in processed foods. *Journal of Chemical Education*, 61(4), 364-367.
- Kumazawa, S., Nakamura, J., Murase, M., Miyagawa, M., Ahn, M. R., & Fukumoto, S. (2008). Plant origin of Okinawan propolis: honeybee behavior observation and phytochemical analysis. *Naturwissenschaften*, 95(8), 781.
- Marques Pino, L., Cavaleiro, C., Conceição Castilho, M. D., D'arce, B. R., Aparecida, M., Da Silva Torres, E. A., & Ramos, F. (2013). The use of natural antioxidants (oregano and sage) to reduce hexanal production in precooked chicken during chill storage. *Vitae*, 20(2), 105-110.
- Machado, B. A. S., Silva, R. P. D., de Abreu Barreto, G., Costa, S. S., da Silva, D. F., Brandao, H. N., ... & Padilha, F. F. (2016). Chemical composition and biological activity of extracts obtained by

supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in Brazil. *PLoS One*, 11(1), e0145954

Marison, I., Peters, A., & Heinzen, C. (2004). Liquid Core Caspules for Applications in Biotechnology. In *Fundamentals of cell immobilisation biotechnology* (pp. 185-204). Springer, Dordrecht.

Maróstica Junior, M. R., Dausch, A., Moraes, C. S., Queiroga, C. L., Pastore, G. M., & Parki, Y. K. (2008). Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. *Food Science and Technology*, 28(1), 178-181.

Mason, T. J., Paniwnyk, L., & Lorimer, J. P. (1996). The uses of ultrasound in food technology. *Ultrasonics sonochemistry*, 3(3), S253-S260.

Masuchi, M. H., Celeghini, R. M. D. S., Gonçalves, L. A. G., & Grimaldi, R. (2008). Quantificação de TBHQ (terc butil hidroquinona) e avaliação da estabilidade oxidativa em óleos de girassol comerciais. *Química nova*, 31(5), 1053-1057.

McClements, D. J., Decker, E. A., & Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *Journal of Food Science*, 72(8), R109-R124.

Naczka, M., & Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of chromatography A*, 1054(1-2), 95-111.

Nedović, V., Kalušević, A., Manojlović, V., Petrović, T., & Bugarski, B. (2013). Encapsulation systems in the food industry. In *Advances in food process engineering research and applications* (pp. 229-253). Springer, Boston, MA.

Nikmaram, N., Roohinejad, S., Hashemi, S., Koubaa, M., Barba, F. J., Abbaspourrad, A., & Greiner, R. (2017). Emulsion-based systems for fabrication of electrospun nanofibers: Food, pharmaceutical and biomedical applications. *RSC advances*, 7(46), 28951-28964.

Nunes, L. C. C., Galindo, A. B., Deus, A. D. S. O. D., Rufino, D. A., Randau, K. P., Xavier, H. S., ... & Rolim Neto, P. J. (2009). Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(2B), 524-529.

Oliveira, O. W., & Petrovick, P. R. (2010). Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. São Paulo, SP. Vol. 20, n. 4 (Ago./Set. 2010), p. 641-650.

- Ostroschi, L. C., de Souza, V. B., Echalar-Barrientos, M. A., Tulini, F. L., Comunian, T. A., Thomazini, M., ... & Favaro-Trindade, C. S. (2018). Production of spray-dried proanthocyanidin-rich cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) extract as a potential functional ingredient: Improvement of stability, sensory aspects and technological properties. *Food Hydrocolloids*, 79, 343-351.
- Park, Y. K., Koo, M. H., Ikegaki, M., & Contado, J. L. (1997). Comparison of the flavonoid aglycone contents of *Apis mellifera* propolis from various regions of Brazil. *Arquivos de biologia e tecnologia*.
- Park, Y. K., Paredes-Guzman, J. F., Aguiar, C. L., Alencar, S. M., & Fujiwara, F. Y. (2004). Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1100-1103.
- Park, Y. K., Alencar, S. M., & Aguiar, C. L. (2002). Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9), 2502-2506.
- Pasupuleti, V. R., Sammugam, L., Ramesh, N., & Gan, S. H. (2017). Honey, propolis, and royal jelly: a comprehensive review of their biological actions and health benefits. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2017.
- Piantino, C. R., Aquino, F. W., Follegatti-Romero, L. A., & Cabral, F. A. (2008). Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(2), 209-214.
- Robles-Ramírez, M. D. C., Monterrubio-López, R., Mora-Escobedo, R., & Beltrán-Orozco, M. D. C. (2016). Evaluation of extracts from potato and tomato wastes as natural antioxidant additives. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 66(1), 66-73.
- Rocha, J. D. C. G., Procopio, F. R., Mendonca, A. C., Vieira, L. M., Perrone, I. T., Barros, F. A. R. D., & Stringheta, P. C. (2018). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from jussara (*Euterpe edulis* M.) and blueberry (*Vaccinium myrtillus*) fruits. *Food Science and Technology*, 38(1), 45-53.
- Rodrigues, S., Fernandes, F. A., de Brito, E. S., Sousa, A. D., & Narain, N. (2015). Ultrasound extraction of phenolics and anthocyanins from jaboticaba peel. *Industrial Crops and Products*, 69, 400-407.
- Rodríguez-Pérez, C., Quirantes-Piné, R., Fernández-Gutiérrez, A., & Segura-Carretero, A. (2015). Optimization of extraction method to obtain a phenolic compounds-rich extract from *Moringa oleifera* Lam leaves. *Industrial Crops and Products*, 66, 246-254.



- Rostagno, M. A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2003). Ultrasound-assisted extraction of soy isoflavones. *Journal of Chromatography A*, 1012(2), 119-128.
- Sabir, S. M., Athayde, M. L., Boligon, A. A., & Rocha, J. B. T. (2017). Antioxidant activities and phenolic profile of *Baccharis trimera*, a commonly used medicinal plant from Brazil. *South African Journal of Botany*, 113, 318-323.
- Said, T. M., Elgasim, E. A., Eltilib, H. H., Bekhit, A. E. D. A., Al-Juhaimi, F. Y., & Mohamed Ahmed, I. A. (2018). Antioxidant and antimicrobial potentials of Damsissa (*Ambrosia maritima*) leaf powder extract added to minced beef during cold storage. *CyTA-Journal of Food*, 16(1), 642-649.
- Sallam, K. I., Ishioroshi, M., & Samejima, K. (2004). Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *LWT-Food Science and Technology*, 37(8), 849-855.
- Salatino, A., Fernandes-Silva, C. C., Righi, A. A., & Salatino, M. L. F. (2011). Propolis research and the chemistry of plant products. *Natural product reports*, 28(5), 925-936.
- Salatino, A., & Salatino, M. L. F. (2017). Why do honeybees exploit so few plant species as propolis sources?. *MOJ Food Processing & Technology*, 4(5), 3.
- São José, J. F. B., de Andrade, N. J., Ramos, A. M., Vanetti, M. C. D., Stringheta, P. C., & Chaves, J. B. P. (2014). Decontamination by ultrasound application in fresh fruits and vegetables. *Food Control*, 45, 36-50.
- Sforcin, J. M.; Sousa, J. P. B.; Da Silva Filho, A. A.; Bastos, J. K.; Búfalo, M. C. & Tonuci, L. R. S. *Baccharis dracunculifolia*: Uma das principais fontes vegetais da própolis brasileira. São Paulo: Editora UNESP, p. 38, 2012.cap. 2, p 17 -36.
- Shah, M. A., Bosco, S. J. D., & Mir, S. A. (2014). Plant extracts as natural antioxidants in meat and meat products. *Meat science*, 98(1), 21-33.
- Shahidi, F. (1998). Indicators for evaluation of lipid oxidation and off-flavor development in food. In *Developments in Food Science* (Vol. 40, pp. 55-68). Elsevier.
- Shahidi, F. *Antioxidants: Principles and applications. Handbook of antioxidants for food preservation.* Cambridge, UK: Woodhead Publishing Ltd. p. 1–14, 2015.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects—A review. *Journal of functional foods*, 18, 820-897.

- Shahidi, F., & Han, X. Q. (1993). Encapsulation of food ingredients. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 33(6), 501-547.
- Shahidi, F., Janitha, P. K., & Wanasundara, P. D. (1992). Phenolic antioxidants. *Critical reviews in food science & nutrition*, 32(1), 67-103.
- Shan, B., Cai, Y. Z., Sun, M., & Corke, H. (2005). Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(20), 7749-7759.
- Sonam, K. S., & Guleria, S. (2017). Synergistic antioxidant activity of natural products. *Annals of Pharmacology and Pharmaceutics*, 2, 1-6.
- Soquetta, M. B., Monteiro, S. S., Boeira, C. P., Copetti, C., & Polli, V. A. (2017). Development and Quality of Ham Pâté with Added Natural Antioxidant Kiwi Fruit (*Actinidia deliciosa*) Skin. *Journal of Nutrition & Food Sciences*, 7(624), 2.
- Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(7), 323-331.
- Souza, J. P. B., Tacon, L. A., Correia, C. C., Bastos, J. K., & Freitas, L. A. P. (2007). Spray-dried propolis extract, II: Prenylated components of green propolis. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 62(7), 488-492.
- Taghvaei, M., & Jafari, S. M. (2015). Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *Journal of food science and technology*, 52(3), 1272-1282.
- Tanabe, H., Yoshida, M., & Tomita, N. (2002). Comparison of the antioxidant activities of 22 commonly used culinary herbs and spices on the lipid oxidation of pork meat. *Animal Science Journal*, 73(5), 389-393.
- Tiwari, B. K. (2015). Ultrasound: A clean, green extraction technology. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 100-109.
- Toma, M., Vinatoru, M., Paniwnyk, L., & Mason, T. J. (2001). Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics sonochemistry*, 8(2), 137-142.
- Tung, Y. T., Chang, W. C., Chen, P. S., Chang, T. C., & Chang, S. T. (2011). Ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Acacia confusa* flowers and buds. *Journal of Separation Science*, 34(7), 844-851.

- Ubbink, J., & Krüger, J. (2006). Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods. *Trends in Food Science & Technology*, 17(5), 244-254.
- Vargas, F. C., Gómez, B., Mousavi Khaneghah, A., Strozzi, I., Gavahian, M., Barba, F. J., ... & Lorenzo, J. M. (2019). Assessment of the Suitability of Pitanga Leaf Extract as a Natural Antioxidant for Enhancing Canola Oil Stability: Monitoring Lipid Oxidation Parameters. *European journal of lipid science and technology*, 121(5), 1800447.
- Veiga, R. S., De Mendonça, S., Mendes, P. B., Paulino, N., Mimica, M. J., Lagareiro Netto, A. A. & Marcucci, M. C. (2017). Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of applied microbiology*, 122(4), 911-920.
- Verdi, L. G., Brighente, I. M. C., & Pizzolatti, M. G. (2005). Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. *Química Nova*, 28(1), 85-94.
- Vinceković, M., Viskić, M., Jurić, S., Giacometti, J., Kovačević, D. B., Putnik, P., ... & Jambrak, A. R. (2017). Innovative technologies for encapsulation of Mediterranean plants extracts. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 1-12.
- Vuong, Q. V., Thanh, D. T., Bhuyan, D. J., Goldsmith, C. D., Sadeqzadeh, E., Scarlett, C. J., & Bowyer, M. C. (2015). Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for euphol from the medicinal plant, *Euphorbia tirucalli*, using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*, 63, 197-202.
- Wandrey, C., Bartkowiak, A. & Harding, S. E. Materials for encapsulation. In: Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. Springer, New York, NY, 2010. p. 31-100.
- Wysocky Júnior, H. L. Atividade cicatrizante e antiúlcera de espécies vegetais brasileiras: atividade cicatrizante, fracionamento químico e análises de própolis verde. 2013. 92 p. Tese (Doutorado em Fármacos e medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.
- Witschi, H. P. (1981). Enhancement of tumor formation in mouse lung by dietary butylated hydroxytoluene. *Toxicology*, 21(2), 95-104.

### 3. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM DE ANTIOXIDANTES DE *Baccharis dracunculifolia* E PRÓPOLIS VERDE

#### RESUMO

*Baccharis dracunculifolia* ou alecrim-do-campo é a principal fonte botânica utilizada pelas abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. para a produção de própolis verde no sudeste do Brasil. Os compostos fenólicos presentes na planta e na própolis verde têm sido relatados como responsáveis por atividades biológicas como a capacidade antioxidante. O objetivo deste estudo foi otimizar a extração assistida por ultrassom de compostos antioxidantes de alecrim-do-campo usando um delineamento central composto rotacional (DCCR), e comparar os resultados com o extrato de própolis verde. O delineamento experimental foi realizado para obter respostas de conteúdo fenólico total (TPC) e capacidade antioxidante. Os resultados permitiram observar que a condição ótima para extração de antioxidantes para ambos materiais (botão floral de *Baccharis dracunculifolia* e própolis verde bruta) foi obtida com solução de etanol 99%. Na condição ótima, os valores de TPC e capacidade antioxidante pelos métodos de FRAP e DPPH foram 612,14 mg GAE. amostra g<sup>-1</sup>, amostra de sulfato ferroso, 534,39 µM.g<sup>-1</sup> e 72,37 µmol TEAC. amostra g<sup>-1</sup>, respectivamente para o alecrim-do-campo. Estes resultados confirmaram que a otimização é um passo fundamental para que processos de extração eficazes e sustentáveis sejam viáveis em escala industrial. O processo proposto pode ser facilmente adotado em maior escala, pois utiliza poucos insumos e apresenta passos simples, com a vantagem de alta eficiência na extração de compostos fenólicos das matrizes estudadas, em comparação com os resultados da literatura. A alta concentração de antioxidantes indica que os produtos obtidos podem ser considerados como uma fonte bioativa sustentável para fins alimentícios e cosméticos.

Palavras-chave: *Baccharis dracunculifolia*; Própolis verde, Metodologia de Superfície de resposta, Otimização, Ultrassom, Antioxidante

---

#### Capítulo publicado

CAVALARO, R. I.; FABRICIO, L. F. F.; VIEIRA, T. M. F. S. Ultrasound-Assisted Extraction of Antioxidants from *Baccharis dracunculifolia* and Green Propolis. **Processes**, v. 8, p. 1530, 2020.

DOI: [10.3390/PR8121530](https://doi.org/10.3390/PR8121530)

## ABSTRACT

*Baccharis dracunculifolia* or rosemary-of-field is the principal botanical source used by Africanized bees *Apis mellifera* L. to produce green propolis in Southeastern Brazil. The phenolic compounds present in the plant and green propolis have been reported to be responsible for biological activities such as antioxidant capacity. This study aimed to optimize the ultrasound-assisted extraction of antioxidants compounds from rosemary-of-field using a central composite rotatable design (CCRD), and compare results to green propolis extract. An experimental design was performed to obtain responses of total phenolic content and antioxidant capacity. The results allowed observing that the optimum condition for both *Baccharis dracunculifolia* floral bud and raw green propolis antioxidant extraction was obtained with 99% ethanol solution. In optimal condition, Total Phenolic Content (TPC), Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), and 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) values were 612.14 mg GAE. g<sup>-1</sup> sample, 534.39 μM ferrous sulfate g<sup>-1</sup> sample, and 72.37 μmol TEAC. g<sup>-1</sup> sample, respectively, for reosemary-of-field floral buds. These results have confirmed that optimization is a key step for effective and sustainable extraction processes to be feasible on an industrial scale. The proposed process can be easily adopted on a larger scale, as it uses very few inputs and presents straightforward steps, with the advantage of high efficiency in the extraction of phenolic compounds from the studied matrices compared to the results from the literature. The high concentration of antioxidants indicates that the products obtained can be considered as a sustainable bioactive source for food and cosmetic purposes.

**Keywords:** *Baccharis dracunculifolia*; green propolis; response surface methodology (RSM); optimization; ultrasound; antioxidant

### 3.1 INTRODUÇÃO

O crescente aumento do interesse das indústrias de alimentos em substituir aditivos sintéticos é aparente, buscando obter produtos que contenham compostos bioativos de fontes naturais que sejam estáveis e funcionais (SILVA et al., 2013). Apesar de eficientes, os aditivos sintéticos podem apresentar efeito tóxico quando utilizados em altas concentrações e também agir como um pró-oxidante em contato com o alimento (ATTA, MOHAMED e ABDELGAWAD, 2017). Esses resultados reforçam a necessidade de encontrar antioxidantes naturais eficazes como alternativa para evitar a deterioração dos alimentos durante o processamento e armazenamento.

Dentre os diversos tipos de própolis existentes, a própolis verde é bastante reconhecida no Brasil devido à sua diversidade de atividades biológicas, como a capacidade antioxidante. Própolis verde produzida por abelhas africanizadas do tipo *Apis Mellifera* têm uma fonte botânica bem estabelecida conhecida como *Baccharis dracunculifolia*, ambos já foram relatados como potenciais substitutos para antioxidantes sintéticos destinados ao uso como aditivos alimentares e ingredientes funcionais devido ao potencial de seus compostos bioativos (FIGUEIREDO et al., 2017; CASAGRANDE et al., 2018; RODRIGUES et al., 2020).

Para a produção da própolis verde, as abelhas *Apis mellifera* atuam coletando material resinoso de plantas, com o objetivo de utilizar esta própolis para proteger a colmeia de possíveis interferências climáticas e invasores externos (SIMONE-FINSTROM e SPIVAK, 2010). A própolis verde é comumente encontrada no sudeste do Brasil, principalmente entre os estados de São Paulo e Minas Gerais e sua fonte botânica *Baccharis dracunculifolia* é considerada uma planta invasora devido à sua fácil propagação (GOMES e FERNANDES, 2002; RODRIGUES et al., 2020). A planta é comumente conhecida pelos nomes regionais de alecrim-do-campo ou vassourinha.

Tanto a própolis quanto a *Baccharis dracunculifolia* são conhecidas por apresentarem uma diversidade de compostos como flavonóides e ácidos fenólicos, e sua ação antioxidante é resultado do efeito sinérgico desses compostos (GUIMARÃES et al., 2012). Porém, embora existam estudos que abordem a otimização isolada da própolis verde ou alecrim-do-campo, não há estudos que avaliem e comparem a otimização do processo de extração dos compostos bioativos das duas fontes, com foco no uso da extração assistida por ultrassom. A otimização de processos utilizando um desenho experimental permite explorar diversos fatores que podem influenciar o processo de extração ao mesmo tempo, utilizando menos amostras e reduzindo o erro experimental. Um método de extração otimizado permite alcançar eficiência na obtenção de compostos de interesse, os quais podem afetar diretamente os impactos ambientais e econômicos através do uso de solventes menos tóxicos, em menores volumes e com tempo de processo reduzido (FRATODDI et al., 2018; CAVALARO et al.,

2019). Associado a esta metodologia estatística, o ultrassom pode contribuir reduzindo ainda mais o tempo de processo e consumo de solvente, aumentando o rendimento de extração (CHEMAT et al., 2017a). O Central Composite Rotatable Design (CCRD) foi empregado com sucesso na determinação das condições ideais para a extração de compostos antioxidantes de frutos de *Z. lotus*, sob a influência da técnica de ultrassom (HAMMI et al., 2015). Os dados mostram que o uso da tecnologia assistida por ultrassom permite aumentar o rendimento de extração em cerca de 24%, contribuindo especificamente para o aumento do rendimento na extração de compostos com alta capacidade antioxidante, enquanto diminui o consumo de energia utilizada no processo (CHEMAT et al., 2017b). Além disso, é considerada uma técnica verde, que se propõe a reduzir o uso de solventes e, conseqüentemente, a poluição ambiental (WEN et al., 2018).

Este trabalho teve como objetivo otimizar a extração de compostos bioativos de botões florais de alecrim-do-campo utilizando solvente de fonte sustentável em tempo mínimo de processamento por extração assistida por ultrassom. A atividade dos extratos foi comparada ao desempenho do extrato de própolis verde, buscando determinar a viabilidade técnica de exploração da principal matéria-prima vegetal ligada à produção de própolis.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Reagentes e químicos

Reagente Folin-Ciocalteu, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico) e DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Outros reagentes eram de grau p.a.

### 3.2.2 *Baccharis dracunculifolia* e própolis verde

Amostras de botões florais de *Baccharis dracunculifolia* (alecrim-do-campo), bem como de própolis verde, foram doadas pela empresa brasileira Natucentro Indústria e Apiários Centro Oeste Ltda. (19° 59 '46"S, 45° 48' 38"O) (Bambuí – MG). Ambas matérias-primas foram coletadas na época de floração (Março / 2018). Foi realizada uma limpeza visual das amostras com o objetivo de retirar qualquer material indesejável presente. Em seguida, as amostras foram embaladas a vácuo e armazenadas em freezer comercial a -18°C até o momento das análises.

### 3.2.3 Desenho experimental

Um delineamento central composto rotacional (DCCR) foi realizado visando estudar os efeitos do tempo ( $x_1$ ) e porcentagem de etanol ( $x_2$ ) sobre a extração de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante dos extratos de alecrim-do-campo. Foram realizados 12 ensaios, incluindo quatro repetições nos pontos centrais. A Tabela 1 apresenta as faixas de estudo das condições de preparo dos extratos e seus níveis de variação.

**Tabela 1.** Faixa de estudo das condições de preparo dos extratos de alecrim-do-campo e seus níveis de variação utilizados no DCCR.

Variáveis explanatórias	Níveis de Variação				
	-1,41	-1	0	1	+1,41
Tempo (minutos)	80	92	120	148	160
% Etanol*	0	14.4	49.5	84.6	99

Legenda: \* O etanol utilizado foi p.a absoluto, diluído em água destilada para compor o delineamento experimental.

A forma geral da equação de regressão empregada neste estudo é apresentada na seguinte equação (1):

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \varepsilon \quad \text{Equação 1.}$$

Onde: Y = resposta (variável dependente)

$x_1$  e  $x_2$  = níveis codificados das variáveis explanatórias

$\beta_0$  = média

$\beta_s$  = coeficientes de regressão

$\varepsilon$  = resíduo

Amostras de alecrim-do-campo foram produzidas de acordo com o desenho experimental proposto, com as faixas de estudo apresentadas na Tabela 1 em temperatura fixada em 35°C e foram analisados o teor de fenólicos totais (TPC) e capacidade antioxidante pelos métodos FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) e DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Superfícies de resposta foram geradas para verificar a tendência de maximizar o rendimento dos compostos bioativos extraídos e através do Perfil de Valores Preditos e Desejabilidade, o ponto de extração ideal foi determinado. Posteriormente, os resultados foram comparados aos dados de otimização da própolis verde. Os modelos foram ajustados após avaliação dos efeitos linear, quadrático e de interação. A adequação dos modelos foi determinada avaliando o valor  $p$ , além do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e o valor do teste de Fisher (valor  $F$ ) obtido na análise de variância (ANOVA). Os dados foram analisados pelo



software Statistica 12.0 (Statsoft, EUA). A significância estatística dos parâmetros do modelo foi determinada com um nível de confiança de 95%.

### **3.2.4 Produção de extratos de *Baccharis dracunculifolia* e própolis verde**

Os processos de extração ocorreram em banho de ultrassom (LS Logen Scientific, LSUC2-120-3.0, Brasil), operando a 40 kHz. Os extratos dos botões florais de alecrim-do-campo foram obtidos de acordo com o planejamento experimental e a condição ótima resultante. Para a própolis verde, as condições de extração utilizadas foram as condições previamente otimizadas por Cavalaro et al. [9]: 99% de etanol, proporção de 1:35 (massa: volume), durante 20 minutos a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$ . Os extratos foram centrifugados a 4695 g por 15 minutos em uma microcentrífuga refrigerada (Hitachi KOKI; Japão), em seguida, filtrados em Whatman n. 2. O sobrenadante foi evaporado (evaporador de rotor Buchi Labortechnik AG - modelo R-215) a  $45^\circ\text{C}$ . Por fim, as soluções resultantes foram armazenadas refrigeradas a  $7^\circ\text{C}$  em frascos âmbar até o momento da análise.

### **3.2.5 Determinação do teor de compostos fenólicos totais**

A determinação do teor de compostos fenólicos totais ou *total phenolic content* (TPC) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999), estabelecendo-se o ácido gálico como padrão. Para a determinação do teor de fenólicos totais, foi utilizado 0,5 mL dos extratos. Foram misturados a estes 2,5 mL do reagente *Folin-Ciocalteu* (diluído 1:10) e 2,0 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  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 GAE.  $\text{g}^{-1}$  amostra), calculados por meio de uma curva construída com concentrações variando de 2,5 a 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### **3.2.6 Determinação da capacidade antioxidante**

#### **3.2.6.1 DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)**

A capacidade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) foi determinada de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Para a análise, 500  $\mu\text{L}$  das diferentes diluições dos extratos foram pipetados com 3,0 mL de etanol e 300  $\mu\text{L}$  de uma

solução etanólica DPPH 60 mM (THAIPONG et al., 2006). A redução do radical DPPH foi medida monitorando a diminuição da absorção a 515 nm usando um mini-espectrofotômetro UV 1240 (Shimadzu, Kyoto, Japão), até que valores de extinção estáveis (45 min) fossem obtidos. A concentração exata de DPPH foi calculada usando uma curva de calibração. A atividade de eliminação de radicais dos extratos foi calculada como a quantidade de DPPH inibida pela amostra quando comparada a um controle. Uma curva padrão foi construída com uma solução de Trolox (capacidade antioxidante equivalente de Trolox - TEAC) utilizando concentrações de 20 a 200  $\mu\text{M}$  e a capacidade de eliminação do radical DPPH foi expressa em  $\mu\text{mol TEAC. amostra g}^{-1}$ . Todas as determinações foram realizadas em triplicata para cada amostra e os valores médios e seus respectivos desvios padrão foram fornecidos.

### 3.2.6.2 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)

A atividade antioxidante pelo método FRAP foi realizada de acordo com o que foi abordado por Thaipong et al. (2006) com modificações. Foram preparadas misturas contendo 90  $\mu\text{L}$  da amostra ou solução padrão, 270  $\mu\text{L}$  de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP, sendo este preparado previamente com tampão acetato de sódio 0,3 M, solução de cloreto férrico 20 mM e uma solução de TPTZ 10 mM previamente preparada com HCl 40 mM (10:1:1, v/v/v). No caso do branco, foi utilizado apenas o reagente FRAP para leitura. As misturas e o branco, que foram preparados em tubo de ensaio, foram mantidos em banho-maria com agitação a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura em 595 nm no espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV 1240, Japão). A curva padrão foi construída utilizando uma solução padrão de sulfato ferroso 2.000  $\mu\text{M}$  nas concentrações de 300 a 1500  $\mu\text{M}$  e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol sulfato ferroso. g}^{-1}$  amostra.

## 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.3.1 Otimização da extração

O processo de extração de compostos bioativos de amostras de *Baccharis dracunculifolia* foi diretamente afetado pelo tempo ( $x_1$ ) e concentração de etanol na solução ( $x_2$ ) durante a extração assistida por ultrassom. Além disso, o ultrassom mostrou-se eficiente na liberação de compostos aprisionados no interior da célula para a solução hidroalcoólica, já que as bolhas de cavitação causadas pelo mecanismo de ultra-som induzem a liberação do material ativo (CHEMAT et al., 2017b). A Tabela 2 apresenta os resultados do teor de fenólicos

totais (TPC) e capacidade antioxidante (FRAP e DPPH) representados pela média seguida do desvio padrão para cada um dos 12 ensaios do desenho experimental.

**Tabela 2.** Valores reais das variáveis independentes e dependentes observadas

Ensaio	Variáveis Independentes		Variáveis Dependentes		
	Tempo (min)	Etanol (%)	TPC <sup>1</sup>	FRAP <sup>2</sup>	DPPH <sup>3</sup>
1	92	14,4	13,47 ± 0,02	24,23 ± 0,02	0,24 ± 0,05
2	148	14,4	11,33 ± 0,13	26,73 ± 0,01	0,90 ± 2,47
3	92	84,6	116,1 ± 0,56	120,68 ± 0,04	14,61 ± 0,69
4	148	84,6	116,52 ± 7,15	238,18 ± 0,06	36,53 ± 0,49
5	80	49,5	30,57 ± 0,39	82,08 ± 0,01	14,84 ± 0,04
6	160	49,5	71,14 ± 0,73	121,15 ± 0,08	16,89 ± 0,92
7	120	0	3,39 ± 0,02	33,72 ± 0,10	0,54 ± 0,05
8	120	99	612,14 ± 0,84	534,39 ± 0,20	72,37 ± 0,80
9	120	49,5	91,97 ± 0,51	122,53 ± 0,12	12,65 ± 0,49
10	120	49,5	116,52 ± 0,28	113,46 ± 0,14	12,45 ± 0,39
11	120	49,5	120,52 ± 0,70	100,36 ± 0,08	13,22 ± 2,27
12	120	49,5	93,66 ± 0,74	112,41 ± 0,08	11,80 ± 1,18

<sup>1</sup> Resultado de Teor de compostos fenólicos totais expresso em mg GAE. g<sup>-1</sup> amostra; <sup>2</sup> Resultado de capacidade antioxidante FRAP expresso em µM sulfato ferroso. g<sup>-1</sup> amostra; <sup>3</sup> Resultado de capacidade antioxidante DPPH expresso em µmol TEAC. g<sup>-1</sup> amostra.

Conforme demonstrado na Tabela 2, houve uma tendência de aumento do poder antioxidante dos extratos à medida que aumentava a concentração de etanol presente na solução. Portanto, é importante observar que nos primeiros 120 minutos a variação nos compostos bioativos ocorreu principalmente devido às diferentes concentrações de etanol utilizado na solução de extração.

Os resultados de TPC variaram de 3,39 ± 0,02 a 612,14 ± 0,84 mg GAE. g<sup>-1</sup> amostra e foram significativamente afetados pelo tempo (minutos) e concentração de etanol (%) ( $p \leq 0,05$ ). A capacidade antioxidante pelo método FRAP variou de 24,23 a 534,39 µM de sulfato ferroso. amostra g<sup>-1</sup>, enquanto pelo método DPPH variou de 0,24 a 72,37 µmol TEAC. amostra g<sup>-1</sup>.

A Tabela 3 apresenta a ANOVA e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido para as respostas TPC, FRAP e DPPH. De acordo com os valores de  $F$  e  $p$ , variáveis explicativas foram selecionadas para compor os modelos.

**Tabela 3.** Análise de variância (ANOVA) para teor de fenólicos totais (TPC) e capacidade antioxidante pelos métodos de FRAP e DPPH.

Análises e parâmetros	R <sup>2</sup>	Efeitos	Soma de quadrados	Valor F	Valor p
<b>TPC</b>					
	0,71				
Modelo		-	290036,0	162,28	0,001*
x <sub>1</sub>		13,911	385,9	1,72	0,28
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>		-113,525	20449,5	91,53	0,002*
x <sub>2</sub>		267,334	142510,1	637,89	<0,0001*
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>		144,919	33323,4	149,15	0,001*
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>		1,282	1,6	0,007	0,93
Erro			670,2		
Resíduo		-	94035,7	-	-
Total		-	290706,2	-	-
<b>FRAP</b>					
	0,82				
Modelo		-	209679,6	316,52	<0,0001*
x <sub>1</sub>		43,9031	3843,5	46,41	0,006*
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>		-56,6150	5085,8	61,42	0,004*
x <sub>2</sub>		254,2170	128868,0	1556,28	<0,0001*
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>		126,9228	25561,0	308,69	<0,0001*
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>		57,5012	3306,4	39,93	0,008*
Erro		-	248,4	-	-
Resíduo		-	43263,3	-	-
Total		-	209928,0	-	-
<b>DPPH</b>					
	0,83				
Modelo		-	4348,69	1566,39	<0,0001*
x <sub>1</sub>		6,38985	81,41	234,61	<0,0001*
x <sub>1</sub> <sup>2</sup>		-3,30945	17,37	50,07	0,005*
x <sub>2</sub>		37,93784	2869,99	8270,15	<0,0001*
x <sub>2</sub> <sup>2</sup>		17,40288	480,55	1384,75	<0,0001*
x <sub>1</sub> x <sub>2</sub>		10,63052	113,00	325,64	<0,0001*
Erro		-	1,041	-	-
Resíduo		-	787,41	-	-
Total		-	4349,73	-	-

Legenda: TPC = conteúdo fenólico total; FRAP = Poder Antioxidante Redutor Férrico; DPPH = 2,2-difenil-1-picril-hidrazil. \* valor de p significativo ( $p \leq 0,05$ ).

A ANOVA mostra a influência de termos lineares, quadráticos e de interação no modelo ajustado. Foi possível observar que o tempo e a interação entre o tempo e o percentual de etanol foram os únicos termos considerados não significativos ( $p \geq 0,05$ ), portanto foram retirados do modelo de TPC, representado pela equação 2. Enquanto que, o percentual de etanol apresentou um efeito significativo e positivo na resposta de TPC. Os termos linear e quadrático para a concentração de etanol durante a extração representaram os maiores efeitos, indicando que o aumento em seus valores promoveu sinergicamente um aumento no teor de compostos fenólicos totais. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) obtido para o TPC

foi considerado satisfatório; sendo igual a 0,71 e o valor F do modelo (162,28) implica que é significativo.

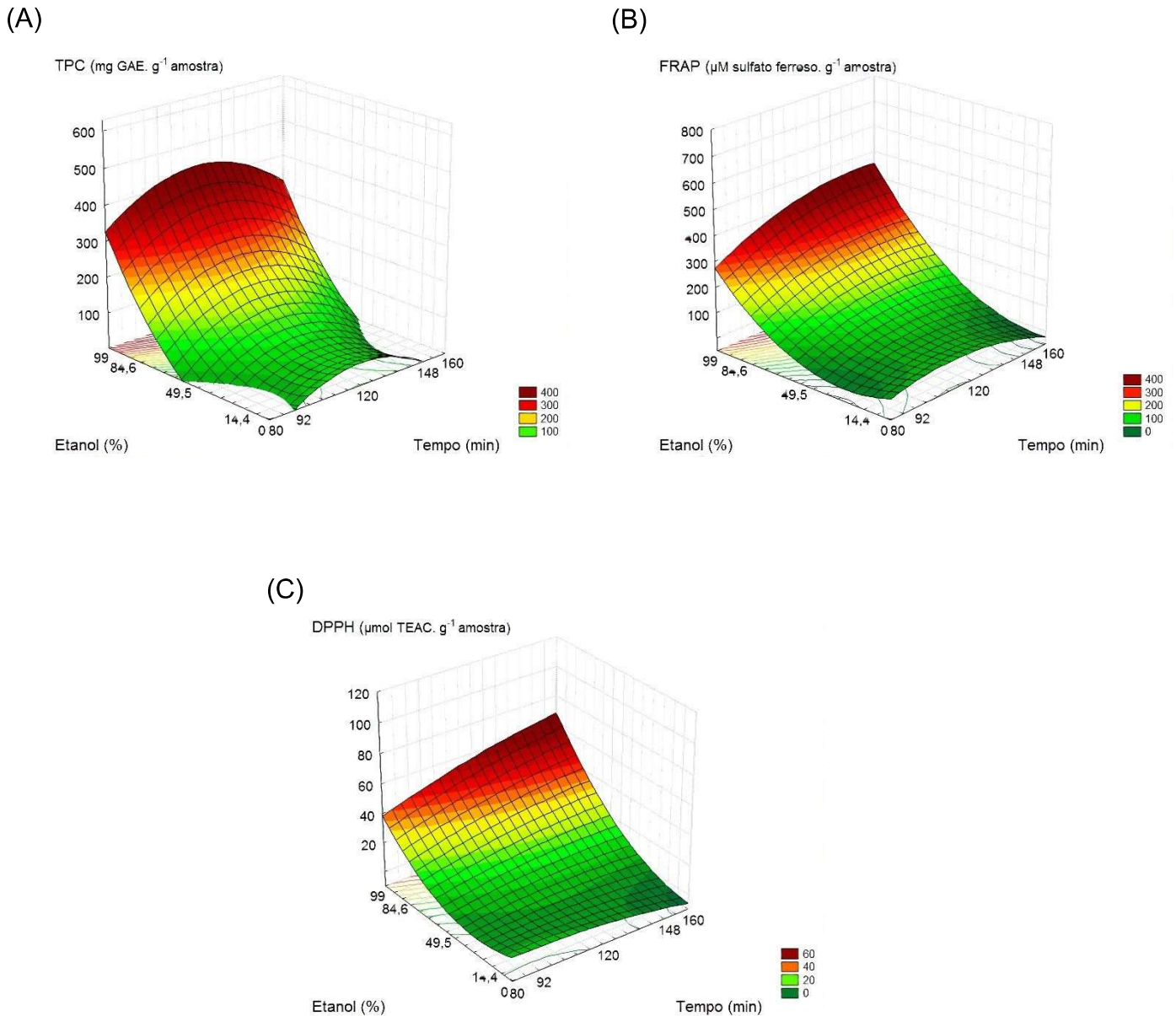
$$\text{TPC} = 106,01 - 56,76x_1^2 + 133,66x_2 + 72,45x_2^2 \quad \text{Equação 2.}$$

As respostas da capacidade antioxidante tiveram os percentuais de variação explicados devido às variáveis explicativas de 82% e 83% para FRAP e DPPH, respectivamente. Além disso, o teste F foi significativo para os modelos ( $p \leq 0,05$ ) (Equações 3 e 4). Com base na análise de efeitos, todos os parâmetros (linear, quadrático e interação) apresentaram efeito significativo ( $p \leq 0,05$ ) para ambas as variáveis dependentes, conforme demonstrado nos modelos matemáticos.

$$\text{FRAP} = 112,46 + 21,95x_1 - 28,30x_1^2 + 127,10x_2 + 63,46x_2^2 + 28,75x_1x_2 \quad \text{Equação 3.}$$

$$\text{DPPH} = 12,57 + 3,19x_1 - 1,65x_1^2 + 18,96x_2 + 8,70x_2^2 + 5,31x_1x_2 \quad \text{Equação 4.}$$

Por meio das curvas de superfície de resposta (Figura 1), a contribuição de cada variável para a capacidade antioxidante e TPC é evidente. As superfícies tridimensionais de resposta permitem compreender que um tempo intermediário de extração (120 minutos) por ultrassom foi suficiente para produzir extratos com maiores concentrações de compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Além disso, os extratos apresentaram maiores resultados na concentração máxima de etanol testada (99%) para todas as respostas (TPC, FRAP e DPPH), indicando que os principais compostos extraídos apresentavam características apolares.



**Figura 1.** Os gráficos das superfícies de resposta mostram o efeito do tempo e da concentração de etanol sobre o conteúdo fenólico total (TPC) e a capacidade antioxidante (FRAP e DPPH) representados por “A”, “B” e “C”, respectivamente.

O menor resultado de TPC e capacidade antioxidante foram observados quando 100% de água foram usados para extração, e o maior resultado foi percebido com solução de etanol 99% como solvente. Esses resultados estão de acordo com Casagrande et al. (2018), que descobriram em seu estudo com *Baccharis dracunculifolia* que o TPC foi fortemente influenciado pela concentração de etanol usado na solução de extração. O etanol é considerado ecologicamente correto e é preferencialmente utilizado para a extração de compostos antioxidantes, pois agride menos o meio ambiente quando comparado a outros solventes como o metanol (IZADIYAN e HEMMATEENEJAD, 2016). Martinez-Correa et al.

(2012) verificaram que o tipo de solvente utilizado na extração influencia nos resultados da capacidade antioxidante, pois cada solvente extrai substâncias com diferentes atividades de eliminação dos radicais DPPH. Mokrani e Madani (2016) também perceberam essa informação em seu trabalho com a pêra, verificando que os compostos antioxidantes estavam fortemente relacionados ao tipo de solvente utilizado.

Autores que estudaram a folha de *Baccharis dracunculifolia* como fonte de fenólicos, encontraram valores de TPC variando de  $69,00 \pm 2,00$  a  $197,00 \pm 3,00$  mg GAE. g<sup>-1</sup> amostra quando utilizaram diversos processos de extração, como a aplicação de dióxido de carbono supercrítico (MARTINEZ-CORREA et al., 2012). Tais dados exemplificam a eficiência que o ultrassom teve em nosso estudo, uma vez que foi possível obter resultados de TPC superiores aos encontrados pelos autores citados anteriormente, além disso, é possível confirmar maior quantidade de fenólicos no broto floral quando comparado com a folha da planta em questão. Variações nos resultados de TPC já foram relatadas na *Baccharis dracunculifolia* quando se utilizou diferentes solventes na extração, obtendo-se resultados a partir de 21,20 a 33,87 mg. planta g<sup>-1</sup> com uso de etanol (CASAGRANDE et al., 2018).

Também é necessário verificar a capacidade antioxidante por vários métodos, a fim de identificar a tendência do rendimento da extração relacionada aos compostos bioativos. Portanto, foram utilizados os métodos FRAP e DPPH. Em um estudo avaliando a capacidade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *B. oreophila*, foram encontrados resultados de  $145 \pm 0,02$   $\mu\text{mol TEAC} / 100 \text{ mL}^{-1}$  pelo método ABTS,  $71 \pm 0,03$   $\mu\text{mol TEAC} / 100 \text{ mL}^{-1}$  pelo DPPH e  $409 \pm 0,04$   $\mu\text{M FeSO}_4 \cdot \text{mL}^{-1}$  de acordo com a metodologia FRAP (DE OLIVEIRA et al., 2019). Os resultados são muito próximos aos encontrados em nosso trabalho, já que as plantas pertencem à mesma família Asteraceae. Avaliando o conteúdo fenólico total e a capacidade antioxidante, observou-se que entre as duas plantas nativas uruguaias analisadas (*Achyrocline satureioides* e *Baccharis trimera*), *Baccharis t.* apresentou melhores resultados e comprovou a eficácia dos compostos fenólicos encontrados nesta família de plantas (ARES, BARREIRO e GÁMBARO, 2010).

A temperatura utilizada no presente experimento com alecrim-do-campo foi fixada em 35°C e foi adequada para extração, evitando a perda ou degradação dos compostos ativos. Hosseini et al. [25] estudando a extração de compostos fenólicos do alecrim, descobriram que 40°C era suficiente para aumentar a efeitos mecânicos do equipamento de ultrassom sem ocorrer degradação dos compostos.

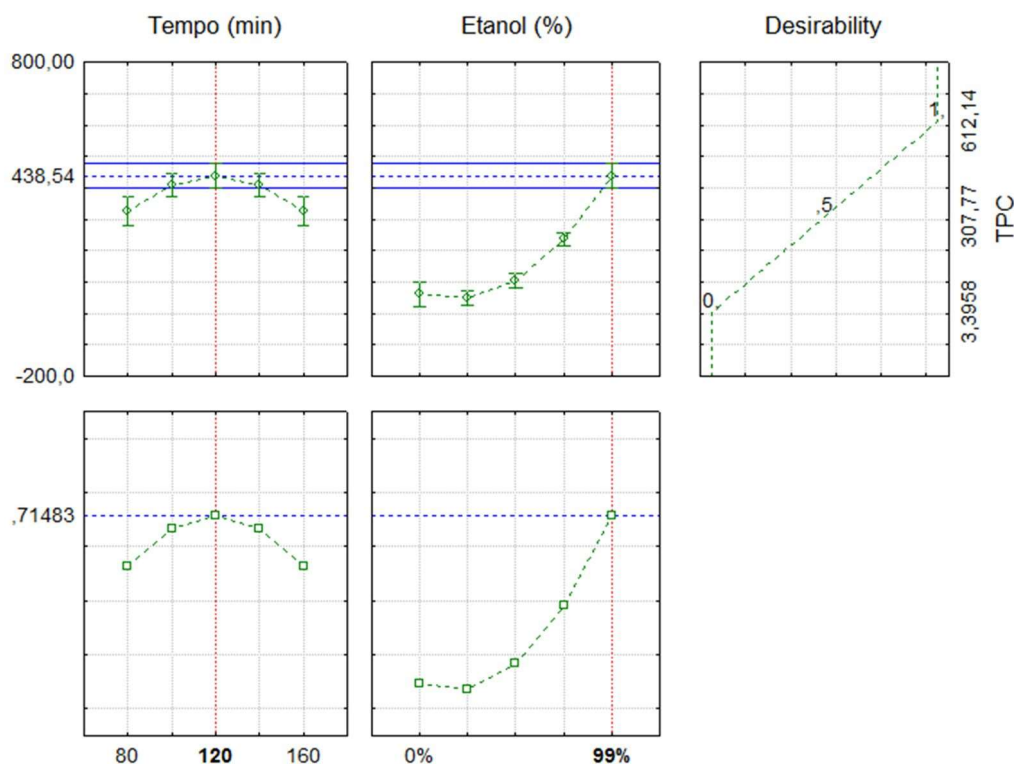
Além da temperatura, a tecnologia de extração assistida por ultrassom foi fundamental para a obtenção de ótimos resultados de rendimento de antioxidantes. Este equipamento é considerado bastante eficiente na extração de compostos antioxidantes de folhas e botões florais de plantas, como a *Acacia confusa* (TUNG et al., 2010). Os resultados obtidos no presente estudo também estão de acordo com Boudries et al. (2019), que alegaram ter obtido

extratos de brotos de *Capparis spinosa* ricos em compostos antioxidantes, principalmente devido à eficiência da técnica de ultrassom. Os autores mencionaram que este equipamento permite a obtenção de elevados rendimentos de extração em menor tempo de processamento, sendo uma técnica ecológica. Além disso, o tempo de extração foi relatado como um dos fatores essenciais desse estudo citado utilizando o ultrassom, uma vez que após um período não houve mais aumento no teor de compostos fenólicos extraídos. Os dados confirmam o que foi abordado em estudos anteriores, que mostram que o ultrassom requer menos tempo para obtenção de altos níveis de conteúdo fenólico total em comparação com outros métodos de extração, como extração assistida por calor e maceração, além de requerer menos solvente (JOVANOVIĆ et al., 2017; ROCHA et al., 2018).

### **3.3.3 Produção de extratos de alecrim-do-campo e própolis verde em condições otimizadas**

A condição ótima de extração de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) foi determinada de acordo com os resultados do teor de compostos fenólicos totais (TPC), com base na figura de Perfis para os valores previstos e desejabilidade (Figura 2). Esta resposta foi utilizada para determinar o ponto ótimo em um tempo médio de extração, definido em nosso estudo para permitir um processo de aplicação industrial, utilizando a produção em massa no menor tempo de extração possível com ótimos resultados de produtividade.





**Figura 2.** Perfis de valores preditos e deseabilidade obtidos para a análise de TPC.

A função de deseabilidade verificada na Figura 2 é baseada na conversão da resposta em um valor que varia de 0 a 1. O valor mais próximo de 1 é atribuído à resposta ótima desejada (LEE, JEONG e KIM, 2018). No caso do nosso estudo, a deseabilidade manteve-se em 0,71 e no ponto ótimo possibilitou a obtenção de resultados significativos da capacidade antioxidante quando comparados aos dados da literatura. Nota-se através dos perfis de valores preditos e deseabilidade que o ponto ótimo de extração dos compostos fenólicos foi aos 120 minutos de extração, utilizando 99% de etanol como concentração na solução extratora. Essas condições foram testadas e os resultados de TPC, FRAP e DPPH foram altamente satisfatórios. O conteúdo fenólico total obtido no ponto ótimo foi de  $612,14 \pm 0,84$  mg GAE. amostra  $g^{-1}$ , e capacidade antioxidante de  $534,39 \pm 0,20$   $\mu$ M de sulfato ferroso. $g^{-1}$  amostra pelo método FRAP e  $72,37 \pm 0,80$   $\mu$ mol TEAC. amostra  $g^{-1}$  por DPPH. Assim, o modelo pode ser usado para otimizar os compostos ativos de alecrim-do-campo por extração assistida por ultrassom acoplada a um projeto experimental.

### 3.3.4 Comparação entre os extratos otimizados de alecrim-do-campo e própolis verde

Em nosso estudo, as condições de recuperação dos compostos antioxidantes da própolis verde resultaram em extratos com TPC de 3.462,4 GAE.g<sup>-1</sup> amostra e capacidade antioxidante de 18.652,9 µmol TEAC.g<sup>-1</sup> amostra pelo método DPPH e 36.231,0 µM sulfato ferroso.g<sup>-1</sup> amostra. As condições foram as mesmas utilizadas por nosso estudo anterior, de acordo com Cavalaro et al. [9], onde obteve-se como resultados: 1614,8 mg GAE.g<sup>-1</sup> amostra de TPC e capacidade antioxidante de 13244,5 µmol TEAC.g<sup>-1</sup> amostra pelo método ORAC e 13412,1 µmol TEAC.g<sup>-1</sup> amostra pelo método ABTS. No estudo atual, os resultados foram superiores aos encontrados anteriormente e isso pode ser explicado pela sazonalidade da própolis verde, visto que as amostras foram obtidas na época da floração do alecrim-do-campo (março) e no trabalho anterior as amostras foram coletadas em novembro. Os melhores rendimentos na recuperação de compostos fenólicos da própolis verde e do alecrim-do-campo estão relacionados à colheita entre dezembro e abril (SOUZA et al.,2011).

Foi possível verificar que apesar dos excelentes resultados obtidos para a planta, ela foi significativamente inferior à própolis verde. Porém, novos estudos *plant-based* não devem ser desconsiderados, visto que existe uma demanda crescente por dietas à base de plantas e a própolis é considerada de origem animal (BODIRSKY et al., 2019). Esses dados estão de acordo com o encontrado por Park et al. (2005), que constatou que a capacidade antioxidante do extrato etanólico da própolis verde foi superior aos extratos de *Baccharis dracunculifolia* usando a metodologia DPPH. Os autores relataram que essa diferença de resultados provavelmente ocorreu devido ao conteúdo fenólico presente nos extratos. É plausível comentar que o período de maior frequência de coleta de resina pelas abelhas africanizadas *Apis mellifera* L. coincide com a colheita da própolis verde, portanto os compostos fenólicos encontrados em ambos os materiais são comumente semelhantes. Além disso, as abelhas preferem a planta *Baccharis dracunculifolia* devido à sua composição fenólica atrativa, além desta planta possuir materiais que são facilmente mastigáveis por esses insetos (SALATINO; SALATINO, 2017).

Com relação aos resultados, a otimização com DCCR acoplada à extração assistida por ultrassom permitiu obter melhores resultados de compostos fenólicos para alecrim-do-campo e própolis verde. Nesse sentido, foram extraídos mais compostos responsáveis pela capacidade antioxidante do que o observado na literatura.

### **3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados obtidos confirmam que a extração assistida por ultrassom foi eficiente na obtenção de compostos antioxidantes do alecrim-do-campo, além de ser considerada uma técnica ecologicamente correta. Além disso, quando acoplado ao desenho experimental DCCR, a metodologia permitiu verificar elevados resultados de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante, possibilitando a obtenção de tais compostos de interesse em um tempo intermediário de extração com base nas faixas testadas.

Por fim, foi possível verificar que a capacidade antioxidante da própolis verde com extração assistida por ultrassom é superior à sua principal fonte botânica alecrim-do-campo. No entanto, isso não impede seu uso como antioxidante natural, uma vez que obteve resultados elevados quando comparado com a literatura.

## REFERÊNCIAS

- Ares, G.; Barreiro, C.; Gámbaro, A. Evaluation of antioxidant extracts from Uruguayan native plants: importance of sensory characteristics Evaluación de extractos antioxidantes de plantas nativas uruguayas: importancia de las características sensoriales. *CyTA—J. Food*. 2010, 8, 201-207.
- Atta, E. M.; Mohamed, N. H.; Abdelgawad, A. A. Antioxidants: An overview on the natural and synthetic types. *Eur. Chem. Bull.* 2017, 6, 365-375.
- Boudries, H.; Nabet, N.; Chougui, N.; Souagui, S.; Loupassaki, S.; Madani, K.; Dimitrov, K. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant phenolics from Capparis spinosa flower buds and LC–MS analysis. *J. Food Meas. Charact.* 2019, 13, 2241-2252.
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.* 1995, 28, 25-30.
- Casagrande, M.; Zanela, J.; Júnior, A. W.; Busso, C.; Wouk, J., Iurckevicz, G.; Malfatti, C. R. M. Influence of time, temperature and solvent on the extraction of bioactive compounds of Baccharis dracunculifolia: In vitro antioxidant activity, antimicrobial potential, and phenolic compound quantification. *Ind. Crop. Prod.* 2018, 125, 207-219.
- Cavalaro, R. I.; Cruz, R. G.; Dupont, S.; Moura Bell, J. M. L. N.; Vieira, T. M. F.S. In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction. *Food Chem.: X* 2019, 4, 100054.
- Chemat, F.; Rombaut, N.; Meullemiestre, A.; Turk, M.; Perino, S.; Fabiano-Tixier, A. S.; Abert-Vian, M. Review of green food processing techniques. Preservation, transformation, and extraction. *Innov. Food Sci. Emerg.* 2017a, 41, 357-377.
- Chemat, F.; Rombaut, N.; Sicaire, A. G.; Meullemiestre, A.; Fabiano-Tixier, A. S.; Abert-Vian, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrason. sonochem.* 2017b, 34, 540-560.
- Figueiredo, S. M.; Binda, N. S.; Vieira-Filho, S. A.; De Moura Almeida, B.; Abreu, S.R.I.; Paulino, N.; Park, Y. K. Physicochemical Characteristics of Brazilian Green Propolis Evaluated During a Six-Year Period. *Curr. Drug Discov. Technol.* 2017, 14, 127-134.
- Fratoddi, I.; Rapa, M.; Testa, G.; Venditti, I.; Scaramuzzo, F. A.; Vinci, G. Response surface methodology for the optimization of phenolic compounds extraction from extra virgin olive oil with functionalized gold nanoparticles. *Microchem. J.* 2018, 138, 430-437

- Gomes, V.; Fernandes, G. W. Germinação de aquênios de *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). *Acta. Bot. Bras.* 2002, 16, 421-427.
- Guimarães, N. S.; Mello, J. C.; Paiva, J. S.; Bueno, P. C.; Berretta, A. A.; Torquato, R. J.; Rodrigues, T. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. *Food Chem. Toxicol.* 2012, 50, 1091-1097.
- Hammi, K. M.; Jdey, A.; Abdelly, C.; Majdoub, H.; Ksouri, R. Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from Tunisian *Zizyphus lotus* fruits using response surface methodology. *Food chem.* 2015, 184, 80-89.
- Hosseini, H.; Bolourian, S.; Yaghoubi Hamgini, E.; Ghanuni Mahababadi, E. Optimization of heat-and ultrasound-assisted extraction of polyphenols from dried rosemary leaves using response surface methodology. *J. Food Process. Pres.* 2018, 42, e13778.
- Izadiyan, P.; Hemmateenejad, B. Multi-response optimization of factors affecting ultrasonic assisted extraction from Iranian basil using central composite design. *Food chem.* 2016, 190, 864-870.
- Jovanović, A. A.; Đorđević, V. B.; Zdunić, G. M.; Pljevljakušić, D. S.; Šavikin, K. P.; Gođevac, D. M.; Bugarski, B. M. (2017). Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat-and ultrasound-assisted techniques. *Sep. Purif. Technol.* 2017, 179, 369-380.
- Lee, D. H.; Jeong, I. J.; Kim, K. J. A desirability function method for optimizing mean and variability of multiple responses using a posterior preference articulation approach. *Qual. Reliab. Eng. Int.* 2018, 34, 360-376.
- Martinez-Correa, H. A.; Cabral, F. A.; Magalhães, P. M.; Queiroga, C. L.; Godoy, A. T.; Sánchez-Camargo, A. P.; Paviani, L. C. Extracts from the leaves of *Baccharis dracunculifolia* obtained by a combination of extraction processes with supercritical CO<sub>2</sub>, ethanol and water. *J. Supercrit. Fluid.* 2012, 63, 31-39.
- Mokrani, A.; Madani, K. (2016). Effect of solvent, time and temperature on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of peach (*Prunus persica* L.) fruit. *Sep. Purif. Technol.* 2016, 162, 68-76.
- Oliveira, C. T.; Lameiro, B. H. N. S. M.; Portes Ferriani, A.; Santos, V. A. Q.; Cunha, M. A. A.; Dias Teixeira, S. Chemical Characterization, Antioxidant Capacity and Antimicrobial Potential of Essential Oil from the Leaves of *Baccharis oreophila* Malme. *Chem. Biodivers.* 2019, 16, e1800372.

- Park, Y. K.; Fukuda, I.; Ashida, H.; Nishiumi, S.; Yoshida, K. I.; Dausch, A.; Pastore, G. M. Suppressive effects of ethanolic extracts from propolis and its main botanical origin on dioxin toxicity. *J. Agr. Food. Chem.* 2005, 53, 10306-10309.
- Rocha, J. D. C. G.; Procopio, F. R.; Mendonca, A. C.; Vieira, L. M.; Perrone, I. T.; Barros, F. A. R. D.; Stringheta, P. C. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from jussara (*Euterpe edulis* M.) and blueberry (*Vaccinium myrtillus*) fruits. *Food Sci Technol.* 2018, 38, 45-53.
- Rodrigues, D. M.; De Souza, M. C.; Arruda, C.; Pereira, R. A. S.; Bastos, J. K. The Role of *Baccharis dracunculifolia* and its Chemical Profile on Green Propolis Production by *Apis mellifera*. *J. Chem. Ecol.* 2020, 46, 150-162.
- Salatino, A.; Salatino, M. L. F. Why Do Honeybees Exploit so Few Plant Species as Propolis Sources? *MOJFPT* 2017, 4, 3.
- Silva, F. C.; Da Fonseca, C. R.; De Alencar, S. M.; Thomazini, M.; De Carvalho Balieiro, J. C.; Pittia, P.; Favaro-Trindade, C. S. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. *Food Bioprod. Process.* 2013, 91, 28-36.
- Simone-Finstrom, M.; Spivak, M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 2010, 41, 295-311.
- Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela, R.M. Analysis of total phenols and other substrates and antioxidants by means of Folin – Ciocalteu reagent. *Method. Enzymol.* 1999, 299, 152-178.
- Sousa, J. P. B.; Leite, M. F.; Jorge, R. F.; Resende, D. O.; Da Silva Filho, A. A.; Furtado, N. A.; Bastos, J. K. Seasonality role on the phenolics from cultivated *Baccharis dracunculifolia*. *Evid-Based Compl. Alt.* 2011, 2011, 1-8.
- Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Byrne, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *J. Food Compos. Anal.* 2006, 19, 669-675.
- Tung, Y. T.; Chang, W. C.; Chen, P. S.; Chang, T. C.; Chang, S. T. Ultrasound-assisted extraction of phenolic antioxidants from *Acacia confusa* flowers and buds. *J. Sep. Sci.* 2011, 34, 844-851.

Wen, C.; Zhang, J.; Zhang, H.; Dzah, C.S.; Zandile, M.; Duan, Y.; Luo, X. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops—A review. *Ultrason. Sonochem.* 2018, 48, 538–549.

## 4. ENCAPSULAÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS VERDE E ALECRIM-DO-CAMPO POR *SPRAY DRYING* E AVALIAÇÃO DA LIBERAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

### RESUMO

A microencapsulação de materiais ativos é uma técnica que vem sendo bastante utilizada visando proteger e liberar de maneira controlada os compostos encapsulados, além de facilitar sua aplicação por possíveis efeitos sensoriais indesejáveis. O objetivo deste estudo foi obter e caracterizar micropartículas de alecrim-do-campo e própolis verde, bem como avaliar seu *shelf life* durante o armazenamento e seu desempenho antioxidante por meio de teste de aplicação em emulsão lipídica, comparando ao Terc-butilhidroquinona (TBHQ). As amostras de própolis verde e alecrim-do-campo foram microencapsuladas por *spray drying* e analisadas quanto às suas características físico-químicas e capacidade de retenção de compostos fenólicos (teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante por DPPH e FRAP) ao longo de 6 períodos de armazenamento, em temperatura de refrigeração, ambiente e sob aquecimento (4, 25 e 40°C, respectivamente). A amostra de própolis verde foi posteriormente analisada quando a sua eficiência em manter a estabilidade oxidativa de emulsões do tipo óleo em água (O/A), já que apresentou melhor resultado de retenção e liberação dos compostos de interesse. No geral, as micropartículas de própolis verde diferiram das de alecrim-do-campo em quase todas avaliações físico-químicas, mesmo passando pelo mesmo processo e condições de microencapsulação. Quanto à capacidade de retenção de compostos fenólicos, a amostra de alecrim-do-campo em pó apresentou resultados superiores em relação ao seu extrato de origem. No entanto, as amostras de própolis verde (extrato e micropartículas) apresentaram valores superiores quanto à capacidade antioxidante, além da liberação gradual dos compostos fenólicos totais durante o ensaio de armazenamento. Durante o teste acelerado em estufa, a amostra de própolis verde em pó na concentração de 200 ppm foi eficiente em evitar a oxidação lipídica, com desempenho similar ao antioxidante sintético TBHQ, o que indica a viabilidade técnica para uso como antioxidante natural em produtos como a matriz alimentar testada. Doses superiores de micropartículas de alecrim-do-campo devem ser testadas para possíveis usos em alimentos.

Palavras-chave: Microencapsulação; *Shelf life*; Oxidação; Própolis verde; Alecrim-do-campo



## ABSTRACT

The micro-encapsulation of active materials is a technique that has been widely used aiming to protect and release the encapsulated compounds in a controlled manner, besides simplifying its application by avoiding possible undesirable sensory effects. The objective of this study was to obtain and characterize rosemary and green propolis micro-particles, as well as to evaluate their shelf life during storage and to evaluate their antioxidant performance in a lipid emulsion application test, comparing to TBHQ. The green propolis and rosemary-of-field samples were micro-encapsulated by spray drying and analyzed for their physicochemical characteristics and phenolic compounds retention capacity (total phenolic compounds content and antioxidant capacity by DPPH and FRAP) throughout at refrigerated, ambient and under heating temperatures (4, 25 and 40°C, respectively). The green propolis sample was further analyzed for its efficiency in the application of TBHQ in lipid emulsion tests. The green propolis and rosemary-of-field samples were micro-encapsulated by spray drying and analyzed for their physicochemical characteristics and phenolic compounds retention capacity (total phenolic compounds content and antioxidant capacity by DPPH and FRAP) throughout 6 storage periods, at refrigeration, room and under heating temperatures (4, 25 and 40°C, respectively). The green propolis sample was further analyzed for its efficiency in oxidative stability of oil-in-water (O/W) emulsions, as it showed better results in retention and release of the compounds of interest. Overall, green propolis micro-particles differed from rosemary-of-the-field ones in almost all physicochemical evaluations, even going through the same micro-encapsulating process and conditions. As for the retention capacity of phenolic compounds, the rosemary-of-the-field powder sample showed superior results than its original extract. However, the green propolis samples (extract and micro-particles) presented superior values regarding the antioxidant capacity, besides the gradual release of the total phenolic compounds during the storage test. During the accelerated oven test, the green propolis powder sample at a concentration of 200 ppm was efficient in preventing lipid oxidation, with a performance analogous to the synthetic antioxidant TBHQ, indicating its technical feasibility for use as a natural antioxidant in products such as the food matrix tested. Higher doses of rosemary-field micro-particles should be tested for possible uses in foods.

Keywords: Microencapsulation; Shelf life; Oxidation; Green propolis; Rosemary-of-field

## 4.1. INTRODUÇÃO

Pesquisas recentes têm demonstrado aprofundamentos crescentes em estudos sobre antioxidantes naturais, já que os antioxidantes sintéticos foram indicados como possíveis causadores de malefícios à saúde dependendo da concentração que são utilizados, além disso existe uma demanda dos consumidores para que haja uma substituição dos antioxidantes sintéticos pelos naturais em alimentos ricos em óleos e gorduras (TAGHVAEI e JAFARI, 2015).

Antioxidantes de fontes naturais são geralmente utilizados para aumentar a estabilidade de alimentos, atuando na prevenção da oxidação lipídica (GIRONI e PIEMONTE, 2011). No geral, são compostos fenólicos com excelentes resultados de capacidade antioxidante, que podem ter similar ou até melhor desempenho do que antioxidantes sintéticos (KRISHNAIAH, SARBATLY e NITHYANANDAM, 2011).

A planta *Baccharis dracunculifolia* (Bd), ou também conhecida como alecrim-do-campo e vassourinha, é usualmente utilizada por abelhas africanizadas *Apis mellifera* para coleta de resinas de folhas ou brotos visando à produção de própolis verde (PARK et al., 2004). O alecrim-do-campo é considerado como a principal fonte botânica deste tipo de própolis e seu estudo é vantajoso por ser uma planta de fácil e rápida propagação, facilitando sua obtenção (GOMES e FERNANDES, 2002; GUIMARÃES et al., 2012). Tanto o alecrim-do-campo quanto a própolis verde possuem atividades biológicas como a capacidade antioxidante reconhecidas amplamente na literatura recente (VEIGA et al., 2017; AUGUSTO-OBARA et al., 2019). Cavalaro et al. (2019) demonstraram em seu estudo que, a utilização da própolis verde como antioxidante natural possibilita controlar a velocidade de reação da oxidação lipídica, sendo tão eficiente quanto o antioxidante sintético terc-butilhidroquinona (TBHQ).

A encapsulação por *spray drying* tem sido uma técnica bastante utilizada para estes tipos de compostos bioativos, visando principalmente proteger o material do núcleo, liberar este material de forma controlada, facilitar a veiculação em matrizes alimentares e até mesmo evitar os efeitos sensoriais indesejáveis que este ativo pode ter que dificulte sua aplicação (ALVIM et al., 2016). Com relação aos efeitos sensoriais, a encapsulação tem sido uma técnica utilizada para a própolis visando mascarar seu odor e sabor durante a aplicação em alimentos (SPINELLI et al., 2015; REIS et al., 2017). No entanto, não foram encontrados estudos que contenham dados aprofundados de *shelf life* de microencapsulados da própolis verde em contraste com sua fonte botânica alecrim-do-campo para verificação da capacidade de retenção de seus compostos ativos.

Além do estudo de *shelf life* para verificar a liberação dos compostos de interesse ao longo do tempo, a utilização de matrizes alimentares como emulsões do tipo óleo em água (O/A) pode ser útil na obtenção de dados de eficiência dos extratos e micropartículas,

buscando determinar as propriedades antioxidantes ou pró oxidantes de seus compostos (CHAIYASIT, MCCLEMENTS e DECKER, 2005).

Diversos estudos foram publicados recentemente sobre a capacidade biotecnológica da própolis verde e sua principal fonte botânica alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) e existe uma lacuna no que diz respeito à atuação dessas duas fontes de antioxidantes estudadas simultaneamente, já que possuem similaridades em seus compostos fenólicos (SOUSA et al., 2011). Nenhum estudo se aprofunda na microencapsulação e estudo conjunto dessas matérias primas como antioxidantes naturais. Portanto, o objetivo do presente estudo foi obter e caracterizar micropartículas de alecrim-do-campo e própolis verde, bem como avaliar seu *shelf life* durante o armazenamento. Além de investigar a estabilidade oxidativa da matéria prima que obtiver melhor comportamento de liberação de compostos bioativos frente ao antioxidante sintético TBHQ.

## **4.2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Obtenção do extrato**

O botão floral de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) e própolis verde foram gentilmente concedidos pela empresa brasileira Natucentro Indústria e Apiários Centro Oeste Ltda. (19°59'46"S,45°48'38"W) (Bambuí, Minas Gerais, Brasil). Ambas as amostras foram coletadas no mesmo período, época de floração da planta (março /2018).

Ambos os extratos foram obtidos utilizando ultrassom (LS Logen Scientific, LSUC2-120-3.0, Brasil), operando a 40 kHz com alimentação de 120 W. O extrato de alecrim-do-campo foi extraído seguindo dados de otimização seguintes: 1:10 na proporção amostra:solvente (m/v) utilizando etanol 99%, durante 120 minutos a 25°C. Já para a obtenção do extrato de própolis verde foram utilizados parâmetros otimizados em estudo preliminar nas condições de 0,857:30 (m/v) de proporção de amostra:solvente, 99% etanol a 35°C por 20 minutos (CAVALARO et al., 2019). Após tempo determinado, ambas as amostras foram centrifugadas a 4695 g por 15 minutos em micro centrífuga refrigerada (Hitachi KOKI; Japão) e filtradas em papel de filtro tipo Whatman n. 2. O sobrenadante foi rotaevaporado (rotaevaporador Buchi Labortechnik AG – modelo R-215) a 45°C para evaporação do etanol. Finalmente, as soluções resultantes foram armazenadas sob refrigeração a 7°C em frascos âmbar até o momento da secagem em spray dryer.

#### **4.2.2 Secagem por *spray dryer***

Para o encapsulamento, foi utilizada a maltodextrina 20DE (equivalente de dextrose) (Ingredion) como material de parede, devido a sua capacidade de produzir micropartículas com alta solubilidade, baixo teor de umidade e higroscopicidade (MOHD NAWI, MUHAMAD e MOHD MARSIN, 2015).

Para a produção das micropartículas por *spray dryer*, uma mistura de maltodextrina 20DE (material de parede) e extratos de alecrim-do-campo e própolis verde (núcleos) foram diluídos separadamente em água destilada (agitador mecânico, IKA-Werke, RW 11 Lab egg e agitador, Staufen, Alemanha), representando o teor total de sólidos de 39g/100g para o alecrim-do-campo e 24g/100g para própolis. No caso da própolis verde, o material de parede foi adicionado à mistura aos poucos sob agitação na proporção de 3/5 extrato:maltodextrina (m/m) para o alecrim-do-campo e de 2/5 extrato:maltodextrina (m/m) para a própolis verde.

Todas as formulações foram produzidas duas vezes e a secagem por pulverização foi realizada em um secador de bancada (modelo B290; Büchi, Flawil, Suíça). As misturas foram introduzidas na câmara de secagem em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) através de uma bomba peristáltica com a vazão ajustada para 9,1 mL/min no caso da própolis verde e 9,5 mL/min no caso do alecrim-do campo. A temperatura do ar de entrada era de  $150 \pm 2^\circ\text{C}$  e a temperatura do ar de saída foi de  $80 \pm 2^\circ\text{C}$  para ambos os materiais.

#### **4.2.3 Caracterização das micropartículas**

##### **4.2.3.1 Avaliação do conteúdo de umidade, atividade de água ( $A_w$ ), higroscopicidade e solubilidade**

As amostras de micropartículas de alecrim-do-campo e própolis verde foram analisadas quanto à umidade, determinada pelo método de Karl Fisher em equipamento 901 Titrande (METROHM, Suíça) de acordo com a metodologia ASTM e 203-96 (BRUTTEL e SCHLINK, 2003). Utilizou-se entre 0,200 e 0,300 g de amostras, que posteriormente foram transferidas para o recipiente de análise do equipamento que continha uma mistura de metanol e formamida 1:1 (Merck) como dispersante.

Já a atividade de água ( $A_w$ ) foi realizada no equipamento Pullman, modelo Aqualab e Decagon Devices (EUA) à temperatura constante de  $25^\circ\text{C}$  (ALVIM et al., 2016).

A higroscopicidade foi analisada de acordo com o método proposto por Cai e Corke (2000), com modificações. Utilizando 1 g de amostras (em triplicada) colocadas num dessecador contendo solução saturada de cloreto de sódio (75,5% de umidade relativa)

durante 7 dias. O cálculo foi realizado com base na massa de água absorvida pelas amostras e o resultado foi expresso em g de água por 100 g de matéria seca (MS).

A solubilidade foi determinada utilizando o método gravimétrico, proposto por Eastman e Moore (1984) com modificações. As amostras (0,25 g) foram adicionadas em frascos de Erlenmeyer contendo 25,0 mL de água destilada e posteriormente foram homogeneizadas em agitador orbital (TE-420 e Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 200 rpm por 30 min em temperatura ambiente (25°C). As soluções obtidas foram centrifugadas (2600 RPM, durante 5 min) e uma alíquota de 10 mL do sobrenadante foi retirada e seca no estufa a 105°C até atingir peso constante. A solubilidade foi calculada com base na massa da amostra presente na alíquota de 10 mL após a secagem, e o resultado foi expresso em porcentagem do material solubilizado.

#### 4.2.3.2 Diâmetro médio e distribuição de tamanho de partícula

O diâmetro médio e o tamanho de partícula foram medidos por difração de luz a laser (HORIBA LA-950 V2, Irvine, Califórnia), usando 1 g das amostras microencapsuladas dispersas em 5 mL de etanol absoluto 99,7% (Synth). As amostras foram analisadas no módulo de dispersão líquida. As dissoluções foram adicionadas ao módulo de análise do equipamento até que a concentração atingisse os níveis de transmitância adequados para leitura correta, de acordo com a metodologia adaptada de Alvim et al., 2016. As leituras das preparações foram realizadas por 6 vezes. Os resultados de tamanho de partícula foram expressos como diâmetro médio De Brouckere ( $D_{4,3}$ ), reconhecido como o diâmetro médio sobre a distribuição do volume. Já a polidispersividade foi calculada pelo span, através da equação a seguir:

$$\text{Span} = \frac{(D_{90} - D_{10})}{D_{50}} \quad \text{Equação 1.}$$

Em que,  $D_{90}$ ,  $D_{10}$  e  $D_{50}$  correspondem aos diâmetros relativos a 10, 50 e 90% de distribuição de tamanho acumulado.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como valores médios acompanhados dos respectivos desvios padrões. Os valores médios foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), e as diferenças significativas foram determinadas por meio do teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., USA).

#### 4.2.3.3 Morfologia

A morfologia das micropartículas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando um microscópio de mesa (TM-3000, Hitachi High Technologies America, Inc, Japão), como descrito por Okuro et al. (2013). As micropartículas foram colocadas em pedaços de fita de carbono de dupla face (Ted Pella, Inc., Redding-EUA). As imagens foram obtidas usando o modo Analy e ampliação de 800x.

#### 4.2.3.4 Eficiência de encapsulação

As amostras de micropartículas foram reconstituídas em solução contendo etanol-água (99/1, v/v) com o auxílio de um agitador magnético (Tenal, modelo TE-0851, Brasil) e centrifugadas por 10 minutos a 5000 RPM e 25°C, finalmente foram filtradas em filtro de papel qualitativo Unifil 12,5 cm. Amostras dos extratos de alimentação das micropartículas foram utilizados como padrão.

A eficiência da microencapsulação foi calculada de acordo com Wilkowska et al. (2017) e expresso pela média mais desvio padrão com relação ao teor de compostos fenólicos totais (TPC) obtidos logo após a microencapsulação. O cálculo de eficiência foi realizado através da equação 2:

$$EE(\%) = \frac{E}{E_{Total}} \cdot 100 \quad \text{Equação 2.}$$

Onde  $E$  é a quantidade de compostos fenólicos encapsulados nas micropartículas e  $E_{total}$  é a quantidade de fenólicos da mistura de alimentação de partículas (extrato de alimentação).

#### 4.2.4 Avaliação da retenção de compostos bioativos microencapsulados durante o armazenamento

A estabilidade do teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante foram avaliados durante o tempo de armazenamento, conforme descrito por Fang e Bhandari (2011) com algumas modificações. Foram armazenadas para a análise os extratos de alimentação utilizados para secagem e as micropartículas de alecrim-do-campo e própolis verde.

Dez gramas das micropartículas foram dispostos em embalagens laminadas de 20 cm x 12 cm e 10 mL de extratos foram armazenados em tubos falcons recobertos com papel alumínio.

Para avaliar seu comportamento antioxidante, as amostras foram armazenadas em refrigerador a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$ , dessecador a  $25 \pm 3^\circ\text{C}$  e estufa a  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 6 semanas (Zokti et al., 2016). As análises de teor de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante pelos métodos de DPPH e FRAP, foram realizadas entre 0, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de acordo com Ahmad-Qasem et al. (2016) com modificações, para avaliação do efeito da temperatura e do tempo na estabilidade antioxidante. Para realização das análises, as amostras foram diluídas utilizando etanol-água (99/1, v/v) com o auxílio de um agitador magnético (Tenal, modelo TE-0851, Brasil) e no caso das micropartículas as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 RPM e  $25^\circ\text{C}$  e também filtradas em filtro de papel qualitativo Unifil 12,5 cm.

Os dados obtidos foram expressos pelos valores médios e desvios padrões das triplicatas. Foram procedidas análises de variância (ANOVA) e teste de Tukey ao nível de segurança de 5% para avaliar a diferença entre as amostras provocadas pelas condições de armazenamento: temperatura e tempo. As análises foram desenvolvidas utilizando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., USA).

#### **4.2.4.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais (TPC)**

A análise do teor de compostos fenólicos totais foi desenvolvida para verificação da estabilidade e liberação desses compostos quando expostos a diferentes temperaturas por tempo determinado. Toda e qualquer interferência da maltodextrina na análise foi excluída por meio de testes preliminares.

A determinação do teor de compostos fenólicos totais ou *total phenolic content* (TPC) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventos (1999), estabelecendo-se o ácido gálico como padrão para realização de uma curva. Para a determinação do teor de fenólicos totais, 0,5 g de amostra foi misturada a 2,5 mL do reagente *Folin-Ciocalteu* (diluído 1:10) e 2,0 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  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 2,5 a 40  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **4.2.4.2 DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)**

A atividade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi determinada segundo Ares, Barreiro & Gámbaro (2010). Para a análise, 100 mL de diferentes diluições das micropartículas foram colocados em uma cubeta contendo 3,9 mL de uma solução metanólica de DPPH 60 mM. A redução do radical DPPH foi medida por monitoramento da diminuição da absorção a 515 nm utilizando um espectrofotômetro UV mini-1240 (Shimadzu, Kyoto, Japan), até serem obtidos valores de extinção estáveis (\* 60 min). A concentração exata do DPPH foi calculada utilizando uma curva de calibração. A capacidade de eliminação do radical DPPH foi expressa em mg TEAC g<sup>-1</sup> ou mL<sup>-1</sup> de amostra (micropartículas ou extratos). Todas as determinações foram realizadas em triplicata para cada amostra e os valores médios e seus correspondentes desvios padrões foram fornecidos.

#### **4.2.4.3 FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power)**

A atividade antioxidante pelo método FRAP foi realizada de acordo com o que foi abordado por Thaipong et al. (2006) com modificações, sendo a leitura da análise realizada em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV 1240, Japão). Foram preparadas misturas contendo 90 µL de amostra ou solução padrão, 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP, sendo este preparado previamente com tampão acetato de sódio 0,3 M (pH 3,6), solução de cloreto férrico 20 mM e solução TPTZ 10 mM, preparada com HCl 40 mM (10:1:1, v/v/v). No caso do branco, foi utilizado apenas o reagente preparado FRAP para leitura. As misturas e o branco, que foram preparados em tubo de ensaio, foram mantidos em banho-maria com agitação a 37°C por 30 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura em 595 nm no espectrofotômetro. A curva padrão foi construída utilizando uma solução padrão de sulfato ferroso 2 mM nas concentrações de 300 a 1800 µM e os resultados foram expressos em µmol sulfato ferroso g<sup>-1</sup> ou mL<sup>-1</sup> de amostra (micropartículas ou extratos).

### **4.2.6 Estabilidade oxidativa de emulsões adicionadas de extratos livres e microencapsulados**

#### **4.2.6.1 Amostragem**

As amostras que apresentaram melhores resultados quanto à liberação dos compostos durante o armazenamento foram escolhidas para a realização do estudo de estabilidade oxidativa. Portanto, escolheu-se amostras de extrato de alimentação e



micropartículas de própolis verde, que foram comparadas com uma amostra padrão (sem antioxidante) e um padrão positivo de antioxidante sintético (TBHQ).

#### 4.2.6.2 Preparo das emulsões

A metodologia de preparo das emulsões adotada foi realizada de acordo com Huang et al. (1996). O preparo das emulsões do tipo óleo em água (O/A) foi realizado adicionando-se 200 g de óleo de soja refinado sem adição de antioxidante (Liza/Cargil), 180 g de água destilada, e 20 g de Monolaurato de Sorbitan Etoxilado 20 EO (Tween 20) (Synth/Periódica) como emulsionante em béquer. A mistura foi realizada em homogeneizador de amostra tipo Turrax (Ika T25 basic, Staufen, Germany) por 1 minuto a 18000 rpm. Micropartículas e extrato de própolis foram adicionados na fase oleosa da mistura nas concentrações de 100 e 200 mg/kg de óleo, baseando-se no teor de fenólicos totais das amostras. Além disso, uma amostra controle sem antioxidantes e outra controle positivo utilizando o terc-butilhidroxiquinona (TBHQ) foram utilizadas para comparação.

As emulsões foram mantidas a  $-14 \pm 2^\circ\text{C}$  até análise o momento das análises para separação da fase oleosa. As amostras foram codificadas da seguinte maneira (Tabela 1):

**Tabela 1.** Definição dos códigos das emulsões adicionadas de antioxidantes.

Códigos	Conteúdo das amostras
CONTROLE	Emulsão sem antioxidantes
EP100	Emulsão com extrato de própolis verde a 100 ppm
EP200	Emulsão com extrato de própolis verde a 200 ppm
PP100	Emulsão com micropartículas de própolis verde a 100 ppm
PP200	Emulsão com micropartículas de própolis verde a 200 ppm
TBHQ	Emulsão com antioxidante sintético TBHQ

Legenda: EP= extrato de própolis; PP=pó de própolis; TBHQ (terc-butilhidroxiquinona); números que seguem os códigos representam a concentração do antioxidante utilizada na emulsão.

#### 4.2.6.3 Avaliação da estabilidade oxidativa e grau de hidrólise

O método acelerado sob condições controladas foi utilizado para avaliação da estabilidade oxidativa das emulsões adicionadas dos antioxidantes. As emulsões foram submetidas ao Teste de Estufa (*Shaal Oven Test*), acondicionadas em tubos de ensaio e colocadas em estufa sob aquecimento de  $40 \pm 2^\circ\text{C}$  durante 6 semanas. O experimento

descrito foi procedido com amostras em triplicata retiradas para análise durante os 6 períodos por 25 dias.

A formação de hidroperóxidos foi monitorada para determinar a estabilidade oxidativa das emulsões e ocorreu de acordo com o método espectrofotométrico com o tiocianato férrico. A quantificação foi realizada através da construção de uma curva padrão com concentrações conhecidas de hidroperóxidos de cumeno. Os resultados foram expressos em mg de equivalente de hidroperóxido de cumeno/kg de óleo (SHANTHA e DECKER, 1994).

O progresso da oxidação lipídica foi monitorado medindo-se não somente o valor padrão de peróxido, mas também o teor de dienos e trienos conjugados de acordo com o método Ch 5 – 91 (AOCS, 2009). Os dienos foram calculados de acordo com a absorvância específica medida no comprimento de onda 232 nm, enquanto os trienos foram analisados no comprimento de onda 270 nm. Os resultados foram calculados através da equação  $E^{1\%_{1cm}} = A/C$ , onde A é a absorvância no comprimento de onda (232 nm e 268 nm) e C é a concentração da solução (g/100mL).

Foi analisado subsequentemente o teor de ácidos graxos livres expressos em % de ácido oleico, conforme estabelecido pela AOCS (2009).

Os resultados foram expressos pela média dos dados obtidos com os desvios padrões. O efeito do tempo de armazenamento em condições aceleradas sob o índice de peróxido, porcentagem de ácidos graxos livres, dienos e trienos foi avaliado por Análise de Variância (ANOVA). No caso de diferenças significativas, as médias das 3 repetições foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,5$ ), utilizando o aplicativo Statistica 7.0 (StatSoft Inc., USA).

## **4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.3.1 Caracterização das micropartículas**

#### **4.3.1.1 Umidade, Solubilidade, Higroscopicidade e Atividade de água (Aw)**

As amostras de micropartículas de própolis verde e alecrim-do-campo se diferenciaram significativamente no que diz respeito a sua caracterização físico-química, baseado nas análises de umidade, solubilidade e higroscopicidade, com exceção da atividade de água (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados das análises de caracterização das micropartículas.

Amostras	Umidade (%)	Solubilidade (%)	Higroscopicidade <sup>1</sup>	Atividade de água
PP	3,52 ± 0,07 <sup>b</sup>	93,10 ± 0,34 <sup>b</sup>	13,85 ± 0,23 <sup>b</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>a</sup>
PA	4,33 ± 0,32 <sup>a</sup>	99,62 ± 0,56 <sup>a</sup>	17,79 ± 0,33 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>a</sup>

Legenda: PP = pó de própolis; PA = pó de alecrim. Letras minúsculas diferentes nas colunas representam diferenças significativas entre as amostras ( $p < 0,05$ ). <sup>1</sup> dados expressos em g água/100g amostra seca.

Como pode ser observado na Tabela 2, a umidade de ambas as micropartículas foi abaixo de 5%. Andrade et al. (2018) verificaram que a umidade de diferentes tipos de própolis (marrom, vermelha e verde) variou de 5,86 a 9,96%, sendo que a própolis verde encapsulada com maltodextrina apresentou umidade de 8,86%, mais do dobro do valor encontrado em nosso estudo. Tonon, Brabet e Hubinger (2008) afirmam em seu estudo que a alimentação do equipamento *spray dryer* tem direta relação com a umidade, já que altas taxas de alimentação estão relacionadas com um menor tempo de contato da solução de entrada com o ar de secagem, portanto menos eficiente é a transferência de calor e menor a evaporação.

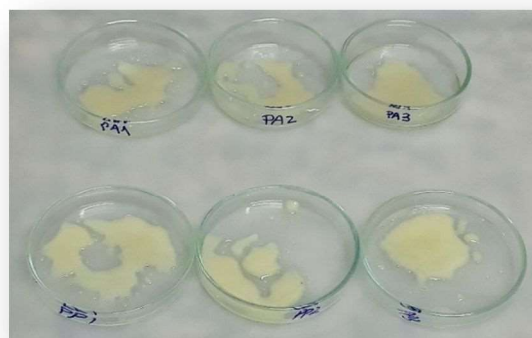
Tanto a amostra de pó de própolis verde quanto a amostra de pó de alecrim-do-campo apresentaram excelente solubilidade, com valores superiores a 90%. Jansen-Alves et al. (2018) estudando a microencapsulação de própolis utilizando diferentes proteínas como material de parede, encontraram solubilidade variando de 1,55 a 81,47%.

Tanto a solubilidade quanto a higroscopicidade são caracterizações importantes para avaliação da estabilidade dos pós visando sua aplicação (Ostroschi et al., 2018). A Figura 1 representa as imagens das micropartículas antes e depois da absorção de água durante a análise de higroscopicidade, mostrando as amostras em triplicata de pó de alecrim-do-campo na parte superior e de pó de própolis verde na parte inferior da figura.

(A)



(B)



**Figura 1.** Representação fotográfica das micropartículas de alecrim-do-campo (placas acima) e própolis verde (placas abaixo) submetidas a análise de higroscopicidade. Fonte: arquivo pessoal.

As micropartículas de alecrim-do-campo foram mais higroscópicas quando comparadas às micropartículas de própolis verde, indicando que esta primeira tem maior facilidade em absorver umidade do ambiente. Já com relação aos resultados de atividade de água ( $A_w$ ), os valores obtidos para pó de alecrim (PA) e pó de própolis (PP) foram bastante semelhantes e não foram observadas diferenças significativas. Os valores obtidos foram inferiores a 0,2 e tais dados contribuem para o estudo de *shelf life* do pó para utilização como ingrediente. Damodaran e Parkin (2017) afirmam que valores de  $A_w$  inferiores a 0,3 são desejáveis pela indústria, já que representa menos água livre para ocorrência de reações bioquímicas e multiplicação de microrganismos.

#### 4.3.1.2 Diâmetro médio e distribuição de tamanhos de partículas

No que diz respeito ao tamanho de partícula, as amostras de pó de alecrim-do-campo apresentaram diâmetro médio  $D_{4,3}$  superior ao encontrado para o pó de própolis (Tabela 3).

**Tabela 3.** Diâmetro médio e índice de polidispersidade (Span) para micropartículas obtidas de própolis verde e alecrim-do-campo.

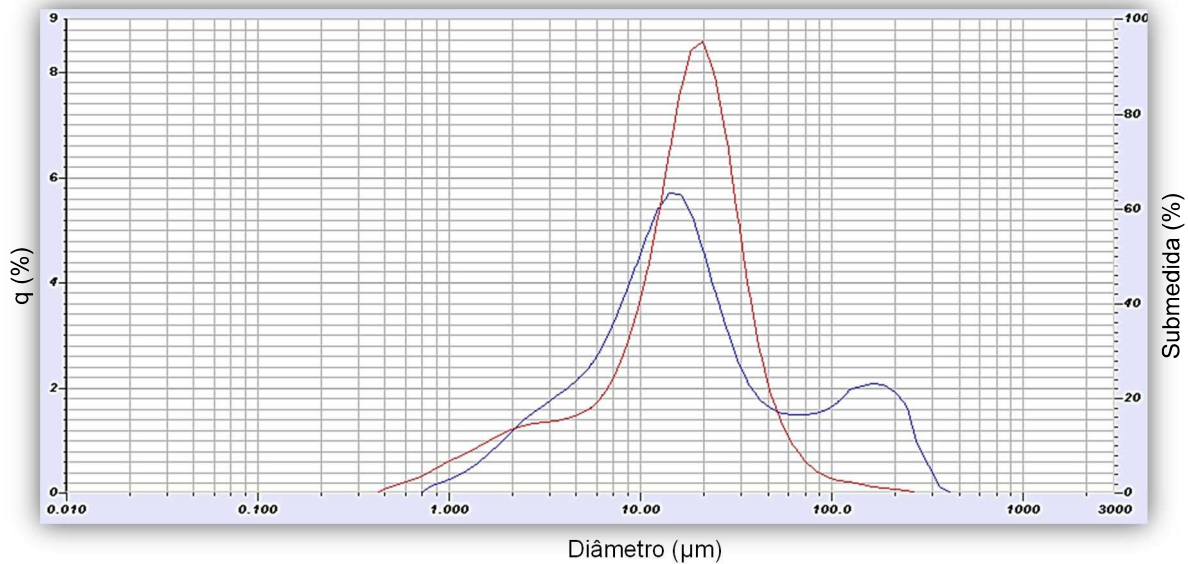
Amostras	$D_{4,3}$ ( $\mu\text{m}$ )	Span
PP	20,34 $\pm$ 0,41 <sup>a</sup>	2,01 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
PA	41,30 $\pm$ 1,60 <sup>b</sup>	8,64 $\pm$ 0,37 <sup>a</sup>

Legenda: PP = pó de própolis; PA = pó de alecrim. Letras minúsculas diferentes em cada coluna representam diferença estatisticamente significante ( $p \leq 0,05$ ).

Como pode ser observado na Tabela 3, os tamanhos de partículas obtidos para alecrim-do-campo foi de 41,30  $\mu\text{m}$  e de 20,34  $\mu\text{m}$  para a própolis verde. Ferrari et al. (2012) associaram os valores dos diâmetros médios ( $D_{4,3}$ ) das partículas (em torno de 28 e 49  $\mu\text{m}$ ) com a retenção de compostos de interesse e maior capacidade antioxidante de pós de amoras produzidos por *spray drying*. Tal fato corrobora com os dados obtidos em nosso estudo para os tamanhos de partículas obtidos para alecrim-do-campo (41,30  $\mu\text{m}$ ) e própolis verde (20,34  $\mu\text{m}$ ).

Considerando a polidispersividade avaliada pelo índice Span, verifica-se que quanto menor este índice mais homogênea será a distribuição de partículas. Assim, considera-se que o pó de própolis (PP), com menor Span, teve distribuição de tamanho de partículas mais homogênea (Figura 2). Neste sentido, Saikia, Mahnot e Mahanta (2015) também verificaram

esta tendência, observando uma distribuição menos homogênea de tamanho de partículas em pó de Carambola quando comparado a *Khasi mandarin* com valores de Span de 52,85 e 31,32, respectivamente.

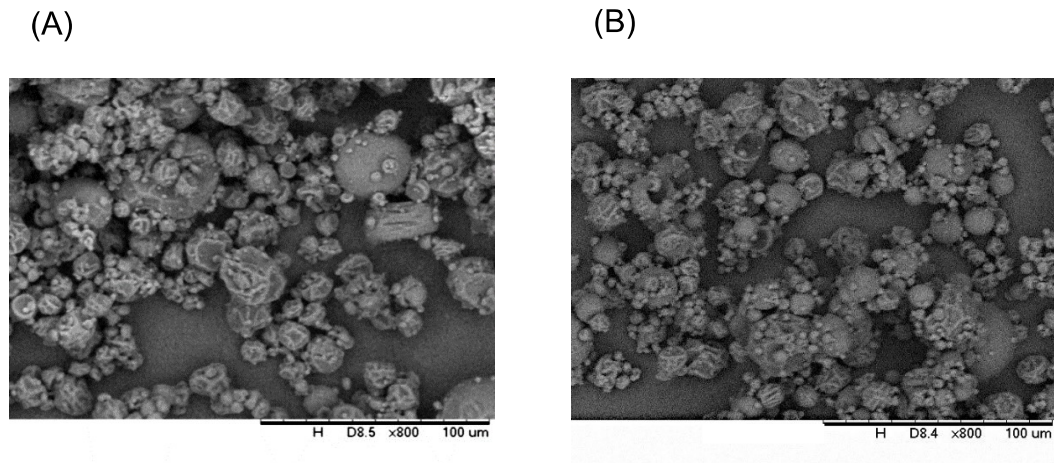


**Figura 2.** Comparação entre a distribuição de tamanho das micropartículas obtidas para PP (linha vermelha) e PA (linha azul).

Por meio da Figura 2, observa-se que a distribuição do tamanho de partículas foi diferente para as amostras de PP e PA. Ambas as amostras mostraram uma distribuição bimodal, ou seja, apresentaram dois picos distintos. A presença dos dois picos mostra que foram obtidos diferentes faixas de tamanhos de partículas. Tal conformação é importante para produtos em pó, já que as partículas menores penetram nos espaços presentes entre as partículas maiores (TONON et al., 2009).

#### 4.3.1.3 Morfologia das micropartículas

A figura 3 representa a morfologia das micropartículas obtidas por *spray drying* para própolis verde e alecrim-do-campo encapsuladas com maltodextrina 20 DE.



**Figura 3.** Micrografias de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos pós de alecrim-do-campo (A) e própolis verde (B) produzidos por spray drying.

Como pode ser observado na Figura 3, foram obtidos pós com tamanhos de partículas de tamanhos variados, predominantemente de formato esférico para ambas as amostras analisadas. É possível observar ainda que não há presença de fendas ou rachaduras verificáveis nas micropartículas obtidas. Carneiro et al. (2013) e Zhang et al. (2020) salientaram a importância da forma das micropartículas na proteção dos materiais do núcleo com compostos bioativos, sugerindo o enfraquecimento da proteção deste material e permeação de gases quando ocorre a formação de fendas e rachaduras nas micropartículas.

Apesar de não terem sido observados tais defeitos citados acima, foi verificado que algumas micropartículas exibiram superfícies enrugadas. Tonon et al. (2009) também verificaram tal fenômeno em suas micropartículas de açaí obtidas por *spray drying*. Tais autores observaram que este fato ocorreu devido a temperatura de ar de entrada utilizada no *spray dryer* (140°C), que foi bastante semelhante a temperatura de ar de entrada de 150°C utilizada em nosso estudo.

#### 4.3.1.4 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE) foi avaliada com base na relação do teor de compostos fenólicos (TPC) presentes na solução de alimentação adicionada ao equipamento de secagem e o produto em pó obtido. No caso da própolis verde a EE foi menor do que aquela obtida para o alecrim-do-campo utilizando o mesmo material de parede. De acordo com Paini et al. (2015), a eficiência de encapsulação está diretamente associada à temperatura de secagem do equipamento.

A eficiência obtida para o alecrim-do-campo foi superior a 100%. Alvim et al. (2016) observaram uma eficiência de encapsulação de 100,8% quando utilizaram o *spray drying* para

obtenção de micropartículas de ácido ascórbico. Em contraste, a eficiência obtida na encapsulação da própolis foi de 40%. Porcentagem semelhante (39,1%) foi observada na microencapsulação de Sulforafano a partir de extrato de brócolis usando maltodextrina como agente de microencapsulação (Wu et al., 2014). Já os autores Andrade et al. (2018) verificaram que a eficiência de encapsulação da própolis verde utilizando maltodextrina como material de parede foi de 78,15%. Tal diferença na EE pode ter ocorrido pela pouca liberação/alta retenção do material ativo durante a realização da análise, que pode ocorrer pela falta de estímulos físicos ou químicos responsáveis pela quebra do material, tornando os compostos livres. Ahmad et al. (2018) afirmam em seu estudo que, a encapsulação do material ativo é eficiente quando se obtém alta retenção do material do núcleo dentro do material da parede.

#### **4.3.2 Estabilidade dos compostos bioativos durante a estocagem**

A variação do teor de compostos fenólicos (TPC) e capacidade antioxidante (DPPH e FRAP) nas amostras de alecrim-do-campo e própolis verde estocadas à temperatura de 4, 25 e 40°C por um período de 6 semanas foram mostradas na Tabela 4 (A - C).

**Tabela 4.** Efeito do tempo de armazenamento e da temperatura sob o TPC e a capacidade antioxidante por DPPH e FRAP, respectivamente, para as amostras de alecrim-do-campo e própolis verde.

(A)

Amostras	TPC <sup>1</sup> 4°C					
	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
PA	0,4 ± 0,01 <sup>Cc</sup>	0,5 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	0,5 ± 0,05 <sup>Cb</sup>	0,5 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	0,5 ± 0,02 <sup>Cb</sup>	0,6 ± 0,01 <sup>Ca</sup>
EA	0,3 ± 0,01 <sup>Cc</sup>	0,4 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	0,3 ± 0,03 <sup>Cc</sup>	0,3 ± 0,01 <sup>Cc</sup>	0,3 ± 0,03 <sup>Cc</sup>	0,5 ± 0,02 <sup>Ca</sup>
PP	69,3 ± 0,80 <sup>Be</sup>	81,9 ± 0,43 <sup>Bd</sup>	72,4 ± 0,43 <sup>Be</sup>	91,7 ± 1,32 <sup>Bc</sup>	110,7 ± 0,05 <sup>Bb</sup>	148,2 ± 0,44 <sup>Ba</sup>
EP	174,6 ± 3,00 <sup>Ab</sup>	154,7 ± 0,43 <sup>Ac</sup>	161,2 ± 0,87 <sup>Ac</sup>	229,3 ± 3,08 <sup>Aa</sup>	181,7 ± 2,20 <sup>Ab</sup>	218,7 ± 1,32 <sup>Aa</sup>
Amostras	TPC <sup>1</sup> 25°C					
	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
PA	0,4 ± 0,01 <sup>Cc</sup>	0,5 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	0,5 ± 0,02 <sup>Cb</sup>	0,5 ± 0,03 <sup>Cb</sup>	0,5 ± 0,02 <sup>Cb</sup>	0,6 ± 0,05 <sup>Ca</sup>
EA	0,3 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	0,3 ± 0,02 <sup>Cb</sup>	0,3 ± 0,05 <sup>Cb</sup>	0,4 ± 0,03 <sup>Ca</sup>	0,3 ± 0,02 <sup>Cb</sup>	0,4 ± 0,01 <sup>Ca</sup>
PP	69,3 ± 0,80 <sup>Bc</sup>	75,9 ± 2,16 <sup>Bc</sup>	67,6 ± 2,60 <sup>Bc</sup>	76,3 ± 3,52 <sup>Bc</sup>	95,3 ± 0,44 <sup>Bb</sup>	122,2 ± 3,52 <sup>Ba</sup>
EP	174,6 ± 3,00 <sup>Ac</sup>	189,9 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	158,2 ± 2,16 <sup>Ae</sup>	163,2 ± 4,85 <sup>Ade</sup>	179,0 ± 0,45 <sup>Abc</sup>	352,3 ± 0,88 <sup>Aa</sup>
Amostras	TPC <sup>1</sup> 40°C					
	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
PA	0,4 ± 0,01 <sup>Cc</sup>	0,4 ± 0,01 <sup>Cc</sup>	0,5 ± 0,02 <sup>Cb</sup>	0,5 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	0,5 ± 0,03 <sup>Cb</sup>	0,6 ± 0,07 <sup>Ca</sup>
EA	0,3 ± 0,01 <sup>Cc</sup>	0,3 ± 0,02 <sup>Cc</sup>	0,3 ± 0,01 <sup>Cc</sup>	0,4 ± 0,02 <sup>Cb</sup>	0,4 ± 0,02 <sup>Cb</sup>	0,5 ± 0,03 <sup>Ca</sup>
PP	69,3 ± 0,80 <sup>Bc</sup>	69,3 ± 0,80 <sup>Bc</sup>	61,1 ± 0,40 <sup>Bd</sup>	69,2 ± 1,76 <sup>Bc</sup>	104,5 ± 0,88 <sup>Bb</sup>	123,0 ± 0,88 <sup>Ba</sup>
EP	174,6 ± 3,00 <sup>Ac</sup>	174,6 ± 3,10 <sup>Ac</sup>	228,8 ± 1,70 <sup>Aa</sup>	154,7 ± 0,01 <sup>Ad</sup>	189,1 ± 0,88 <sup>Ab</sup>	228,8 ± 0,88 <sup>Aa</sup>

(B)

Amostras	DPPH <sup>2</sup> 4°C					
	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
PA	1,7 ± 0,10 <sup>Ca</sup>	1,2 ± 0,94 <sup>Cbc</sup>	1,1 ± 0,01 <sup>Cc</sup>	1,2 ± 0,02 <sup>Cc</sup>	1,3 ± 0,01 <sup>Cbc</sup>	1,5 ± 0,01 <sup>Cab</sup>
EA	2,3 ± 0,02 <sup>Ca</sup>	2,2 ± 0,10 <sup>Cb</sup>	0,4 ± 0,01 <sup>Ce</sup>	0,7 ± 0,01 <sup>Cd</sup>	0,6 ± 0,01 <sup>Cd</sup>	1,0 ± 0,02 <sup>Cc</sup>
PP	198,3 ± 2,10 <sup>Aa</sup>	94,9 ± 0,03 <sup>Bd</sup>	100,4 ± 0,60 <sup>Bd</sup>	140,1 ± 0,31 <sup>Bc</sup>	147,2 ± 0,34 <sup>Bc</sup>	175,0 ± 4,89 <sup>Bb</sup>
EP	117,5 ± 3,79 <sup>Bd</sup>	280,2 ± 0,94 <sup>Ac</sup>	277,9 ± 2,70 <sup>Ac</sup>	419,3 ± 1,24 <sup>Aa</sup>	307,9 ± 1,02 <sup>Ab</sup>	307,7 ± 1,83 <sup>Ab</sup>
Amostras	DPPH <sup>2</sup> 25°C					
	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
PA	1,7 ± 0,10 <sup>Ca</sup>	1,5 ± 0,05 <sup>Ca</sup>	0,9 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	1,1 ± 0,03 <sup>Cb</sup>	1,1 ± 0,04 <sup>Cb</sup>	1,4 ± 0,01 <sup>Ca</sup>
EA	2,3 ± 0,02 <sup>Ca</sup>	2,2 ± 0,13 <sup>Ca</sup>	0,7 ± 0,09 <sup>Cd</sup>	1,0 ± 0,03 <sup>Cc</sup>	0,8 ± 0,01 <sup>Cc</sup>	1,2 ± 0,01 <sup>Cb</sup>
PP	198,3 ± 2,10 <sup>Aa</sup>	97,5 ± 0,51 <sup>Be</sup>	92,6 ± 0,05 <sup>Be</sup>	146,0 ± 2,48 <sup>Bb</sup>	118,7 ± 2,37 <sup>Bd</sup>	134,7 ± 2,44 <sup>Bc</sup>
EP	117,5 ± 3,79 <sup>Bf</sup>	243,2 ± 1,57 <sup>Ad</sup>	222,6 ± 2,10 <sup>Ae</sup>	395,2 ± 0,62 <sup>Aa</sup>	274,3 ± 1,36 <sup>Ac</sup>	333,7 ± 0,91 <sup>Ab</sup>
Amostras	DPPH <sup>2</sup> 40°C					
	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
PA	1,7 ± 0,10 <sup>Cb</sup>	1,1 ± 0,02 <sup>Bc</sup>	0,8 ± 0,01 <sup>Ce</sup>	1,0 ± 0,01 <sup>Cd</sup>	1,0 ± 0,02 <sup>Cd</sup>	1,3 ± 0,02 <sup>Ca</sup>
EA	2,3 ± 0,02 <sup>Ca</sup>	2,2 ± 0,09 <sup>Ba</sup>	0,7 ± 0,01 <sup>Cd</sup>	0,9 ± 0,02 <sup>Cc</sup>	0,9 ± 0,03 <sup>Cc</sup>	1,3 ± 0,02 <sup>Cb</sup>
PP	198,3 ± 2,10 <sup>Aa</sup>	100,2 ± 0,15 <sup>Ae</sup>	90,6 ± 1,50 <sup>Bf</sup>	115,6 ± 0,62 <sup>Bd</sup>	135,0 ± 0,34 <sup>Bc</sup>	149,0 ± 0,91 <sup>Bb</sup>
EP	117,5 ± 3,79 <sup>Bd</sup>	94,2 ± 2,51 <sup>Ae</sup>	269,2 ± 0,60 <sup>Ac</sup>	374,4 ± 4,03 <sup>Aa</sup>	261,8 ± 3,05 <sup>Ac</sup>	333,4 ± 1,22 <sup>Ab</sup>



(C)

Amostras	FRAP <sup>3</sup> 4°C					
	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
PA	6,0 ± 0,1 <sup>Cb</sup>	7,1 ± 0,13 <sup>Cab</sup>	8,6 ± 0,03 <sup>Ca</sup>	7,7 ± 0,33 <sup>Ca</sup>	7,6 ± 0,33 <sup>Ca</sup>	7,7 ± 0,08 <sup>Ca</sup>
EA	0,5 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	0,5 ± 0,02 <sup>Ca</sup>	0,4 ± 0,01 <sup>Cc</sup>	0,5 ± 0,01 <sup>Cab</sup>	0,5 ± 0,01 <sup>Cab</sup>	0,5 ± 0,01 <sup>Cb</sup>
PP	445,8 ± 7,50 <sup>Ba</sup>	290,6 ± 3,00 <sup>Bc</sup>	226,0 ± 3,00 <sup>Bd</sup>	313,0 ± 1,00 <sup>Bb</sup>	310,3 ± 1,00 <sup>Bbc</sup>	159,9 ± 1,00 <sup>Be</sup>
EP	542,8 ± 5,50 <sup>Ab</sup>	649,6 ± 22,00 <sup>Aa</sup>	687,5 ± 8,50 <sup>Aa</sup>	506,5 ± 4,50 <sup>Abc</sup>	503,8 ± 4,50 <sup>Abc</sup>	462,4 ± 8,50 <sup>Ac</sup>
Amostras	FRAP <sup>3</sup> 25°C					
	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
PA	6,0 ± 0,1 <sup>Cb</sup>	14,5 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	15,4 ± 0,12 <sup>Cb</sup>	7,1 ± 0,20 <sup>Ca</sup>	7,0 ± 0,20 <sup>Ca</sup>	7,1 ± 0,04 <sup>Ca</sup>
EA	0,5 ± 0,01 <sup>Cd</sup>	0,6 ± 0,01 <sup>Ca</sup>	0,6 ± 0,03 <sup>Cc</sup>	0,7 ± 0,01 <sup>Ca</sup>	0,7 ± 0,01 <sup>Ca</sup>	0,5 ± 0,03 <sup>Cd</sup>
PP	445,8 ± 7,50 <sup>Ba</sup>	327,6 ± 11,00 <sup>Bb</sup>	209,0 ± 1,00 <sup>Bd</sup>	265,0 ± 8,00 <sup>Bc</sup>	262,3 ± 8,00 <sup>Bc</sup>	144,9 ± 1,00 <sup>Be</sup>
EP	542,8 ± 5,50 <sup>Ac</sup>	659,1 ± 13,50 <sup>Aa</sup>	581,0 ± 3,00 <sup>Ab</sup>	525,0 ± 1,00 <sup>AcD</sup>	522,3 ± 0,20 <sup>AcD</sup>	495,9 ± 4,00 <sup>Ad</sup>
Amostras	FRAP <sup>3</sup> 40°C					
	0 dias	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
PA	6,0 ± 0,1 <sup>Ca</sup>	6,3 ± 0,08 <sup>Ca</sup>	17,2 ± 0,08 <sup>Ca</sup>	6,6 ± 0,35 <sup>Ca</sup>	6,9 ± 0,02 <sup>Ca</sup>	6,7 ± 0,02 <sup>Ba</sup>
EA	0,5 ± 0,01 <sup>Cd</sup>	0,7 ± 0,01 <sup>Cb</sup>	0,6 ± 0,02 <sup>Cc</sup>	0,8 ± 0,01 <sup>Ca</sup>	0,8 ± 0,01 <sup>Ca</sup>	0,6 ± 0,01 <sup>Bd</sup>
PP	445,8 ± 7,50 <sup>Ba</sup>	275,6 ± 3,00 <sup>Bb</sup>	200,0 ± 3,00 <sup>Bc</sup>	283,5 ± 2,50 <sup>Bb</sup>	280,8 ± 2,50 <sup>Bb</sup>	133,9 ± 2,00 <sup>Bd</sup>
EP	542,8 ± 5,50 <sup>Ab</sup>	650,6 ± 4,00 <sup>Aa</sup>	576,5 ± 0,50 <sup>Ab</sup>	479,5 ± 1,50 <sup>Ab</sup>	476,8 ± 1,50 <sup>Ab</sup>	498,4 ± 6,50 <sup>Ab</sup>

Legenda: PA – Pó de alecrim; EA – extrato de alecrim; PP – pó de própolis; EP – extrato de própolis. <sup>1</sup> mg GAE / g ou mL de amostra. <sup>2</sup> umol TEAC/ g ou mL amostra. <sup>3</sup> μM Sulfato Ferroso/g ou mL amostra. Os dados foram apresentados seguindo as temperaturas de refrigeração (4°C), ambiente (25°C) e aquecimento (40°C), respectivamente.

Por meio da Tabela 4, foi possível verificar que o padrão de alteração do teor de compostos fenólicos (TPC) foi bastante semelhante e correlacionado à capacidade antioxidante por FRAP ao longo do período de armazenamento nas temperaturas testadas. Isso indicou que os compostos fenólicos encontrados foram contribuintes para o aumento na capacidade antioxidante obtida para os pós e extratos das amostras analisadas.

No que diz respeito às respostas de TPC, as amostras de pó (PA) e extrato de alecrim-do-campo (EA) não mostraram diferenças significativas ao longo do tempo de armazenamento em nenhuma temperatura testada. Isso indica que a tendência de liberação dos compostos de interesse foi similar para ambas as formas (líquida e sólida). Tratando-se da própolis verde, a liberação dos compostos do extrato foi mais evidente nos últimos dois períodos de análise a temperatura ambiente (25°C).

No geral, a capacidade antioxidante obtida pelos métodos de DPPH e FRAP mostraram padrões ondulantes. O mesmo padrão foi observado por Zhang et al (2020), quando estudaram os efeitos do tempo e temperatura de estocagem sob os compostos fenólicos de pó de suco de cranberry.

Constatou-se ainda que, os pós de alecrim-do-campo (PA) e própolis verde (PP) obtidos por *spray drying*, tiveram comportamento similar na liberação de compostos fenólicos nas três temperaturas testadas. Tal fato indica que a liberação foi eficiente em todas as temperaturas analisadas, não sendo necessário o armazenamento obrigatório em temperaturas de refrigeração (4°C) e comprovando que se as amostras forem submetidas a altas temperaturas como a de 40°C durante a estocagem, processamento e transporte, as

mesmas suportam essas condições e não liberam os compostos de interesse rapidamente. Este comportamento de estabilidade térmica é esperado para ingredientes e aditivos alimentares como os antioxidantes, já que mudanças de temperaturas podem ocorrer até o momento de aplicação do ingrediente no produto final, podendo provocar imediata liberação dos compostos pelo estímulo da temperatura. Em contraste ao que foi encontrado em nosso trabalho, estudos realizados com *berries* afirmam que os compostos fenólicos dos pós diminuem com o aumento da temperatura de estocagem (Fang e Bhandari, 2011; Zhang et al., 2020).

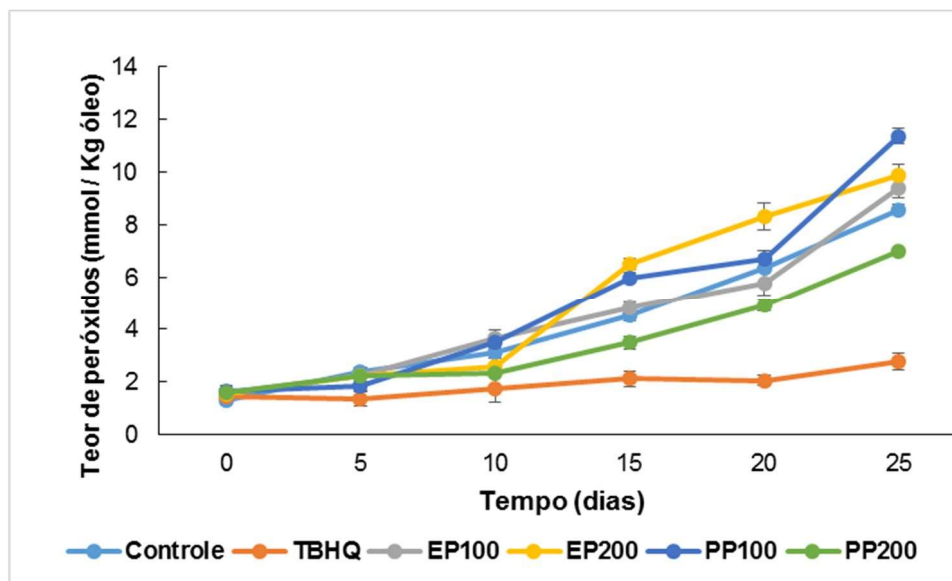
No caso das amostras de alecrim-do-campo, o extrato microencapsulado mostrou uma capacidade antioxidante ligeiramente maior quando comparado ao extrato líquido em todas as temperaturas estudadas (4, 25 e 40°C). O mesmo foi observado por Ahmad-Qasem et al. (2016), que compararam a estabilidade dos polifenóis encontrados no extrato líquido e em pó de folhas de oliveira durante o armazenamento, especialmente em 4 e 25°C.

Constatou-se, portanto, que, ao final das 6 semanas de armazenamento, as amostras de alecrim-do-campo e própolis verde comprovaram a eficiência da metodologia de encapsulação adotada, sendo satisfatórias quanto à liberação controlada dos compostos fenólicos e estabilidade térmica. Entretanto, como a capacidade antioxidante do alecrim-do-campo foi baixa quando comparada à própolis verde, utilizou-se amostras a base de própolis para a realização dos testes de estabilidade oxidativa.

### **4.3.3 Estabilidade oxidativa de extratos livres e microencapsulados de própolis verde**

#### **4.3.3.1 Teor de hidroperóxidos**

O teor de hidroperóxidos ou PV (*Peroxide Value*) é um fator importante a ser estudado já que reflete dados do estágio primário de oxidação lipídica por meio de resultados de peróxidos e hidroperóxidos (ALIZADEH, NAYEBZADEH e MOHAMMADI, 2016). Sua análise é imprescindível quando se objetiva verificar a eficácia de um antioxidante aplicado em emulsões do tipo óleo em água (O/A). A evolução desses produtos primários da oxidação em emulsões adicionadas de própolis verde (extrato e pó) e TBHQ pode ser observada na Figura 4.



**Figura 4.** Efeito do tempo sob o teor de hidroperóxidos de emulsões adicionadas de própolis verde e TBHQ.

Legenda: EP – emulsão com extrato de própolis verde; PP – emulsão adicionada de pó de própolis verde. Os números que seguem as siglas das amostras referem-se a concentração de 100 e 200 ppm utilizados dos antioxidantes referentes.

Por meio da Figura 4 é possível verificar que o teor de hidroperóxidos aumentou com o tempo em todas as emulsões O/A, com exceção do TBHQ que teve comportamento flutuante. Em todas as emulsões estudadas foi verificado que, os dois primeiros períodos de análise (0 e 5 dias) não se diferiram entre si ( $p > 0,05$ ), mas a partir do décimo dia uma evolução nos produtos primários da oxidação (peróxidos) foi observada nas amostras.

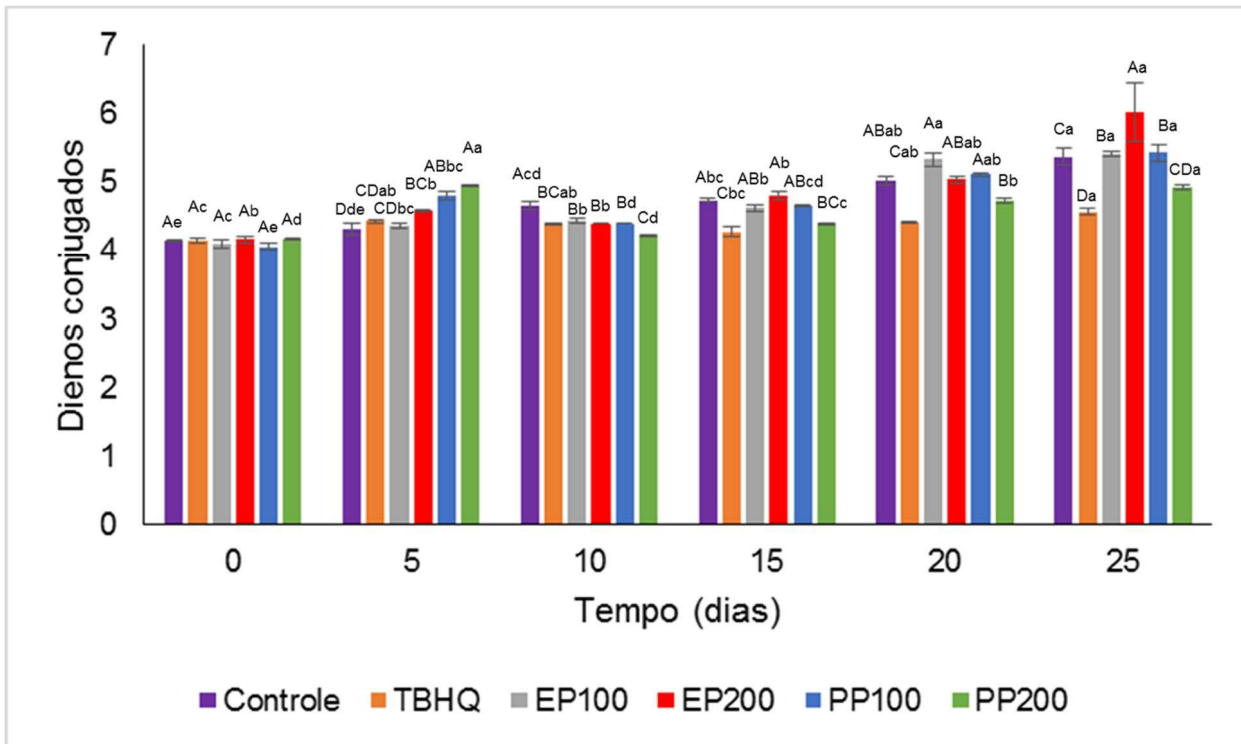
Até o décimo quinto dia de análise as amostras de TBHQ e PP200 não se diferiram entre si ( $p > 0,05$ ), isso significa que a amostra de pó de própolis verde a 200 ppm conseguiu ser eficiente igualmente ao antioxidante sintético até esse momento. El-Guendouz et al. (2018) verificaram em seu estudo que o extrato de própolis utilizado em diferentes concentrações (0,01%; 0,02% e 0,04%) teve efeito protetor semelhante ao antioxidante sintético 2-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA) quando aplicados em emulsões O/A. É importante salientar que muitas vezes é necessário utilizar concentrações maiores do antioxidante natural para conseguir eficiência similar ao sintético durante os períodos de tempo testados. Tal fato foi observado por Ammar (2016), quando comparou a eficiência de 200 ppm de TBHQ e 2500 ppm do extrato de alecrim sob a oxidação de oleína de palma, utilizando concentrações superiores do antioxidante natural. Utilizamos em nosso estudo 200 ppm de concentração máxima do antioxidante natural para seguirmos e compararmos com o que a legislação preconiza para os antioxidantes sintéticos permitidos, como o TBHQ (BRASIL, 2005). A partir deste dado pudemos compreender que mais estudos podem ser realizados com base na utilização de superconcentrações de micropartículas de própolis verde para aplicação em emulsões alimentícias.

O pó de própolis verde (PP) evitou a formação de peróxidos nas emulsões O/A, porém isso foi dependente de sua concentração. A concentração de 100 ppm da própolis verde utilizada como antioxidante natural foi significativamente igual para ambas as formas de extrato e pó utilizadas (EP100 e PP100) até o vigésimo quinto dia de análise. No entanto, para a concentração de 200 ppm, as amostras de extrato e pó de própolis verde (EP200 e PP200) foram significativamente diferentes a partir do décimo quinto dia. A utilização da própolis verde em pó a 200 ppm (PP200) exemplificou a importância da microencapsulação por *spray drying*, já que é possível verificar menores taxas de oxidação em comparação às outras amostras. Isso pode ter ocorrido pela liberação contínua dos compostos ativos encapsulados, o que é desejável para utilização como aditivo. Tais resultados estão de acordo com Mohammadi et al. (2016), que mostraram que a encapsulação do extrato de folha de oliveira pode controlar o valor de peróxido melhor do que seu extrato durante o armazenamento de óleo de soja.

As amostras com EP100, EP200, PP100 apresentaram ao final do período de análise (25 dias) PV superior ao controle, indicando que pode ter ocorrido um efeito pró-oxidante. Observando os resultados de liberação dos compostos antioxidantes ao longo do tempo na sessão 4.3.2, verificou-se que o extrato de própolis verde possuía capacidade antioxidante e TPC superior ao pó. Portanto, esperava-se que no estudo estabilidade oxidativa (sessão 4.3.3) o extrato desempenhasse melhor papel de proteção da formação de produtos da oxidação como os hidroperóxidos. A eficiência da microencapsulação foi então comprovada, pois o TPC liberado gradativamente foi mais eficaz do que a alta liberação provocada pelo extrato da própolis e isso permitiu que a amostra agisse como antioxidante e não como pró-oxidante. Vaisali, Belur e Regupathi (2016) observaram resultados semelhantes quando constataram que a catequina como antioxidante mostrou efeito pró-oxidante na formação de peróxidos, apesar de ter apresentado alta atividade sequestrante.

#### **4.3.3.2 Dienos e trienos conjugados**

Assim como os valores de peróxido, os dados de dienos e trienos conjugados também são considerados bons parâmetros para verificação da estabilidade oxidativa de óleos e produtos oleosos (Mohdaly et al., 2011). Os resultados obtidos para dienos podem ser observados na Figura 5.



**Figura 5.** Determinação de Dienos conjugados (DC) presentes em emulsões adicionadas de antioxidantes ao longo de 25 dias.

Legenda: Os valores fornecidos são a média de três repetições e as barras de erro mostram as variações de três determinações em termos de desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento ( $p < 0,05$ ).

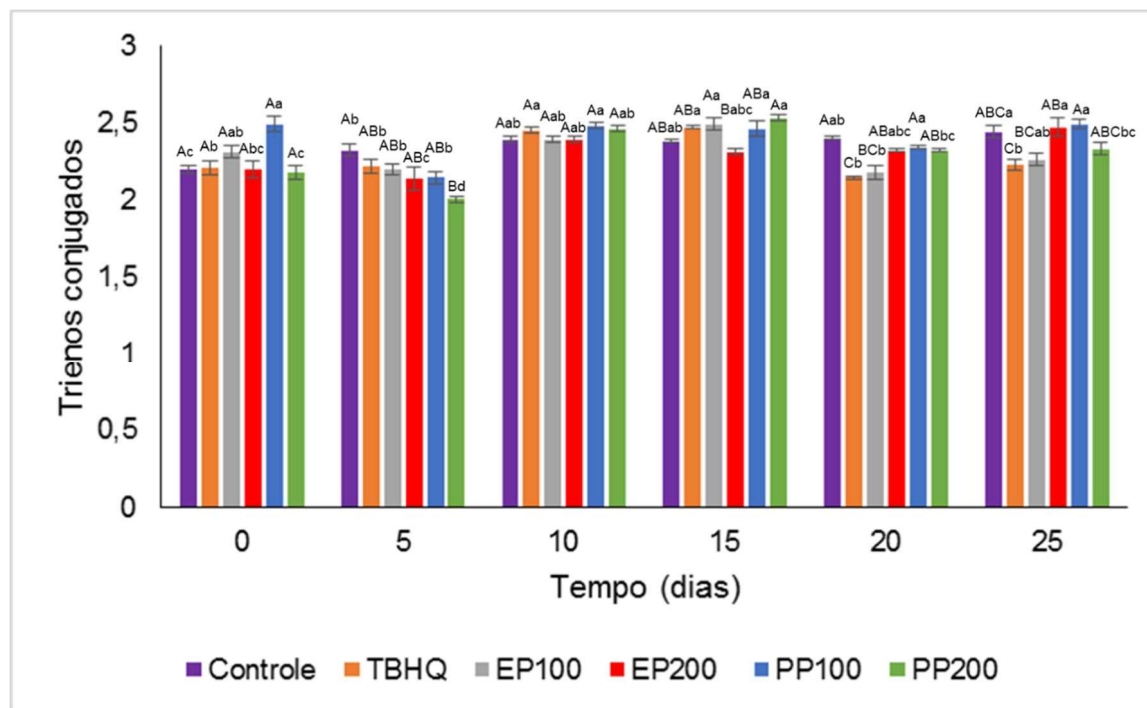
Assim como esperado, os valores obtidos de DC para as emulsões com antioxidantes apresentaram a mesma tendência de resultados daqueles obtidos para peróxido. O mesmo foi observado por Dordoni, Cantaboni e Spigno (2019) em seu estudo de avaliação da estabilidade oxidativa de pasta de nozes adicionada de extrato de uva encapsulado como agente antioxidante.

Os dienos conjugados apresentaram uma tendência de aumento em todas as amostras ao longo dos dias de teste. As emulsões com EP100, EP200 e PP100 tiveram resultado de DC superior ao que foi encontrado na amostra controle ao fim dos 25 dias, assim como o que foi observado na análise de teor de peróxidos. Em contrapartida, as amostras contendo TBHQ e PP200 foram aquelas que apresentaram menor aumento de dienos ao longo dos dias com valores de 4,58 e 4,93 ao final dos 25 dias, respectivamente. Por isso, constatou-se que a amostra que continha PP200 foi a amostra que teria melhor capacidade em substituir o antioxidante sintético TBHQ, ambas estatisticamente iguais ( $p > 0,05$ ) ao final dos 25 dias de análise. Delfanian, Delfanian e Sahari (2015) também identificaram

perspectivas de substituição do TBHQ por casca de nespeira como antioxidante quando avaliaram o teor de dienos conjugados em óleo de soja armazenado por 60 dias, já que a casca da fruta manteve-se estatisticamente igual ao antioxidante sintético ao final dos dias de armazenamento.

Enquanto os valores de DC aumentaram para a maioria das amostras testadas ao longo dos dias, os teores de trienos conjugados (TC) flutuaram ao longo dos 25 dias (Figura 6). O mesmo foi observado por Baştürk et al. (2018) em seu estudo de avaliação da estabilidade oxidativa de óleo de milho adicionado de antioxidantes comumente empregados na indústria de alimentos.

Verificou-se em nosso estudo que os valores de DC foram consideravelmente superiores aos encontrados para TC. Delfanian, Kenari e Sahari (2016) encontraram em seu estudo esta mesma tendência e justificaram este aumento dos dienos conjugados em comparação com os trienos conjugados devido ao alto teor de ácido linoleico presente no óleo de soja. Como foi utilizado óleo de soja para realização das emulsões e este possui alta concentração desses ácidos graxos insaturados, a maior concentração de DC em relação ao TC também ocorreu em nosso estudo. Liu e White (1992) confirmaram em seu estudo que o grau de instauração do óleo está diretamente relacionado com a quantidade de DC e TC formados.



**Figura 6.** Determinação de Trienos conjugados (TC) presentes em emulsões adicionadas de antioxidantes ao longo de 25 dias.

Legenda: Os valores fornecidos são a média de três repetições e as barras de erro mostram as variações de três determinações em termos de desvio padrão. Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre as amostras ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os tempos de armazenamento ( $p < 0,05$ ).

Por meio da Figura 6 podemos verificar que a emulsão com pó de própolis a 200 ppm (PP200) apresentou o menor teor de trienos conjugados quando comparada com as outras amostras, sendo a única amostra comparável e significativamente igual ( $p > 0,05$ ) à emulsão com o controle positivo (TBHQ) na grande maioria dos dias de análises.

Ao final dos 25 dias de análise, a amostra sem antioxidante (Controle) apresentou resultado significativamente igual ( $p > 0,05$ ) às emulsões com EP100, EP200 e PP100. Isso nos indica que não houve um aumento expressivo de TC ao longo dos dias testados. Poucas alterações nos valores de TC também foram observadas por Ozdemir et al. (2018) quando avaliaram o efeito do óleo de cominho preto como antioxidante natural. Essa baixa alteração no teor de TC pode estar associada à substituição de posições de ligação dupla de lipídios contendo dienos ou polienos durante a oxidação (Chirinos et al., 2015).

#### 4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso da técnica de microencapsulação por *spray drying* foi eficiente para proteger e liberar de maneira gradual os compostos bioativos de interesse da própolis verde e do alecrim-do-campo. No caso do alecrim-do-campo, os compostos fenólicos encontrados no pó foram superiores aos encontrados no extrato de alimentação, fazendo com que seu uso em pó seja mais vantajoso. Entretanto, como esses compostos ainda foram inferiores aos encontrados na própolis verde, optou-se por prosseguir as análises com a própolis verde. A própolis por sua vez, quando utilizada na concentração de 200 ppm, teve desempenho compatível ao antioxidante sintético TBHQ. Portanto, o uso da própolis verde em pó pode ser uma alternativa cabível de substituição dos antioxidantes sintéticos como o TBHQ na indústria de alimentos, pois foi eficiente no controle de produtos da oxidação lipídica. Mais estudos são necessários com o foco de verificar a eficácia do alecrim-do-campo em concentrações maiores para que possa ser utilizado como antioxidante natural em alimentos.



## REFERÊNCIAS

- Ahmad, M., Ashraf, B., Gani, A., & Gani, A. (2018). Microencapsulation of saffron anthocyanins using  $\beta$  glucan and  $\beta$  cyclodextrin: Microcapsule characterization, release behaviour & antioxidant potential during in-vitro digestion. *International journal of biological macromolecules*, 109, 435-442.
- Ahmad-Qasem, M. H., Ahmad-Qasem, B. H., Barrajón-Catalán, E., Micol, V., Cárcel, J. A., & García-Pérez, J. V. (2016). Drying and storage of olive leaf extracts. Influence on polyphenols stability. *Industrial Crops and Products*, 79, 232-239.
- Alizadeh, L., Nayebzadeh, K., & Mohammadi, A. (2016). A comparative study on the in vitro antioxidant activity of tocopherol and extracts from rosemary and *Ferulago angulata* on oil oxidation during deep frying of potato slices. *Journal of food science and technology*, 53(1), 611-620.
- Alvim, I. D., Stein, M. A., Koury, I. P., Dantas, F. B. H., & Cruz, C. L. D. C. V. (2016). Comparison between the spray drying and spray chilling microparticles contain ascorbic acid in a baked product application. *LWT-food science and technology*, 65, 689-694.
- Ammar, M. S. (2016). A comparative study on the antioxidant activity of tbhq and extracts from rosemary and oregano on oxidative stability of palm olein during deep fat frying of beef meatballs. *Middle East Journal of Applied Sciences*, 6(4), 671-681.
- Andrade, J. K. S., Denadai, M., Andrade, G. R. S., da Cunha Nascimento, C., Barbosa, P. F., Jesus, M. S., & Narain, N. (2018). Development and characterization of microencapsules containing spray dried powder obtained from Brazilian brown, green and red propolis. *Food research international*, 109, 278-287.
- AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 6th ed. Champaign, 2009. 1278.
- Ares, G., Barreiro, C., Deliza, R. & Gámbaro, A. (2009). Alternatives to reduce the bitterness, astringency and characteristic flavour of antioxidant extracts. *Food Research International*, 42 (7), 871-878.
- Augusto-Obara, T. R., Oliveira, J. D., Gloria, E. M. D., Spoto, M. H. F., Godoy, K., Vieira, T. M. F. D. S., & Scheuermann, E. (2019). Benefits of superfine grinding method on antioxidant and antifungal characteristic of Brazilian green propolis extract. *Scientia Agricola*, 76(5), 398-404.

- Baştürk, A., Ceylan, M. M., Çavuş, M., Boran, G., & Javidipour, I. (2018). Effects of some herbal extracts on oxidative stability of corn oil under accelerated oxidation conditions in comparison with some commonly used antioxidants. *LWT*, 89, 358-364.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC N° 23, de 15 de fevereiro de 2005. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 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, 2005.
- Bruttel, P., & Schlink, R. (2003). Water determination by Karl Fischer titration. Metrohm monograph, 8(026), 50003.
- Cai, Y. Z., & Corke, H. (2000). Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *Journal of food science*, 65(7), 1248-1252.
- Carneiro, H.C.F., Tonon, R.V., Grosso, C.R.F., Hubinger, M.D., 2013. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *J. Food Eng.* 115 (4), 443–451.
- Cavalaro, R. I., da Cruz, R. G., Dupont, S., de Moura, J. M. L. N., & Vieira, T. M. F. S. (2019). In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction. *Food chemistry: X*, 4, 100054.
- Chaiyasit, W., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2005). The relationship between the physicochemical properties of antioxidants and their ability to inhibit lipid oxidation in bulk oil and oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(12), 4982-4988.
- Chirinos, R., Pedreschi, R., Cedano, I., & Campos, D. (2015). Antioxidants from Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) Control Lipid Oxidation in Sacha Inchi (*P. lukukenetia volubilis* L.) Oil and Raw Ground Pork Meat. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39(6), 2612-2619.
- Damodaran, S., Parkin, K.L., 2017. *Fennema's Food Chemistry*. CRC press.
- Delfanian, M., Esmailzadeh Kenari, R., & Sahari, M. A. (2016). Oxidative Stability of Refined Soybean Oil Enriched with Loquat Fruit (*Eriobotrya japonica* L. indl.) Skin and Pulp Extracts. *Journal of Food Processing and Preservation*, 40(3), 386-395.

- Delfanian, M., Kenari, R. E., & Sahari, M. A. (2015). Antioxidant activity of loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) fruit peel and pulp extracts in stabilization of soybean oil during storage conditions. *International Journal of Food Properties*, 18(12), 2813-2824.
- Dordoni, R., Cantaboni, S., & Spigno, G. (2019). Walnut paste: oxidative stability and effect of grape skin extract addition. *Heliyon*, 5(9), e02506.
- El-Guendouz, S., Aazza, S., Lyoussi, B., Majdoub, N., Bankova, V., Popova, M., ... & Miguel, M. G. (2018). Effect of poplar-type propolis on oxidative stability and rheological properties of O/W emulsions. *Saudi pharmaceutical journal*, 26(8), 1073-1082.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2011). Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food chemistry*, 129(3), 1139-1147.
- Ferrari, C. C., Germer, S. P. M., Alvim, I. D., Vissotto, F. Z., & de Aguirre, J. M. (2012). Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(6), 1237-1245.
- Gomes, V., & Fernandes, G. W. (2002). Germination of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) achene. *Acta Botanica Brasílica*, 16(4), 421-427.
- Gironi, F., & Piemonte, V. (2011). Temperature and solvent effects on polyphenol extraction process from chestnut tree wood. *Chemical Engineering Research and Design*, 89(7), 857-862.
- Guimarães, N. S., Mello, J. C., Paiva, J. S., Bueno, P. C., Berretta, A. A., Torquato, R. J. & Rodrigues, T. (2012). *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4), 1091-1097.
- Huang, S. W., Hopia, A., Schwarz, K., Frankel, E. N., & German, J. B. (1996). Antioxidant activity of  $\alpha$ -tocopherol and trolox in different lipid substrates: bulk oils vs oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(2), 444-452.
- Jansen-Alves, C., Fernandes, K. F., Crizel-Cardozo, M. M., Krumreich, F. D., Borges, C. D., & Zambiasi, R. C. (2018). Microencapsulation of propolis in protein matrix using spray drying for application in food systems. *Food and bioprocess technology*, 11(7), 1422-1436.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and bioprocess processing*, 89(3), 217-233.

- Liu, H. R., & White, P. J. (1992). Oxidative stability of soybean oils with altered fatty acid compositions. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69(6), 528-532.
- Mohammadi, A., Jafari, S. M., Esfanjani, A. F., & Akhavan, S. (2016). Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food chemistry*, 190, 513-519.
- Mohd Nawi, N., Muhamad, I. I., & Mohd Marsin, A. (2015). The physicochemical properties of microwave-assisted encapsulated anthocyanins from Ipomoea batatas as affected by different wall materials. *Food science & nutrition*, 3(2), 91-99.
- Mohdaly, A. A., Smetanska, I., Ramadan, M. F., Sarhan, M. A., & Mahmoud, A. (2011). Antioxidant potential of sesame (*Sesamum indicum*) cake extract in stabilization of sunflower and soybean oils. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 952-959.
- Okuro, P. K., Thomazini, M., Balieiro, J. C., Liberal, R. D., & Fávaro-Trindade, C. S. (2013). Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. *Food Research International*, 53(1), 96-103.
- Ostroschi, L. C., de Souza, V. B., Echalar-Barrientos, M. A., Tulini, F. L., Comunian, T. A., Thomazini, M., ... & Favaro-Trindade, C. S. (2018). Production of spray-dried proanthocyanidin-rich cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) extract as a potential functional ingredient: Improvement of stability, sensory aspects and technological properties. *Food Hydrocolloids*, 79, 343-351
- Paini, M., Aliakbarian, B., Casazza, A. A., Lagazzo, A., Botter, R., & Perego, P. (2015). Microencapsulation of phenolic compounds from olive pomace using spray drying: A study of operative parameters. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 177-186.
- Park, Y. K., Paredes-Guzman, J. F., Aguiar, C. L., Alencar, S. M., & Fujiwara, F. Y. (2004). Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(5), 1100-1103.
- Reis, A. S., Diedrich, C., de Moura, C., Pereira, D., de Flório Almeida, J., da Silva, L. D., ... & Carpes, S. T. (2017). Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at- 15° C. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 306-313.
- Saikia, S., Mahnot, N. K., & Mahanta, C. L. (2015). Effect of spray drying of four fruit juices on physicochemical, phytochemical and antioxidant properties. *Journal of food processing and preservation*, 39(6), 1656-1664.

- Shantha, N. C., & Decker, E. A. (1994). Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. *Journal of AOAC International*, 77(2), 421-424.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods in enzymology*, 299, 152-178.
- Sousa, J. P. B., Leite, M. F., Jorge, R. F., Resende, D. O., da Silva Filho, A. A., Furtado, N. A., ... & Bastos, J. K. (2011). Seasonality role on the phenolics from cultivated *Baccharis dracunculifolia*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011.
- Spinelli, S., Conte, A., Lecce, L., Incoronato, A. L., & Del Nobile, M. A. (2015). Microencapsulated propolis to enhance the antioxidant properties of fresh fish burgers. *Journal of Food Process Engineering*, 38(6), 527-535.
- Taghvaei, M., & Jafari, S. M. (2015). Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *Journal of food science and technology*, 52(3), 1272-1282.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., & Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of food composition and analysis*, 19(6-7), 669-675.
- Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. *Journal of food engineering*, 88(3), 411-418.
- Tonon, R. V., Brabet, C., Pallet, D., Brat, P., & Hubinger, M. D. (2009). Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *International Journal of Food Science & Technology*, 44(10), 1950-1958.
- Vaisali, C., Belur, P. D., & Regupathi, I. (2016). Comparison of antioxidant properties of phenolic compounds and their effectiveness in imparting oxidative stability to sardine oil during storage. *LWT-Food Science and Technology*, 69, 153-160.
- Veiga, R. S., De Mendonça, S., Mendes, P. B., Paulino, N., Mimica, M. J., Lagareiro Netto, A. A., ... & Marcucci, M. C. (2017). Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. *Journal of Applied Microbiology*, 122(4), 911-920.

- Wilkowska, A., Ambroziak, W., Adamiec, J., & Czyżowska, A. (2017). Preservation of antioxidant activity and polyphenols in chokeberry juice and wine with the use of microencapsulation. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(3), e12924.
- Wu, Y., Zou, L., Mao, J., Huang, J., & Liu, S. (2014). Stability and encapsulation efficiency of sulforaphane microencapsulated by spray drying. *Carbohydrate polymers*, 102, 497-503.
- Zhang, J., Zhang, C., Chen, X., & Quek, S. Y. (2020). Effect of spray drying on phenolic compounds of cranberry juice and their stability during storage. *Journal of Food Engineering*, 269, 109744.
- Zokti, J. A., Sham Baharin, B., Mohammed, A. S., & Abas, F. (2016). Green tea leaves extract: Microencapsulation, physicochemical and storage stability study. *Molecules*, 21(8), 940.



## 5. POTENCIAL DA ADIÇÃO DE ALECRIM-DO-CAMPO E PRÓPOLIS VERDE COMO ANTIOXIDANTES NATURAIS SOB O PERFIL SENSORIAL DE CONSUMIDORES DE MAIONESE

### RESUMO

A utilização de antioxidantes naturais em alimentos ricos em óleos e gorduras, como a maionese, pode contribuir para o controle da velocidade da oxidação lipídica. Além disso, podem substituir os antioxidantes sintéticos, indo de encontro com demandas recentes dos consumidores de alimentos. No entanto, a aplicação de antioxidantes naturais pode ser dificultada devido ao aroma presente e por isso sua microencapsulação pode ser uma alternativa desejável. O estudo das micropartículas deve estar associado à análise sensorial para compreensão das percepções dos consumidores finais. O objetivo deste estudo foi verificar quais foram os direcionadores de preferência de maioneses adicionadas de antioxidantes naturais de alecrim-do-campo e própolis verde em forma de extrato e micropartículas. Utilizou-se a metodologia *Check-all-that-apply* (CATA) para avaliar as características de aroma, textura e aparência que mais repercutiram sobre o perfil sensorial de maioneses adicionadas de alecrim-do-campo e própolis verde. Os resultados confirmam que o perfil de amostra ideal de maionese se distancia de atributos como aguado e amarelado. Os atributos própolis, amadeirado, aroma de maionese e fresco foram direcionadores e contribuíram para aumentar a aceitação das amostras de maionese. Além disso, os consumidores conseguiram perceber diferenças de atributos nas amostras que continham própolis verde daquelas com alecrim-do-campo. Assim, a utilização dos antioxidantes mostrou-se promissora e pode ser uma alternativa eficiente de substituição dos antioxidantes sintéticos utilizados em maioneses pela indústria de alimentos.

Palavras-chave: Sensorial; *Check-all-that-apply*; Microencapsulação; Própolis verde; Alecrim-do-campo



## ABSTRACT

The use of natural antioxidants in high oil and fat rich foods, such as mayonnaise, can contribute to the reduction of the rate of lipid oxidation. In addition, they can replace synthetic antioxidants, in accordance with recent demands from food consumers. However, the application of natural antioxidants may be restricted due to the presence of aroma. Therefore, their micro-encapsulation may be a desirable option. The study of micro-particles must be associated with sensory analysis to understand the consumer perceptions. The objective of this study was to verify the drivers of preference of mayonnaises with natural antioxidants of rosemary-of-the-field and green propolis in the form of extract and micro-particles. The Check-all-that-apply (CATA) methodology was used to evaluate the characteristics of aroma, texture and appearance that most influenced the sensory profile of mayonnaises with rosemary-of-the-field and green propolis. The results confirm that the ideal mayonnaise sample profile distances itself from attributes such as watery and yellowish. The attributes propolis, woody, mayonnaise aroma and fresh were driving and played a role in increasing the acceptance of the mayonnaise samples. In addition, consumers were able to perceive attribute differences in the samples containing green propolis from those with rosemary-of-field. Hence, the employed antioxidants showed to be promising and could be an efficient replacement for the synthetic antioxidants in mayonnaise by the food industry.

Keywords: Sensory; Check-all-that-apply; Microencapsulation; Green propolis; Rosemary-of-field

## 5.1 INTRODUÇÃO

A oxidação lipídica é uma reação que ocorre em alimentos ricos em óleos e gorduras e provoca odores desagradáveis e sabores rançosos, além de perda na qualidade nutricional do produto final (TAGHVAEI e JAFARI, 2015). Para enfrentar o problema da oxidação lipídica diferentes estratégias são utilizadas, como a eliminação dos fatores que favorecem a reação ou até mesmo a adição de antioxidantes (GORJI et al., 2016).

O uso de antioxidantes sintéticos sofre entraves na sua aplicação devido às impressões negativas que causam em altas concentrações, sendo associados a efeitos tóxicos e carcinogênicos (MARTINEZ-TOME et al., 2001). Além disso, existe uma tendência crescente de preferência dos consumidores com relação a adição de ingredientes e aditivos naturais em substituição aos sintéticos em alimentos (HILLMANN, 2010 e JOPPEN, 2006).

A incorporação de antioxidantes naturais tem um grande potencial para melhorar a estabilidade oxidativa de alimentos (GORJI et al., 2016) e sua aplicação tem sido estudada em diversos tipos de alimentos, como a maionese.

A maionese tradicional é uma emulsão alimentícia do tipo óleo em água (O/A), feita a partir de uma mistura de óleo vegetal, gema de ovo e vinagre (OZDEMIR et al., 2018) e em alguns casos a água também é utilizada. Seu alto teor de gordura de 70 a 80% a classifica como maionese *full-fat*, tornando-a bastante susceptível a oxidação lipídica devido ao caráter insaturado dos óleos vegetais geralmente utilizados (soja, canola, girassol e milho) (CHATTERJEE e BHATTACHARJEE, 2015; RAIKOS et al., 2016).

Na maionese, o antioxidante sintético comumente utilizado é o ácido etilenodiamino tetra-acético ou *ethylene diamine tetraacetic acid* (EDTA) (RAIKOS et al., 2016). Os estudos de aplicação de antioxidantes naturais em maioneses são relativamente recentes e já foram desenvolvidos utilizando extrato de chá verde, gengibre e extrato de semente de uva, por exemplo (GORJI et al., 2019; SAFITRI, EVANUARINI e THOHARI, 2019; ALTUNKAYA et al., 2013).

Em sua maioria, a proteção contra a oxidação dada pelos antioxidantes naturais ocorre por meio de compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas (BAIANO e NOBILE, 2016). Santiago-Adame et al. (2015) afirmaram que, os compostos fenólicos são sensíveis a condições ambientais como radiação UV, temperatura, digestão, oxigênio, dentre outros. Por isso, perdem sua potencialidade contra a oxidação mais facilmente e assim é necessário o uso de tecnologias acessórias para facilitar sua aplicação em alimentos.

A tecnologia de microencapsulação por *spray drying* contribui para evitar rigorosos efeitos das condições externas sobre os compostos bioativos, favorecendo também maior estabilidade ao material encapsulado (CARNEIRO et al., 2013). Além disso, facilita a aplicação desses compostos, que no geral podem ter aroma e sabor desagradáveis quando

ingeridos em quantidades necessárias para fornecer atividade biológica suficiente (BENNICK, 2002; OSTROSCHI et al., 2018) para utilização como ingrediente.

No caso da própolis verde e sua principal fonte botânica alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*), existe uma dificuldade de aplicação de seus extratos devido ao seu forte aroma e sabor. Estudos de aplicação de micropartículas de própolis verde em hambúrguer de carne e salame italiano constataram que o produto final foi considerado inaceitável pelos consumidores quando utilizadas tais micropartículas em determinadas concentrações testadas (BERNARDI et al., 2013; REIS et al., 2017). Tais dados exemplificam que mais estudos são necessários para microencapsular de forma eficiente matérias-primas como estas, que contenham potencial de capacidade antioxidante e forte aroma que dificultam seu uso como aditivo alimentar. Assim, outro campo de importante investigação relaciona-se às técnicas que avaliam o efeito das propriedades sensoriais dessa planta e da própolis verde nos alimentos.

Sabe-se que os métodos descritivos, especificamente a Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), são técnicas que avaliam as propriedades sensoriais de forma eficiente no que se diz respeito a determinação de descritores de alimentos (STONE, BLEIBAUM e THOMAS, 2012). No entanto, demandam extenso treinamento dos provadores, é um processo caro e trabalhoso e por isso vêm sendo substituídos aos poucos (AGUIAR, MELO e OLIVEIRA, 2019; AGUIAR et al., 2020). Por isso, a utilização de novas metodologias de avaliação sensorial de alimentos baseadas na percepção de consumidores tem se tornado popular na indústria, já que contribui para o desenvolvimento de produtos que atendam as expectativas do público alvo (ARES, 2015; VAN KLEEF, VAN TRIJP e LUNING, 2005). Dentre tais metodologias, está o método *Check-all-that-apply* (CATA), que consiste em uma ficha com atributos que podem descrever as amostras analisadas, sendo possível que cada provador selecione quantos descritores julgar necessário (ARES et al., 2014). Dooley, Lee e Meullenet (2010) afirmam em seu estudo que, os dados gerados pelo método CATA estão em concordância com aqueles obtidos pelo método descritivo realizado utilizando consumidores. Lancaster e Foley (2007) afirmaram que a metodologia CATA basicamente é considerada uma técnica rápida, fácil e confiável para coleta de dados de consumidores.

Neste sentido, o objetivo do trabalho foi verificar quais foram os direcionadores de preferência de maioneses adicionadas de antioxidantes naturais de alecrim-do-campo e própolis verde em forma de extratos e micropartículas por meio da utilização da metodologia *Check-all-that-apply* (CATA).

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Obtenção e preparo dos extratos antioxidantes

As amostras de própolis verde e botões florais de alecrim-do-campo foram cedidas pela empresa Natucentro Indústria e Apiários Centro Oeste Ltda. (19°59'46"S,45°48'38"W) (Bambuí, Minas Gerais, Brasil) e coletadas no período de floração da planta (março / 2018). Foi feita uma limpeza visual para retirada de galhos e folhas excedentes, e posteriormente, armazenou-se as amostras em congelador  $-18 \pm 2$  °C até o momento das análises.

A extração dos compostos provenientes das matérias-primas citadas ocorreu em banho de ultrassom (LS Logen Scientific, LSUC2-120-3.0, Brasil), operando a 40 kHz com alimentação de 120 W. Os extratos de alecrim-do-campo foram obtidos conforme a otimização realizada em capítulo anterior desta tese: 120 minutos, utilizando proporção de amostra para solvente de 1:10 massa/volume (g/mL), concentração de 99% de etanol a uma temperatura constante de  $35 \pm 2$  °C. No caso da própolis verde, as condições de extração utilizadas foram condições também já otimizadas de: 99% de etanol, proporção de amostra para solvente de 1:35 massa:volume (g/mL), tempo fixo de 20 minutos e temperatura ambiente ( $25 \pm 2$  °C) (CAVALARO et al., 2019).

Após tempo determinado, ambas as amostras foram centrifugadas a 4695 g por 15 minutos em micro centrífuga refrigerada (Hitachi KOKI; Japão) e filtradas em papel de filtro tipo Whatman n. 2. O sobrenadante foi rotaevaporado (rotaevaporador Buchi Labortechnik AG – modelo R-215) à 45°C para evaporação do etanol. Finalmente, as soluções resultantes foram armazenadas sob refrigeração a 7°C em frascos âmbar até o momento da secagem em *spray dryer*.

### 5.2.2 Secagem dos extratos antioxidantes por *spray drying*

Para o encapsulamento, foi utilizada a maltodextrina 20DE (equivalente de dextrose) (Ingredion) como material de parede, devido a sua capacidade de produzir micropartículas com alta solubilidade, baixo teor de umidade e higroscopicidade (MOHD NAWI, MUHAMAD e MOHD MARSIN, 2015).

Para a produção das micropartículas por *spray dryer*, uma mistura de maltodextrina 20DE (material de parede) e extratos de alecrim-do-campo e própolis verde (núcleos) foram independentemente diluídos em água destilada com o auxílio de um agitador mecânico (IKA-Werke, RW 11 Lab egg, Staufen, Alemanha), representando o teor total de sólidos de 39g / 100g para o alecrim-do-campo e 24g / 100g para própolis. O material de parede foi adicionado

à mistura aos poucos sob agitação na proporção de 3/5 extrato:maltodextrina (m/m) para o alecrim-do-campo e de 2/5 extrato:maltodextrina (m/m) para a própolis verde.

Todas as formulações foram produzidas duas vezes e a secagem por pulverização foi realizada em um secador de bancada (modelo B290; Büchi, Flawil, Suíça). As misturas foram introduzidas na câmara de secagem em temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) através de uma bomba peristáltica com a vazão ajustada para 9,1 mL/min no caso da própolis verde e 9,5 mL/min no caso do alecrim-do campo. A temperatura do ar de entrada era de  $150 \pm 2^\circ\text{C}$  e a temperatura do ar de saída foi de  $80 \pm 2^\circ\text{C}$  para ambos os materiais.

### **5.2.3 Painel Sensorial**

#### **5.2.3.1 Participantes do painel**

O painel contou com a participação de 8 provadores (habituaados e com experiência prévia em análise sensorial de alimentos) como abordado por Lazo et al. (2017), recrutados na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) - USP, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, Laboratório de Desenvolvimento de Produtos.

Participaram do teste três homens e cinco mulheres com idades entre 18 e 40 anos, sendo 55,6% dos participantes com ensino superior incompleto e 22,2% pós graduação incompleto. Como pré-requisito, os participantes deveriam ser consumidores de maionese e ter disponibilidade em participar das sessões.

#### **5.2.3.2 Amostras do painel**

Na primeira sessão as amostras analisadas foram: extratos puros de própolis verde e alecrim-do-campo obtidos no tópico 5.2.1 e micropartículas desses materiais obtidas no tópico 5.2.2 diluídas 1:1 (m/v).

Nessa segunda sessão, os provadores receberam 9 amostras de maionese. A maionese foi preparada de acordo com Ozdemir et al. (2018) com modificações, utilizando óleo (80%), gema de ovo pasteurizada (10%), vinagre (2%), água (5%), açúcar (2%) e sal (1%). Inicialmente, a gema de ovo pasteurizada e o vinagre foram misturados por um minuto em mixer, posteriormente sal, açúcar e a água foram adicionados à mistura e homogeneizados por mais um minuto. O óleo de soja foi então incorporado lentamente à mistura durante dez minutos ou até adquirir consistência desejada. As amostras de maionese foram armazenadas a  $4^\circ\text{C}$  até o momento das análises e eram retiradas do refrigerador somente no momento das análises sensoriais.

Todas as maioneses foram adicionadas dos antioxidantes alecrim-do-campo e própolis verde em formato líquido (extrato) ou pó (micropartículas), como informado a seguir (Tabela 1).

**Tabela 1.** Descrição dos códigos das amostras de maioneses adicionadas de antioxidantes

<b>Antioxidantes utilizados nas maioneses</b>	<b>Códigos</b>	<b>Conteúdo</b>
Controle	MC	Maionese sem adição de antioxidantes
Extrato de própolis (200 ppm)	MEP <sub>200</sub>	Maionese com extrato de própolis 200 ppm
Extrato de própolis (2500 ppm)	MEP <sub>2500</sub>	Maionese com extrato de própolis 2500 ppm
Extrato de alecrim-do-campo (200 ppm)	MEA <sub>200</sub>	Maionese com extrato de alecrim-do-campo 200 ppm
Extrato de alecrim-do-campo (2500 ppm)	MEA <sub>2500</sub>	Maionese com extrato de alecrim-do-campo 2500 ppm
Micropartículas de própolis (200 ppm)	MPP <sub>200</sub>	Maionese com pó de própolis 200 ppm
Micropartículas de própolis (2500 ppm)	MPP <sub>2500</sub>	Maionese com pó de própolis 2500 ppm
Micropartículas de alecrim-do-campo (200 ppm)	MPA <sub>200</sub>	Maionese com pó de alecrim-do-campo 200 ppm
Micropartículas de alecrim-do-campo (2500 ppm)	MPA <sub>2500</sub>	Maionese com pó de alecrim-do-campo 2500 ppm

Foram testadas uma concentração comum de antioxidante utilizada pela indústria de alimentos para aplicação de antioxidantes sintéticos (200 ppm) e uma superconcentração de 2500 ppm para verificar como seria a interpretação dos provadores em relação à diferenciação das concentrações em relação ao controle (sem antioxidante) (Tabela 1). Como não houve diferenças nas percepções sensoriais, a superconcentração foi escolhida para aplicação nas maioneses que seriam analisadas pelos provadores por meio da metodologia CATA, sendo que nesta última etapa foram analisadas sempre as amostras de maioneses com extrato livre e microencapsulado para comparação. É importante salientar que, o estudo de altas concentrações de antioxidantes naturais é vantajoso, já que no geral demandam maior concentração para atuarem contra a oxidação quando visam substituir os antioxidantes sintéticos e, nesse caso pretendia-se compreender se uma superconcentração era percebida pelos provadores.

### 5.2.3.3 Desenvolvimento do vocabulário sensorial

Os provadores foram semi-treinados (provadores que passaram por duas sessões de treinamento, com 70 minutos cada sobre a definição de atributos por meio de referências escritas e físicas) como abordado por Alexi et al. (2018). O uso de termos complexos em equipe de consumidores não é uma prática comum, no entanto esta decisão foi tomada nosso

estudo para avaliar o desempenho do consumidor quando exposto a uma definição de termos, visando obter orientações e caracterizações sensoriais durante o desenvolvimento da maionese (MASKOWITZ, 1998).

Durante a primeira sessão, os provadores receberam instruções sobre como seriam procedidas as etapas treinamento. Ainda nesta etapa, os provadores receberam as amostras de extrato e micropartículas de alecrim-do-campo e própolis verde para reconhecimento dos atributos, com relação ao aroma. No caso das micropartículas, estas foram diluídas em água para melhor percepção da presença de aromas.

Na segunda sessão os provadores receberam amostras de maioneses adicionadas dos antioxidantes para avaliação de suas características e percepção de presença ou ausência dos aromas encontrados nos extratos e micropartículas do alecrim-do-campo e própolis verde, bem como dos atributos de aroma, textura e aparência relacionados ao próprio produto final (maionese). Os provadores participaram de um teste de Comparação Múltipla (LEE e LEE, 2018), onde deveriam dar notas de 0 (nenhuma diferença do padrão) a 6 (diferença muito grande do padrão) para as maioneses quanto ao aroma, textura e aparência. As médias das notas foram utilizadas não somente para comparar as amostras com a amostra controle (maionese sem antioxidante), mas também verificar se os consumidores da equipe identificavam alguma discrepância quando expostos a diferentes concentrações dos antioxidantes testados em comparação com a maionese controle (sem antioxidante nenhum).

Nas duas sessões de análise do painel, os provadores receberam as amostras codificadas por algarismos de 3 dígitos de maneira randomizada de forma sequencial monádica (sem repetições). Além disso, foram dadas instruções do método *Check-all-that-apply* (CATA) para que os participantes da equipe pudessem compreender como seria feita a análise com os provadores durante a realização do teste final CATA. Ao total, foram obtidos 21 atributos sensoriais utilizados na metodologia final, entre termos referentes à maionese e termos específicos observados na primeira sessão (Tabela 2).

**Tabela 2.** Atributos sensoriais e definições geradas e confirmadas pelo painel sensorial.

<b>Categoria</b>	<b>Atributo</b>	<b>Definição</b>
Aparência	Brilhante	Grau de brilho da maionese
	Amarelado	Gradação de um tom fraco a forte de amarelo baunilha
	Claro	Remete ao branco ou bege
	Escuro	Remete ao marrom ou tons semelhantes ao preto
Textura	Aguado	Falta de viscosidade, com consistência rala, pouco espesso
Aroma	Ovo	Associado à gemada caseira ou omelete
	Vinagre	Associado ao ácido acético
	Óleo	Remete a óleos vegetais como óleo de soja e milho. Associado a óleo fresco
	Fresco	Remete a um produto produzido a pouco tempo, com ingredientes de qualidade
	Pungente	Penetrante, agudo, um tanto irritante e que provoca sensação de ardência
	Resinoso	Remete a resinas vegetais como látex e âmbar, que são coletadas de árvores
	Balsâmico	Remete a um odor aromático forte como o encontrado no vinagre balsâmico
	Floral	Associado a botões e flores já formadas, utilizadas para produção de perfumes e sabonetes.
	Herbal	Remete a ervas frescas recentemente colhidas
	Floresta	Associado a galhos quebrados, grama, terra molhada
	Mentolado	Nota de menta e hortelã
	Mel	Nota aromática semelhante ao mel
	Própolis	Nota aromática de própolis. Remete a spray adquiridos em farmácias.
	Amadeirado	Associado a madeira, como perfumes amadeirados
	Rançoso	Remete a óleo de fritura oxidado
Maionese	Associado ao aroma de maionese comercial	



#### **5.2.3.4 Análise de dados**

Os dados das médias das notas geradas na segunda sessão foram submetidos a análise de variância (ANOVA). As análises post-hoc foram realizadas usando o teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ) para comparações múltiplas na determinação das diferenças com o controle (LEE e LEE, 2018). Para a análise estatística de dados, utilizou-se o aplicativo SPSS Statistics 21 (USA).

### **5.2.4 Metodologia *Check-All-That-Apply* (CATA)**

#### **5.2.4.1 Visão socioeconômica e frequência de consumo**

Foram selecionados 104 indivíduos para a análise sensorial de maionese. Os provadores inicialmente preencheram um questionário socioeconômico e de consumo. Neste questionário foram perguntadas questões relacionadas ao gênero, idade e escolaridade, bem como frequência de consumo de maionese. Provadores que selecionaram que nunca consumiam o produto foram excluídos do teste.

#### **5.2.4.2 Amostragem e condições de análise**

Foram analisadas cinco amostras de maionese com base nos resultados estatísticos da segunda sessão do painel de avaliação sensorial, bem como uma amostra ideal. As maioneses foram preparadas da mesma maneira do que foi proposto no levantamento de atributos de acordo com Ozdemir et al. (2018) com modificações, utilizando 2500 ppm como concentração dos antioxidantes. As amostras continham: nenhum antioxidante (controle), extrato e micropartículas de *Baccharis dracunculifolia* (BD), e finalmente extrato e micropartículas de própolis verde. Para a apresentação dos resultados, as amostras foram codificadas da seguinte maneira: maionese controle (MCON), maionese com extrato de própolis (MEP), maionese com pó de própolis (MPP), maionese com extrato de alecrim-do-campo (MEA) e maionese com pó de alecrim-do-campo (MPA).

A avaliação sensorial foi realizada em cabines de teste sensorial (ISO, 2007). Todas as amostras foram avaliadas em uma sessão, os provadores provaram cada amostra uma vez (sem repetições) de forma monádica sequencial. As amostras foram codificadas com três dígitos e a ordem de entrega das amostras foi randomizada e equilibrada para levar em conta os efeitos de primeira ordem e de transferência (MACFIE et al., 1989). A ordem de apresentação dos termos variou de participante para participante e de amostra para amostra para cada participante (ARES et al., 2015). O teste foi aprovado pelo Comitê de Ética da

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) – Universidade de São Paulo (USP) com comprovante número 141609/2018.

### **5.2.4.3 Avaliação sensorial**

Os provadores recebiam as amostras de maioneses com antioxidantes em copos de 50 mL na ordem randomizada da ficha e eram instruídos quanto a forma de avaliar. Ao receber as amostras e ficha com a metodologia CATA, classificaram a aplicabilidade dos termos referentes ao aroma, aparência e textura para cada maionese, sendo livres para selecionarem quantos atributos achassem cabíveis. Em caso de dúvidas, o consumidor deveria chamar o líder da equipe. Para cada amostra também foi avaliada a aceitação global das maioneses, utilizando uma escala hedônica de 9 pontos (1 - desgostei extremamente e 9 - gostei extremamente) (PERYAM e GIRARDOT, 1952).

### **5.2.4.4 Análise de dados**

Para a análise de dados foi verificada a frequência com que cada descritor era utilizado pelos provadores. Visando identificar as diferenças estatisticamente significativas entre os termos das amostras, utilizou-se o teste Q de Cochran (MEYNERIS et al., 2013). Quando uma diferença significativa era observada, os testes *post hoc* eram conduzidos para identificar as amostras significativamente diferentes. Com o intuito de verificar os atributos que melhor descreveram cada amostra, foi realizada a Análise de Correspondência (SANTOS et al., 2015). Para obtenção da localização espacial da amostra ideal, esta foi adicionada como amostra suplementar para aparecer entre as amostras representadas.

A aceitação geral das amostras foi avaliada por meio de ANOVA, considerando as amostras como fonte de variação fixa e provadores como efeito aleatório a 95% de confiança. As taxas de aceitabilidade dos provadores quanto às amostras analisadas foram observadas através da análise de componentes principais (PCA). A análise de penalidades foi desenvolvida para determinar a aceitabilidade associada aos desvios nos perfis sensoriais entre os produtos avaliados e o ideal, detectados pelas escalas de intensidade (TARREGA, MARCANO e FISZMAN, 2016). Somente os atributos que influenciaram na aceitação de acima de 20% dos provadores foram considerados neste estudo (PLAEHN, 2012).

Todas as análises estatísticas foram desenvolvidas com o auxílio dos softwares XLSTAT 2018.2 (Addinsoft, Paris, França, 2018).

## 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.3.1 Painel sensorial - Levantamento de atributos e concentrações

O levantamento de atributos do painel sensorial foi essencial para a verificação dos termos pertinentes que seriam empregados na análise das perguntas CATA. Além disso, foi possível determinar a amostragem e concentrações que seriam utilizadas nesse teste seguinte.

Os atributos levantados para as amostras de extrato e micropartículas de própolis verde e alecrim-do-campo foram todos observados e confirmados pelo grupo de pessoas no painel. Posteriormente, quando aplicados nas maioneses suas identificações nos produtos tornou-se mais profunda, já que os atributos das maioneses algumas vezes sobrepujam aqueles observados nos antioxidantes.

A análise de comparações múltiplas foi realizada para verificar possíveis diferenças ou semelhanças das amostras de maioneses em comparação ao padrão de acordo com o aroma, textura e aparência, como pode ser observado na Tabela 3.

**Tabela 3.** Resultado das médias das amostras de maionese com a amostra controle quanto ao aroma, textura e aparência de acordo com o teste de Dunnett.

Maioneses com tratamentos antioxidantes	Aroma	Textura	Aparência
MC	1,50 <sup>a</sup>	1,50 <sup>a</sup>	0,90 <sup>b</sup>
MEP200*	1,62 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>	1,62 <sup>b</sup>
MPP200*	1,87 <sup>a</sup>	1,87 <sup>a</sup>	1,00 <sup>b</sup>
MEP2500*	1,87 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>	1,50 <sup>b</sup>
MPP2500*	1,75 <sup>a</sup>	2,75 <sup>a</sup>	2,50 <sup>b</sup>
MEA200*	1,87 <sup>a</sup>	2,37 <sup>a</sup>	2,38 <sup>b</sup>
MPA200*	1,37 <sup>a</sup>	2,50 <sup>a</sup>	1,37 <sup>b</sup>
MEA2500*	1,50 <sup>a</sup>	1,75 <sup>a</sup>	1,25 <sup>b</sup>
MPA2500*	2,12 <sup>a</sup>	2,00 <sup>a</sup>	3,62 <sup>a</sup>

Legenda: Médias seguidas por diferentes letras minúsculas sobrescritas nas colunas representam diferenças significativas entre a amostra e o controle de acordo com o teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Amostras: MC: Controle; MEP: Extrato de própolis; MPP: Pó de própolis; MEA: Extrato de alecrim-do-campo; MPA: Pó de alecrim-do-campo. \*Os números subscritos que seguem as letras codificadas das maioneses com os tratamentos antioxidantes remetem a concentração dos antioxidantes em ppm.

Foi possível verificar (Tabela 3), que os provadores não identificaram diferenças significativas entre as amostras de maionese em comparação à amostra padrão quanto ao aroma e textura. Quanto à aparência, a amostra de maionese com pó de alecrim-do-campo a 2500 ppm (MPA2500) se diferenciou da amostra padrão (MC). Tal fato não impossibilita sua

aplicação já que não foram mencionadas e aprofundadas possíveis características de aparência que sejam indesejáveis.

Além disso, verificou-se que o uso de uma superconcentração dos antioxidantes própolis verde e alecrim-do-campo nas maioneses não influenciou a percepção dos provadores, ou seja, nenhuma das duas concentrações diferiu da amostra controle, principalmente com base no aroma. Assim, constatou-se que o uso de 200 ou 2500 ppm foi indiferente e ambas as concentrações podem ser aplicadas, lembrando que estudos sobre a toxicidade da concentração dos antioxidantes em questão devem ser efetuados para posterior aplicação final. Bruzzone et al. (2015) incentivam o uso de consumidores finais em análises sensoriais, afirmando que se a informação sensorial buscada pelos pesquisadores for orientar o desenvolvimento de um novo produto ou identificar motivadores de interesse, uma equipe treinada ou com consumidores pode gerar dados similares e por isso utilizar consumidores é uma boa escolha metodológica. Portanto, trata-se do primeiro passo utilizado para o desenvolvimento da maionese e identificação dos atributos presentes nas mesmas e até mesmo a comprovação da presença dos atributos identificados nos extratos e micropartículas diluídas de alecrim-do-campo e própolis verde no produto final.

### **5.3.2 *Check-all-that-apply* (CATA)**

#### **5.3.2.1 Perfil dos participantes do teste CATA**

Todos os participantes que realizaram a análise das questões *Check-all-that-apply* (CATA) eram professores, funcionários e alunos de graduação e pós-graduação da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo (ESALQ/USP). Ao total de 104 participantes, 51,9% do sexo feminino, em sua grande maioria com faixa etária de 18 a 30 anos (83,7%), ensino superior e pós graduação incompletos (77%).

Para prosseguimento do teste, a frequência de consumo foi essencial para selecionar os provadores ideais para nossa pesquisa. Aqueles que selecionaram a opção de que nunca consumiam maionese foram excluídos. Em sua maioria, os participantes eram consumidores frequentes de maionese, sendo que 64,4% consumiam entre uma vez por semana e de 15 em 15 dias e o restante se dividiu entre o consumo uma vez por mês e raramente.

#### **5.3.2.2 Avaliação sensorial utilizando as questões CATA**

Assim como observado na equipe de provadores, a análise sensorial CATA utilizando consumidores corroborou com as informações de que os atributos relacionados diretamente

com o aroma dos antioxidantes utilizados (própolis verde e alecrim-do-campo) não foram observados nas amostras de maionese em que foram adicionados. Apesar disso, alguns desses aromas foram indicados como esperados em uma amostra ideal de maionese. As principais características que foram esperadas em uma amostra ideal de maionese estão apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4.** Frequência que cada atributo sensorial foi utilizado para descrever as amostras de maionese.

<b>Atributos sensoriais</b>	<b>Ideal</b>	<b>MPP</b>	<b>MCON</b>	<b>MEA</b>	<b>MEP</b>	<b>MPA</b>
Rançoso <sup>ns</sup>	2	13 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	8 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>
Aroma de óleo <sup>ns</sup>	2	23 <sup>a</sup>	24 <sup>a</sup>	15 <sup>a</sup>	24 <sup>a</sup>	17 <sup>a</sup>
Brilho <sup>ns</sup>	69	63 <sup>a</sup>	53 <sup>a</sup>	55 <sup>a</sup>	61 <sup>a</sup>	51 <sup>a</sup>
Mel <sup>ns</sup>	14	7 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
Herbal <sup>ns</sup>	14	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>
Aroma de maionese <sup>*</sup>	91	72 <sup>b</sup>	56 <sup>ab</sup>	46 <sup>a</sup>	72 <sup>b</sup>	60 <sup>ab</sup>
Aguado <sup>*</sup>	0	20 <sup>a</sup>	46 <sup>b</sup>	12 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	27 <sup>a</sup>
Floral <sup>ns</sup>	7	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>
Aroma de floresta <sup>ns</sup>	4	3 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>
Balsâmico <sup>ns</sup>	9	6 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>
Aroma de vinagre <sup>ns</sup>	11	32 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	25 <sup>a</sup>	24 <sup>a</sup>	23 <sup>a</sup>
Amadeirado <sup>ns</sup>	8	5 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>
Pungente <sup>ns</sup>	4	5 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>
Própolis <sup>*</sup>	4	13 <sup>b</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
Aroma de ovo <sup>ns</sup>	11	23 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	21 <sup>a</sup>	24 <sup>a</sup>
Mentolado <sup>ns</sup>	4	0 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>
Escuro <sup>ns</sup>	2	4 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>
Resinoso <sup>ns</sup>	4	11 <sup>a</sup>	12 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	18 <sup>a</sup>
Amarelado <sup>ns</sup>	41	58 <sup>a</sup>	53 <sup>a</sup>	51 <sup>a</sup>	49 <sup>a</sup>	62 <sup>a</sup>
Fresco <sup>ns</sup>	74	28 <sup>a</sup>	32 <sup>a</sup>	26 <sup>a</sup>	37 <sup>a</sup>	23 <sup>a</sup>
Claro <sup>*</sup>	68	37 <sup>a</sup>	52 <sup>ab</sup>	40 <sup>ab</sup>	55 <sup>b</sup>	47 <sup>ab</sup>

Legenda: \* Indica diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre as amostras, de acordo com o teste Q de Cochran. Letras minúsculas nas linhas representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras de acordo com o atributo. MPP = maionese com pó de própolis, MCON = maionese controle, MEA = maionese com extrato de alecrim-do-campo, MEP = maionese com extrato de própolis e MPA = maionese com pó de alecrim-do-campo.

Os principais atributos esperados em uma amostra de maionese são: aroma de maionese, fresco, claro e brilho, como pode ser observado na Tabela 4. Enquanto os atributos menos esperados na amostra ideal de maionese foram principalmente: rançoso, aroma de óleo, aguado e escuro.

A amostra controle (MCON) foi a que apresentou maior textura aguada, atributo considerado indesejável em uma amostra ideal de maionese. Já com relação ao termo própolis, apenas a amostra de maionese com pó de própolis (MPP) mostrou-se diferente das

demais, mesmo assim, a porcentagem de participantes que conseguiu perceber este atributo na amostra MPP foi pequena (12,5%). Assim, foi possível observar que não houve grandes percepções do atributo própolis sobre o aroma de maionese, o que tornaria o produto mais semelhante àquele comercializado, já que as maioneses que os consumidores estão acostumados a comprar não possuem esse ingrediente e, portanto, não possuem este atributo.

De acordo com o teste Q de Cochran, os provadores não detectaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre as amostras para os atributos mais específicos obtidos pelo painel, como aroma de floresta, balsâmico, amadeirado e mentolado, por exemplo. Choi e Lee (2019) afirmam que consumidores têm uma tendência em selecionar termos que possuem familiaridade para caracterizar uma amostra. Além disso, por não haver diferenças significativas entre as amostras para estes termos utilizando uma superconcentração, o uso de concentrações menores de alecrim-do-campo e própolis verde não influenciaria significativamente esses descritores citados.

Finalmente, pode-se observar (Tabela 4), que apenas 4 atributos sensoriais foram significativos para diferenciar as amostras pelo teste de Cochran ( $p < 0,05$ ), indicando que os consumidores não perceberam grandes diferenças significativas entre as amostras de maionese. Tal indício no caso de nosso estudo não é considerado uma desvantagem, já que representa que o uso de altas concentrações dos antioxidantes (2500 ppm) não modificaram o aroma, aparência e textura das maioneses em comparação com a maionese sem antioxidantes (controle).

Baseando-se no fato de que os antioxidantes sintéticos utilizados pela indústria de alimentos são utilizados em baixa concentração e mesmo assim são bastante eficientes, utilizar a maior concentração para prosseguimento das análises sensoriais seguintes mostrou-se vantajoso em nosso estudo. Portanto, para realização da análise sensorial utilizando a metodologia CATA utilizou-se apenas esta concentração citada de ambos os antioxidantes naturais aplicados em maionese.

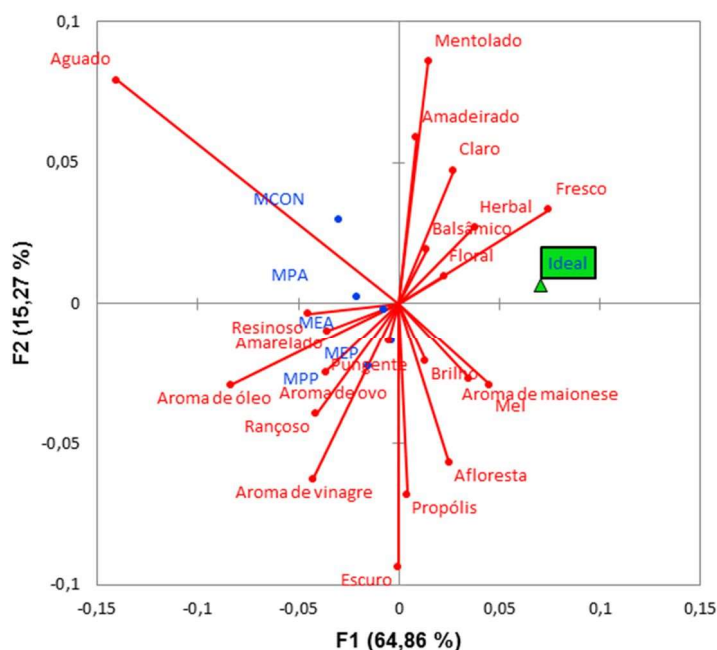
Em nosso estudo, observamos anteriormente que 100 e 200 ppm de extratos e micropartículas de própolis verde e alecrim-do-campo foram eficientes no controle da formação constante de produtos da oxidação durante 25 dias de observação. No entanto, quando comparados ao antioxidante sintético TBHQ a eficiência ainda foi um pouco inferior e apenas a concentração de 200 ppm de micropartículas de própolis verde teve desempenho compatível ao antioxidante sintético. Por isso, testar altas concentrações em mg/kg de óleo são sugeridas como convenientes. Ammar (2013) verificou em seu estudo que o extrato de alecrim (2500 ppm) mostrou-se eficiente na inibição de produtos primários e secundários da oxidação de óleo de fritura assim como o TBHQ (200 ppm), podendo ser uma opção de

substituição desse antioxidante sintético. Neste mesmo sentido, Tran et al. (2020) testaram concentrações de 3000 a 6000 ppm (base de gordura) do extrato da folha de goiaba como antioxidante em linguiça de porco e verificaram que concentrações acima de 4000 ppm foram eficientes no controle da oxidação, tais valores foram similares aos obtidos pelo antioxidante sintético BHT a 200 ppm.

No caso da própolis, estudos relatam que trata-se de um produto não-tóxico e seguro, com dose segura de 70 mg/dia ou 1,4 mg/kg peso corpóreo diário (BURDOCK, 1998; POBIEGA, KRAŚNIEWSKA e GNIEWOSZ, 2019). Já para o alecrim-do-campo os estudos de doses tóxicas ainda são escassos para uso em alimentos e por isso são necessários novos trabalhos que visem obter dados toxicológicos para posterior avaliação sensorial de sabor especificamente.

Pobiega, Kraśniewska e Gniewosz (2019) sugeriram que a adição mínima de extrato de própolis (0,5%) em alimentos como peixe, salsichas, produtos de carne de aves, suco de maçã, leite e mel são aceitos sensorialmente, valores acima desta porcentagem podem alterar a preferência do consumidor de acordo com o produto que o extrato for adicionado. Já a adição de microcápsulas de própolis (0,3 g/kg) em hambúrguer de carne modificou o odor e sabor do produto final, apesar de não mudar a cor, aparência e textura da carne (REIS et al., 2017). E a adição de 0,05% do extrato da própolis não alterou as propriedades do produto espanhol “a la Piedra’ turrón” (NARBONA et al., 2010).

Analisando os dados obtidos pela análise de componentes principais (*Principal component analysis* – PCA), as duas primeiras dimensões representaram 80,1% na variabilidade dos dados da primeira e segunda dimensões do componente principal (Figura 1).



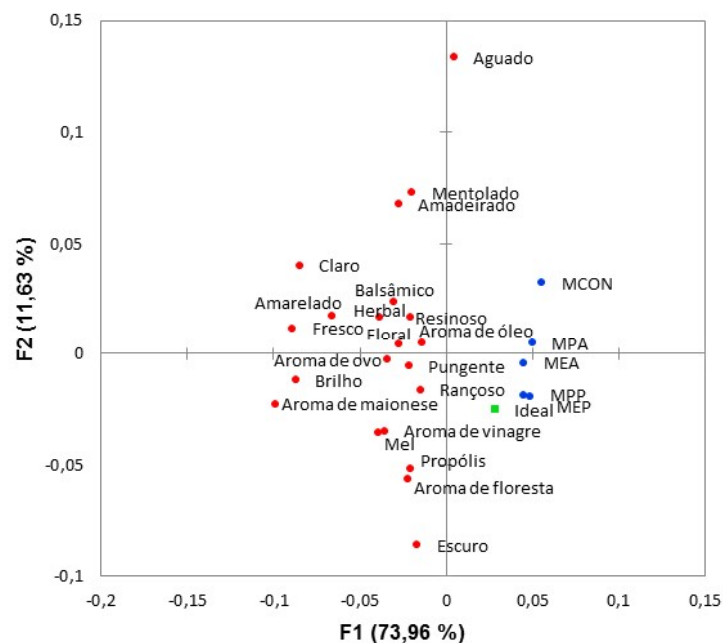
**Figura 1.** Representação das amostras, produto ideal e atributos que os descrevem na primeira e segunda dimensões da análise de componentes principais (PCA).

Legenda: MCON = maionese controle, e MPA = maionese com pó de alecrim-do-campo, MEA = maionese com extrato de alecrim-do-campo, MEP = maionese com extrato de própolis e MPP = maionese com pó de própolis.

Observando a Figura 1, a amostra controle é caracterizada por possuir uma textura aguada, enquanto que os principais atributos das amostras de maionese com alecrim-do-campo em extrato (MEA) e pó (MPA) foram: resinoso, amarelado e aroma de óleo. Já as amostras com a presença de própolis (MEP e MPP) apresentaram maior aroma de ovo, pungente, rançoso e aroma de vinagre. É possível observar que as amostras de maionese com alecrim-do-campo (MEA e MPA) estão próximas e o mesmo acontece com as amostras de própolis verde (MEP e MPP). Mesmo o alecrim-do-campo sendo a principal fonte botânica da própolis verde, as características percebidas entre essas duas fontes quando aplicadas nas maioneses foram diferentes.

Por meio da figura de Análise de Correspondência obtida (Figura 2), é possível verificar a localização espacial das amostras de maionese que continham os antioxidantes naturais.





**Figura 2.** Análise de correspondência em questões CATA para as amostras de maionese com própolis verde e alecrim-do-campo.

Legenda: MCON = maionese controle, e MPA = maionese com pó de alecrim-do-campo, MEA = maionese com extrato de alecrim-do-campo, MEP = maionese com extrato de própolis e MPP = maionese com pó de própolis.

Foi possível verificar que a primeira e segunda dimensões sensoriais foram responsáveis por explicar 85,6% da variação dos dados experimentais, representando 73,9% e 11,6%, respectivamente (Figura 2).

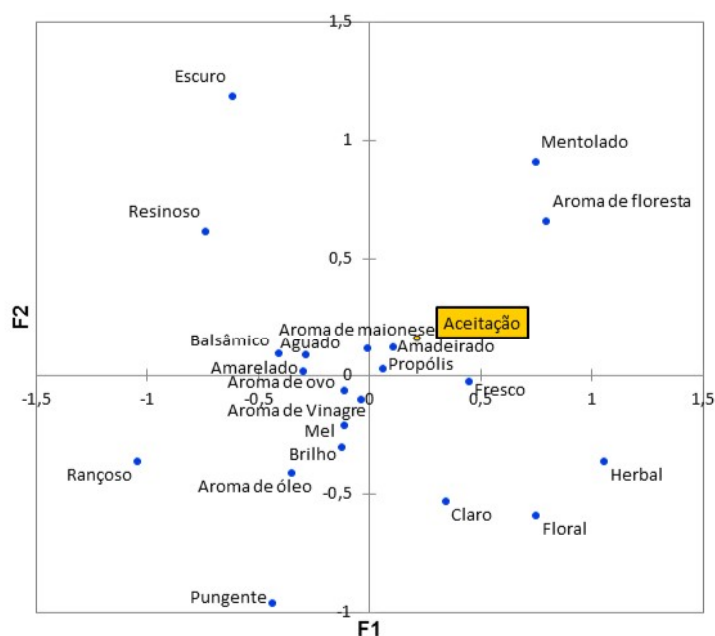
Todas as amostras de maionese, bem como a amostra ideal, foram localizadas no lado direito do primeiro componente principal. As amostras de maionese controle (MCON) e com alecrim-do-campo em pó (MPA) estavam localizadas no primeiro quadrante, enquanto que a amostra de maionese com extrato de alecrim-do-campo (MEA), MEP e MPP (com extrato e pó de própolis) juntamente com a amostra ideal foram concentradas no quarto quadrante. As amostras de maionese com extrato e pó de própolis verde (MEP e MPP) estavam mais próximas à amostra ideal, comprovando que a própolis verde pode ser uma alternativa para ser adicionada em maioneses como antioxidante natural.

Observou-se ainda que as características aroma de óleo e pungente foram localizadas próximas a zero em ambas as dimensões. Na primeira dimensão o atributo observado na direção positiva foi o aguado. Já para a segunda dimensão, mentolado, amadeirado, claro, balsâmico, amarelado, herbal, resinoso, floral e fresco foram localizados na direção positiva e aroma de ovo, brilho, aroma de maionese, rançoso, aroma de vinagre, mel, própolis, aroma de floresta e escuro na direção negativa.

A maionese é, aparentemente, um produto de difícil diferenciação assim como o iogurte, por exemplo (SANTOS et al., 2020). Olsson et al. (2018) revelaram em seu estudo

que não houve diferenças significativas entre as amostras de maioneses experimentais quanto à cor, sabor e odor, comprovando a dificuldade de diferenciação deste produto e o fato de as amostras estarem tão próximas de acordo com seus atributos.

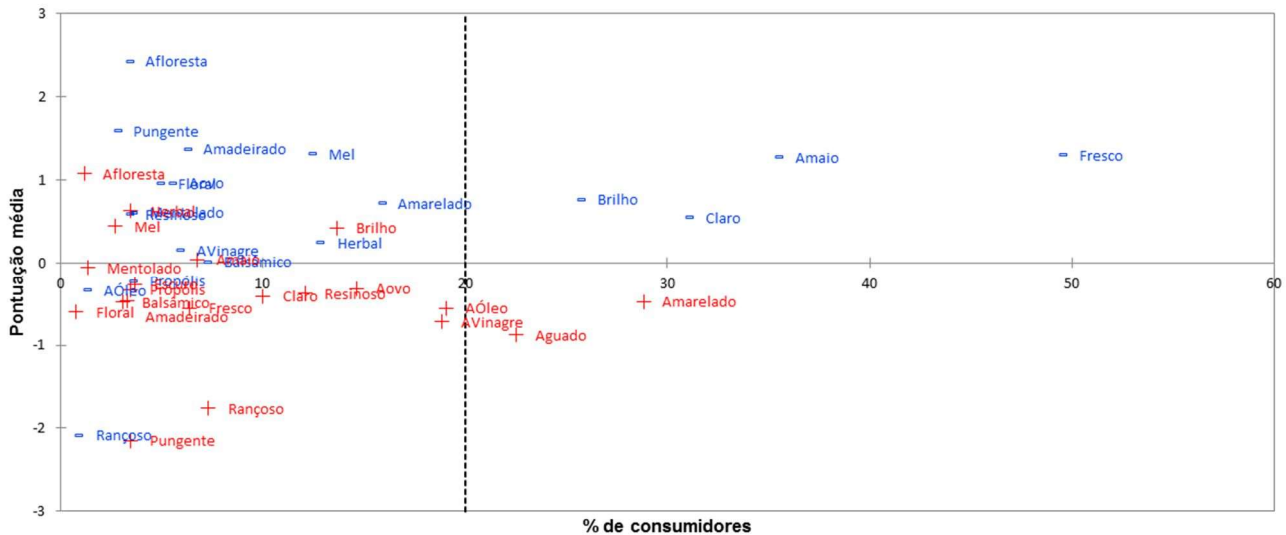
Assim, verificou-se que os atributos relacionados aos possíveis antioxidantes naturais adicionados às amostras de maionese de nosso estudo podem ter contribuído para melhor aceitação do produto. Ou seja, apesar do atributo “própolis” ter sido escolhido poucas vezes para descrever uma amostra ideal (Tabela 4), os resultados obtidos por meio da Figura 4 nos possibilitam observar que dentre os atributos que contribuiriam para aumentar a aceitação estão os atributos amadeirado e própolis, termos característicos dos antioxidantes naturais utilizados. Por meio da Figura 3 é possível verificar esta tendência.



**Figura 3.** Representação dos atributos que contribuíram para aumentar a aceitação geral das maioneses.

Verifica-se que os atributos própolis, amadeirado, aroma de maionese e fresco são considerados direcionadores de aceitação, ou seja, são responsáveis por modificar e aumentar a impressão global e devem estar presentes nas amostras. Em contrapartida, os termos rançoso, herbal, aroma de floresta, mentolado e escuro são mais independentes e não impactam tão fortemente na aceitação geral. Finalmente, os atributos aroma de ovo, de vinagre e óleo, amarelado, aguado, balsâmico e mel são características que devem estar presentes na maionese em menor intensidade para não ter grande impacto na redução da aceitação.

Para auxiliar ainda mais a compreensão dos fatores que contribuem para aumentar ou diminuir a aceitação geral, os dados foram avaliados também por meio da análise de penalidades (Figura 4).



**Figura 4.** Análise de penalidades desenvolvidas para os atributos que contribuem na aceitação geral.

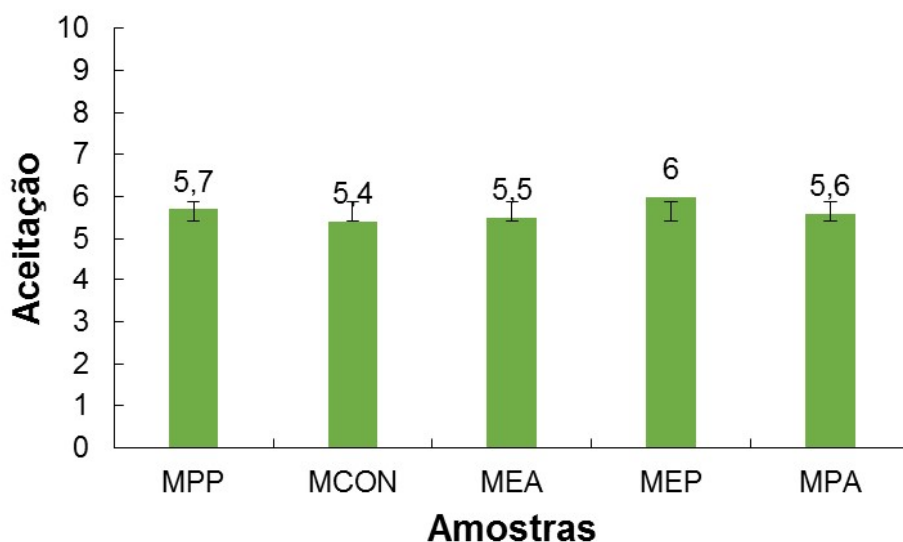
De acordo com a Figura 4, a falta dos atributos seguintes causaram uma redução na aceitação geral de até 1,5 pontos por mais que 20% dos provadores: claro, brilho, aroma de maionese e fresco. Portanto, necessita-se melhorar tais características para obtenção de uma maionese modelo para os consumidores avaliados.

Além disso, os atributos aguado e amarelado contribuíram para redução de até 1 ponto na escala, devendo ser menos evidenciados para aumentar a aceitação. Verifica-se portanto que, as peculiaridades que prejudicaram a nota de impressão global das amostras de maionese não estavam diretamente interligadas com as características próprias da própolis verde e alecrim-do-campo adicionados e sim com o produto final (maionese). Assim, para obtenção de um produto esperado pelos participantes testados serão necessários estudos complementares que trabalhem na estrutura geral e ingredientes da maionese para evitar que a mesma tenha características não esperadas pelos consumidores e possam ser inseridos os antioxidantes naturais sem quaisquer problemas sensoriais.

### 5.3.3 Aceitação geral

Não foram encontradas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) entre a média das notas de aceitação geral obtidas para as 5 amostras de maioneses (Figura 5). Semelhantemente ao

que foi encontrado em nosso estudo, Mihov et al. (2012) realizaram análise sensorial de maioneses utilizando diferentes ervas e especiarias e seus resultados demonstraram que as amostras não diferiram significativamente quanto a aceitação geral.



**Figura 5.** Média das notas de aceitação geral das amostras de maionese contendo antioxidantes naturais e sem antioxidantes.

Legenda: As médias seguidas por letras minúsculas iguais representam não haver diferenças significativas entre as notas de aceitação das amostras ( $p < 0,05$ ). MPP = maionese com pó de própolis, MCON = maionese controle, MEA = maionese com extrato de alecrim-do-campo MEP = maionese com extrato de própolis e MPA = maionese com pó de alecrim-do-campo.

Aparentemente, os provadores tiveram preferência, mesmo que pequena, pelas amostras que continham própolis na forma de extrato ou pó, já a amostra menos preferida foi a maionese controle sem nenhum antioxidante. Tal dado nos faz refletir sobre as necessidades de compreender melhor qual o perfil do consumidor de maionese e o que é realmente esperado em uma amostra deste tipo de produto. Muitas vezes é pensado que termos que não são relativos a novos ingredientes (não comumente utilizados) não são bem quistos na maionese porque geralmente não fazem parte da composição do produto e tal fato deve ser melhor investigado.

De acordo com os dados do presente trabalho e resultados de outros estudos da área, pode-se inferir que a maionese aparenta ser um produto de diferenciação complexa e por isso suas notas de aceitação global são bastante semelhantes não havendo diferenças significativas entre as amostras. Além disso, os consumidores possuem a tendência de optar por selecionar o meio das escalas de aceitação. Este viés de resposta foi abordado por Tsekouras (2017), que avaliou o uso excessivo de opções do meio de uma escala pelos consumidores, independente do conteúdo abordado no estudo.

Em um estudo realizado por Safitri, Evanuarini e Thohari (2019), foi verificado o efeito da adição de extrato de gengibre em maioneses e verificaram que a aceitação do produto variou de  $4,09 \pm 0,25$  a  $4,42 \pm 0,05$ , inferior a aceitação geral encontrada em nosso estudo.

A despeito dos resultados encontrados, outros estudos complementares são encorajados para compreender melhor as diferenças existentes entre cada amostra de maionese testada, procurando avaliar a intensidade de cada atributo selecionado pelos provadores, intensificando os atributos relativos a própolis verde para melhor compreensão dos aspectos esperados neste tipo de produto pelo consumidor.

#### **5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A metodologia *Check-all-that-apply* (CATA) foi eficiente para gerar termos direcionadores de preferência das amostras de maionese e os provadores conseguiram definir os principais atributos que esperam em uma amostra ideal. Esses mesmos provadores foram capazes de separar as maioneses com alecrim-do-campo daquelas com própolis verde de acordo com os atributos percebidos, assim é possível observar que cada matéria prima possui suas particularidades apesar do alecrim-do-campo ser fonte botânica da própolis verde e apresentar características sensoriais em comum.

Conclui-se que os atributos própolis, amadeirado, aroma de maionese e fresco contribuíram para aumentar a aceitação das amostras de maionese, já que estavam próximos à amostra ideal. Assim, a aplicação da própolis verde mostrou-se vantajosa para uso como antioxidante natural e pode contribuir com uma maior aceitação em maioneses comerciais quando utilizada nas concentrações abordadas em nosso estudo.

## REFERÊNCIAS

- Aguiar, L. A., Rodrigues, D. B., Queiroz, V. A. V., Melo, L., & de Oliveira Pineli, L. D. L. (2020). Comparison of two rapid descriptive sensory techniques for profiling and screening of drivers of liking of sorghum breads. *Food Research International*, 131, 108999.
- Aguiar, L. A. D., Melo, L., & Oliveira, L. L. (2019). Validation of rapid descriptive sensory methods against conventional descriptive analyses: A systematic review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 59(16), 2535-2552.
- Alexi, N., Nanou, E., Lazo, O., Guerrero, L., Grigorakis, K., & Byrne, D. V. (2018). Check-All-That-Apply (CATA) with semi-trained assessors: Sensory profiles closer to descriptive analysis or consumer elicited data?. *Food Quality and Preference*, 64, 11-20.
- Altunkaya, A., Hedegaard, R. V., Harholt, J., Brimer, L., Gökmen, V., & Skibsted, L. H. Oxidative stability and chemical safety of mayonnaise enriched with grape seed extract. *Food & function*, 2013, 4.11: 1647-1653.
- Ammar, M. S. (2016). A comparative Study on the Antioxidant Activity of TBHQ and Extracts from Rosemary and Oregano on Oxidative Stability of Palm Olein during Deep Fat Frying of Beef Meatballs. *Sciences*, 6(04), 671-681.
- Ares, G. (2015). Methodological challenges in sensory characterization. *Current Opinion in Food Science*, 3, 1-5.
- Ares, G., Reis, F., Oliveira, D., Antúnez, L., Vidal, L., Giménez, A., & Paisley, A. G. (2015). Recommendations for use of balanced presentation order of terms in CATA questions. *Food Quality and Preference*, 46, 137-141.
- Ares, G., Tárrega, A., Izquierdo, L., & Jaeger, S. R. (2014). Investigation of the number of consumers necessary to obtain stable sample and descriptor configurations from check-all-that-apply (CATA) questions. *Food Quality and Preference*, 31, 135-141.
- Baiano, A., & Del Nobile, M. A. (2016). Antioxidant compounds from vegetable matrices: Biosynthesis, occurrence, and extraction systems. *Critical reviews in food science and nutrition*, 56(12), 2053-2068.
- Bennick, A. (2002). Interaction of plant polyphenols with salivary proteins. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 13(2), 184-196.

- Bernardi, S., Fávaro-Trindade, C. S., Trindade, M. A., Balieiro, J. C. D. C., Cavenaghi, A. D., & Contreras-Castillo, C. J. (2013). ITALIAN-TYPE SALAMI WITH PROPOLIS AS ANTIOXIDANT. *Italian Journal of Food Science*, 25(4).
- Bruzzone, F., L. Vidal, L. Antúnez, A. Giménez, R. Deliza, & G. Ares. 2015. Comparison of intensity scales and CATA questions in new product development: Sensory characterization and directions for product reformulation of milk desserts. *Food Qual. Prefer.* 44:183–193.
- Burdock, G. A. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical toxicology*, 36(4), 347-363.
- Carneiro, H. C., Tonon, R. V., Grosso, C. R., & Hubinger, M. D. (2013). Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. *Journal of food engineering*, 115(4), 443-451.
- Cavalaro, R. I., da Cruz, R. G., Dupont, S., de Moura, J. M. L. N., & Vieira, T. M. F. S. (2019). In vitro and in vivo antioxidant properties of bioactive compounds from green propolis obtained by ultrasound-assisted extraction. *Food chemistry: X*, 4, 100054.
- Chatterjee, D., & Bhattacharjee, P. Use of eugenol-lean clove extract as a flavoring agent and natural antioxidant in mayonnaise: product characterization and storage study. *Journal of food science and technology*, 2015, 52.8: 4945-4954.
- Choi, Y., & Lee, J. (2019). The effect of extrinsic cues on consumer perception: A study using milk tea products. *Food Quality and Preference*, 71, 343-353.
- Dooley, L., Lee, Y. S., & Meullenet, J. F. (2010). The application of check-all-that-apply (CATA) consumer profiling to preference mapping of vanilla ice cream and its comparison to classical external preference mapping. *Food quality and preference*, 21(4), 394-401.
- Gorji, S. G., Smyth, H. E., Sharma, M., & Fitzgerald, M. (2016). Lipid oxidation in mayonnaise and the role of natural antioxidants: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 56, 88-102.
- Gorji, S. G., Calingacion, M., Smyth, H. E., & Fitzgerald, M. Effect of natural antioxidants on lipid oxidation in mayonnaise compared with BHA, the industry standard. *Metabolomics*, 2019, 15.8: 106.
- Hillmann J. 2010. Reformulation key for consumer appeal into the next decade. *Food Rev* 37(1):14, 16, 18–9.
- ISO (2007). ISO Standard 8589:2007 Sensory analysis—General guidance for the design of test rooms.

- Joppen L. 2006. Taking out the chemistry. *Food Eng Ingrid* 31(2):38–9, 41.
- Lancaster, B., & Foley, M. (2007). Determining statistical significance for choose-all that-apply question responses. In 7th Pangborn sensory science symposium.
- Lazo, O., Guerrero, L., Alexi, N., Grigorakis, K., Claret, A., Pérez, J. A., & Bou, R. (2017). Sensory characterization, physico-chemical properties and somatic yields of five emerging fish species. *Food Research International*, 100, 396-406.
- Lee, S., & Lee, D. K. (2018). What is the proper way to apply the multiple comparison test?. *Korean journal of anesthesiology*, 71(5), 353.
- MacFie, H. J., Bratchell, N., Greenhoff, K., & Vallis, L. V. (1989). Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall tests. *Journal of Sensory Studies*, 4(2), 129–148.
- Martinez-Tome, M., Jimenez, A. M., Ruggieri, S., Frega, N., Strabbioli, R., & Murcia, M. A. (2001). Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. *Journal of food protection*, 64(9), 1412-1419.
- Mihov, R., Nikovska, K., Nenov, N., & Slavchev, A. (2012). EVALUATION OF MAYONNAISE-LIKE FOOD EMULSIONS WITH EXTRACTS OF HERBS AND SPICES. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 191-199.
- Moskowitz, H. R. (1998). Consumers versus experts in the light of psychophysics: A reply to Hough. *Journal of Sensory Studies*, 13, 291–298.
- Mohd Nawi, N., Muhamad, I. I., & Mohd Marsin, A. (2015). The physicochemical properties of microwave-assisted encapsulated anthocyanins from *Ipomoea batatas* as affected by different wall materials. *Food science & nutrition*, 3(2), 91-99.
- Moskowitz, H. R. (1998). Consumers versus experts in the light of psychophysics: A reply to Hough. *Journal of Sensory Studies*, 13, 291–298.
- Meyners, M., Castura, J. C., & Carr, B. T. (2013). Existing and new approaches for the analysis of CATA data. *Food Quality and Preference*, 30(2), 309-319.



- Narbona, E., García-García, E., Vázquez-Araújo, L., & Carbonell-Barrachina, Á. A. (2010). Volatile composition of functional 'a la Piedra'turrón with propolis. *International journal of food science & technology*, 45(3), 569-577.
- Olsson, V., Håkansson, A., Purhagen, J., & Wendin, K. (2018). The effect of emulsion intensity on selected sensory and instrumental texture properties of full-fat mayonnaise. *Foods*, 7(1), 9.
- Ostroschi, L. C., de Souza, V. B., Echalar-Barrientos, M. A., Tulini, F. L., Comunian, T. A., Thomazini, M., & Favaro-Trindade, C. S. (2018). Production of spray-dried proanthocyanidin-rich cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) extract as a potential functional ingredient: improvement of stability, sensory aspects and technological properties. *Food Hydrocolloids*, 79, 343-351.
- Ozdemir, N., Kantekin-Erdogan, M. N., Tat, T., & Tekin, A. Effect of black cumin oil on the oxidative stability and sensory characteristics of mayonnaise. *Journal of food science and technology*, 2018, 55.4: 1562-1568.
- Peryam, D. R., & Girardot, N. F. Advanced taste-test method. *Food Engineering*, 58–61, 1952.
- Plaehn, D. CATA penalty/reward. *Food Quality and Preference*, Volume 24, v. 1, p. 141-152, 2012.
- Pobiega, K., Kraśniewska, K., & Gniewosz, M. (2019). Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality—A review. *Trends in food science & technology*, 83, 53-62.
- Raikos, V., McDonagh, A., Ranawana, V., & Duthie, G. Processed beetroot (*Beta vulgaris* L.) as a natural antioxidant in mayonnaise: Effects on physical stability, texture and sensory attributes. *Food Science and Human Wellness*, 2016, 5.4: 191-198.
- Reis, A. S., Diedrich, C., de Moura, C., Pereira, D., de Flório Almeida, J., da Silva, L. D., & Carpes, S. T. (2017). Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at- 15° C. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 306-313.
- Safitri, A. R., Evanuarini, H., & Thohari, I. (2017). The Effect of Ginger Extract on Emulsion Stability, Total Acidity and Sensory Evaluation of Full Fat Mayonnaise. *International Research Journal of Advanced Engineering and Science*, 4 (4), 284-289, 2019.
- Santiago-Adame, R., Medina-Torres, L., Gallegos-Infante, J. A., Calderas, F., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., & Bernad-Bernad, M. J. (2015). Spray drying-microencapsulation of cinnamon infusions (*Cinnamomum zeylanicum*) with maltodextrin. *LWT-Food Science and Technology*, 64(2), 571-577.

- Santos, B. A., P. C. B. Campagnol, A. G. Cruz, M. T. E. L. Galvão, R. A. Monteiro, R. Wagner, & Pollonio, M. A. R. 2015. Check all that apply and free listing to describe the sensory characteristics of low sodium dry fermented sausages: Comparison with trained panel. *Food Res. Int.* 76:725–734.
- Santos, M. S., Estevinho, L. M., de Carvalho, C. A. L., da Silva Conceicao, A. L., & de Castro Almeida, R. C. (2020). Rheological and sensorial evaluation of yogurt incorporated with red propolis. *Journal of Food Science and Technology*, 57(3), 1080-1089.
- Stone, H., Bleibaum, R. N., & Thomas, H. A. (2012). *Sensory evaluation practices*. Academic press.
- Taghvaei, M., & Jafari, S. M. (2015). Application and stability of natural antioxidants in edible oils in order to substitute synthetic additives. *Journal of food science and technology*, 52(3), 1272-1282.
- Tarrega, S., Marcano, J. & Fiszman, S.. 2016. Yogurt viscosity and fruit pieces affect satiating capacity expectations. *Food Res. Int.* 89:574–581
- Tsekouras, D. (2017). The effect of rating scale design on extreme response tendency in consumer product ratings. *International Journal of Electronic Commerce*, 21(2), 270-296.
- Van Kleef, E., Van Trijp, H. C., & Luning, P. (2005). Consumer research in the early stages of new product development: a critical review of methods and techniques. *Food quality and preference*, 16(3), 181-201.



## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS DO TRABALHO

Este trabalho possibilitou gerar diversas conclusões, dentre elas verificou-se que o ultrassom foi eficiente na extração de compostos antioxidantes do alecrim-do-campo. A otimização do processo de extração possibilitou a obtenção de um maior rendimento de compostos fenólicos quando comparado aos trabalhos encontrados na literatura para esta matéria-prima. No caso da microencapsulação por *spray drying*, observou-se que as micropartículas do alecrim-do-campo se mostraram mais eficiente na liberação de compostos de interesse ao longo do armazenamento do extrato. Apesar desses dados, identificou-se que a própolis verde apresentou resultados superiores de capacidade antioxidante quando comparada ao extrato otimizado de sua fonte. Quando microencapsulado, o extrato de própolis verde apresentou os melhores resultados de liberação controlada e retenção de compostos ao longo do *shelf life* em comparação ao seu extrato de alimentação e ao extrato e pó de alecrim-do-campo.

Analisando a própolis verde e o alecrim-do-campo em suas duas formas (líquido e pó) de acordo com a análise sensorial, verificou-se que ambas têm capacidade de serem aplicadas como antioxidantes naturais sem provocar grandes influências sob o aroma, textura e aparência de maioneses. Por fim, dentre os atributos esperados em uma amostra ideal estava o atributo própolis, portanto, a própolis verde (principalmente as micropartículas) pode ser uma grande proposta de utilização como antioxidante natural em alimentos.

## SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se que mais estudos sejam realizados utilizando maiores concentrações dos antioxidantes em forma de extrato ou micropartículas do alecrim-do-campo e da própolis verde com base em análises de *shelf life* e estabilidade oxidativa. Além disso, investigações podem ser feitas utilizando uma combinação de ambas as matérias primas microencapsuladas para avaliação de seu efeito antioxidante e sensorial quando aplicadas em alimentos. Estudos são encorajados para verificar a intensidade dos atributos sensoriais abordados em nosso estudo com maionese para compreensão dos fatores indesejáveis no produto final. Por fim, é sugerido que dados toxicológicos desses antioxidantes testados sejam fornecidos a partir das concentrações que seriam utilizadas nos alimentos.