



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA
DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS



COPRODUTO DA PRÓPOLIS COMO INIBIDOR DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM BISCOITOS DE POLVILHO

RODRIGO RODRIGUES

Pato Branco, março de 2021.

RODRIGO RODRIGUES

**COPRODUTO DA PRÓPOLIS COMO INIBIDOR DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM
BISCOITOS DE POLVILHO**

The propolis co-product as an inhibitor of lipid oxidation in starch

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito para obtenção do título de “Mestre em Tecnologia de Processo Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Profa. Dra. Solange Teresinha Carpes.

Coorientadora: Profa. Dra. Ellen Cristina Perin.

PATO BRANCO

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/)

Atribuição – Uso Não Comercial (CC BY-NC) - Permite que outros remixem, adaptem e criem obras derivadas sobre a obra licenciada, sendo vedado o uso com fins comerciais. As novas obras devem conter menção ao autor nos créditos e também não podem ser usadas com fins comerciais. Porém as obras derivadas não precisam ser licenciadas sob os mesmos termos desta licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco



RODRIGO RODRIGUES

COPRODUTO DA PRÓPOLIS COMO INIBIDOR DA OXIDAÇÃO LIPÍDICA EM BISCOITOS DE POLVILHO

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Processos Químicos E Bioquímicos.

Data de aprovação: 05 de Março de 2021

Prof.a Solange Teresinha Carpes, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof.a Ellen Cristina Perin, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Joao Paulo Bender, Doutorado - Universidade Federal da Fronteira Sul (Uffs)

Prof.a Rosana Oliveira Henriques, Doutorado - Universidade Federal de Santa Catarina (Ufsc)

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 12/03/2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelo dom da vida, por ser fonte de fé e perseverança pra alcançar sonhos que muitas vezes parecem impossíveis.

A minha esposa, Larissa Brand Back pelo amor, dedicação e compreensão, minha maior motivadora acreditou em mim até quando eu mesmo hesitava. Sonhamos, trabalhamos e evoluímos juntos, concluímos esta etapa iniciando uma jornada de surpresas e amor infinito com a chegada do nosso primogênito Miguel Back Rodrigues.

Aos meus pais, Lourival Ivo Rodrigues e Maria Tereza Schmitt Rodrigues por terem dedicado amor e suas vidas a nossa família, tendo abdicado de muitas coisas para que tivesse oportunidades que me fizessem chegar até aqui e poder ir mais além.

Aos irmãos/ãs, sogro/a, cunhados/as, sobrinhos/as, pelo carinho e compreensão diante da ausência que a dedicação aos estudos exigiu, elos de vida e amizade que nos deixam mais fortes.

As Professoras Dr^a. Solange T. Carpes e Dr^a. Ellen C. Perin, por serem parceiras e contribuir com meu desenvolvimento acadêmico e pessoal, agradeço a disponibilidade, orientações e aprendizado, ao Prof. Dr. Manoel S. V. P. Oviedo incentivador e parceiro deste projeto, são exemplos de dedicação e compromisso com o desenvolvimento das pessoas e da ciência.

As instituições de ensino superior, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Universidade Federal da Fronteira Sul e Instituto Federal do Rio Grande do Sul, através de seus servidores e pesquisadores são pilares no desenvolvimento da ciência, foram promotoras e mantenedoras deste trabalho.

Aos colegas da Coordenação Adjunta de Laboratórios-CLAB-CH da UFFS, por apoiar e suprir minha ausência durante período de afastamento para dedicar-me ao mestrado, por serem colegas e amigos que a vida nos trouxe.

Aos colegas de profissão Denise Bilibio (IFRS-RS-Sertão) e Leandro Guarezi Nandi (UFSC) pela troca de conhecimento.

Aos colegas do PPGTP com quem compartilhamos dúvidas, aprendizados e alegrias, encorajando uns aos outros tornaram o caminho mais leve e divertido.

Aos docentes pesquisadores do PPGTP pelos ensinamentos e dedicação.

RESUMO

RODRIGUES, Rodrigo. **Coproduto da própolis como inibidor da oxidação lipídica em biscoitos de polvilho. 2020. 93 f.** Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco - PR, 2020.

As propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, imunoestimuladoras e, em especial, antioxidante da própolis, são em grande parte devido à presença de compostos fenólicos. A correlação de compostos bioativos com propriedades antioxidantes da própolis e a manutenção destes no coproduto da extração comercial da própolis, estimulam estudos de aproveitamento do coproduto. Na área alimentícia, um dos desafios para o aproveitamento de potenciais propriedades antioxidantes do coproduto da própolis se insere na perspectiva de analisar seu emprego como inibidor da oxidação lipídica (OL) em produtos alimentícios constituídos por óleos ou gorduras e sujeitos a cocção. Desta forma, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da adição de extratos liofilizados (LFCP) e microencapsulados (MECP) do coproduto da própolis na inibição da oxidação lipídica de biscoitos de polvilho feitos com óleo de canola. Para isso, foi realizada a extração hidro alcoólica do coproduto da própolis e, à partir deste, foram preparados os extratos liofilizado (LFCP) e microencapsulado por secagem em spray dryer (MECP), os quais foram adicionados aos biscoitos de polvilho. Desta forma, quatro formulações de biscoito de polvilho foram elaboradas, as quais diferem-se em função do antioxidante empregado: F1 – biscoito de polvilho controle isento de antioxidante; F2 - biscoito de polvilho contendo butil hidroxitolueno (BHT); F3 - biscoito de polvilho contendo extrato microencapsulado do coproduto de própolis (MECP); e F4 biscoito de polvilho contendo o extrato liofilizado de coproduto de própolis (LFCP). O potencial antioxidante dos extratos foram avaliadas pelo método do sequestro dos radicais livres (ABTS e DPPH) e pelo poder redutor do ferro (FRAP). Além disso, os compostos fenólicos dos extratos foram identificados por cromatografia líquida de alta eficiência com ionização por eletro *spray* acoplada à espectrometria de massas (HPLC-ESI-MS). A produção de malonaldeído (MDA), produto da oxidação lipídica (OL) pelo método de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e o perfil dos ácidos graxos determinado por cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização em chama (GC-FID) foram avaliados nos biscoitos quinzenalmente, durante 45 dias de armazenamento em temperatura ambiente (25 °C). Os extratos LFCP e o MECP apresentaram teor de compostos fenólicos totais de 199,78 e 69,28 mg EAG/g de amostra (EAG: equivalente em ácido gálico), respectivamente. O extrato LFCP apresentou atividade antioxidante superior aos valores alcançados pelo extrato MECP por todos os métodos empregados. O processo de microencapsulação apresentou boa eficiência, igual a 62,97%. Esse resultado demonstra que os parâmetros do processo e o material encapsulante empregados foram adequados. A caracterização dos compostos fenólicos pela análise em HPLC-ESI-MS permitiu identificar três compostos fenólicos (ácido cumárico, pirocatecol e ácido siríngico), compostos já citados em estudos de caracterização da própolis. Por meio da análise de ácidos graxos por GC-FID foi possível identificar principais ácidos graxos presentes no óleo de canola (C16:0, C18:0, C18:1n-9, C18:2n-6 e C18:3n-3), pelos quais infere-se positiva a verificação da manutenção dos teores destes com o tempo de armazenamento. Além disso, os

valores de TBARS encontrados nos biscoitos de polvilho e o perfil dos ácidos graxos observados nas amostras durante o tempo de armazenamento ensejam efeito positivo da aplicação dos LFCP e MECP na inibição da oxidação lipídica.

Palavras-chave: Coproduto da própolis, Oxidação Lipídica, Spray drying, Biscoito de polvilho.

ABSTRACT

RODRIGUES, Rodrigo. Propolis co-product as an inhibitor of lipid oxidation in starch biscuits. 2020. 93 f. Dissertation (Master in Chemical and Biochemical Process Technology) - Federal Technological University of Paraná, Pato Branco - PR, 2020.

The anti-inflammatory, antimicrobial, immunostimulating and, in particular, antioxidant properties of propolis, are largely due to the presence of phenolic compounds. The correlation of bioactive compounds with propolis's antioxidant properties and, the maintenance of these in the coproduct of the commercial extraction of propolis, stimulate studies on the use of the coproduct. In the area of food, one of the challenges for taking advantage of the potential antioxidant properties of the propolis co-product is to be considered in the perspective of analyzing its use as a lipid oxidation (OL) inhibitor in food products made up of oils or fats and subject to cooking. Thus, the objective of this study was to evaluate the effects of the addition of lyophilized (LFCP) and microencapsulated (MECP) extracts of the propolis co-product on the inhibition of the lipid oxidation of starch biscuits made with canola oil. For this, the hydroalcoholic extraction of the propolis co-product was carried out and, from this, lyophilized extracts (LFCP) and microencapsulated by spray drying (MECP) were prepared, which were added to the starch biscuits. In this way, 4 formulations of polvilho biscuit were elaborated, which differ according to the antioxidant employed: F1 - polvilho biscuit free of antioxidant (control); F2 - starch biscuit containing butyl hydroxytoluene (BHT); F3 - starch biscuit containing microencapsulated extract of the propolis co-product (MECP); and F4 - starch biscuit containing the lyophilized extract of propolis by-product (LFCP). The antioxidant potential of the extracts was evaluated by the method of free radical scavenging (ABTS and DPPH) and by the iron reducing power (FRAP). In addition, the phenolic compounds in the extracts were identified by high performance liquid chromatography with electrospray ionization coupled to mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). The production of malonaldehyde (MDA), a product of lipid oxidation (OL) by the method of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and the fatty acid profile determined by gas chromatography coupled to the flame ionization detector (GC-FID) were evaluated in the cookies fortnightly, during 45 days of storage at room temperature (25 °C). The LFCP and MECP extracts had a total phenolic compound content of 199.78 and 69.28 mg EAG g⁻¹ of sample (EAG: equivalent in gallic acid), respectively. The LFCP extract showed antioxidant activity superior to the values achieved by the MECP extract by all the methods employed. The microencapsulation process showed good efficiency, equal to 62.97%. This result shows that the process parameters and the encapsulating material used were adequate. The characterization of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS analysis allowed the identification of three phenolic compounds (cumáric acid, pyrocatechol and siringic acid), compounds already mentioned in propolis characterization studies. Through the analysis of fatty acids by GC-FID it was possible to identify the main fatty acids present in canola oil (C16:0, C18:0, C18:1n-9, C18:2n-6 and C18:3n-3), by which the verification of the maintenance of their contents with the storage time is positive. In addition, the TBARS values found in the starch biscuits and the fatty acid profile observed in the samples during the storage period give rise to a positive effect of the application of LFCP and MECP in the inhibition of lipid oxidation.

Keywords: Propolis co-product, Lipid oxidation, Spray drying, Polvilho biscuit.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia de diferentes estruturas de microcápsulas	21
Figura 2 - Ácidos fenólicos derivados de Ácidos Hidroxibenzóicos e Hidroxicinâmicos.	23
Figura 3 - Mecanismos relacionados atividade antioxidante.	29
Figura 4 - Ácido graxos: saturado (a-palmitico (C16), b-esteárico (C18)); ácido graxo monoinsaturado (c-ácido oleico (C18:1n-9)); ácidos graxos insaturados (d-linoleico (C18:2n-6), e-linolênico (C18:3n-3)).	33
Figura 5 - Representação da autooxidação lipídica em alimentos.....	35
Figura 6 - Reação de formação do composto cromogênio resultante do teste de TBA.	38
Figura 7 – Equipamento Spray Dryer (Labmaq – LM MSD 1.0)	45
Figura 8 - Microestrutura MECP (Ampliação: 800X).....	59
Figura 9 - Recorte Microestrutura MECP (Ampliação: 1000X).....	59
Figura 10 - Teor de malonaldeído (MDA) em diferentes formulações de biscoitos de polvilho durante armazenamento a temperatura ambiente.	66
Figura 11 – Variação do % de lipídios para F1, F2, F3 e F4 durante o armazenamento.....	69
Figura 12 - Ácidos Graxos identificados em F1, F2, F3 e F4 durante armazenamento	71
Figura 13 - Ácidos Graxos Totais, AGS, AGMI, AGPI e AGPI/AGS em F1, F2, F3 e F4 durante armazenamento.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alguns substituintes em Ácidos fenólicos.....	23
Tabela 2 - Algumas subclasses de flavonoides	24
Tabela 3 - Teor de Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante para estudos de própolis	26
Tabela 4 - Compostos Fenólicos identificados em própolis por meio de HPLC.....	27
Tabela 5- Estudos de oxidação lipídica em alimentos pelo método de TBARS.....	39
Tabela 6 - Composição percentual dos ácidos Graxos em óleo de canola na literatura.....	41
Tabela 7- Concentração de metanol (Fase móvel B) em função do tempo (%).....	49
Tabela 8 - Porcentagem mássica dos ingredientes para formulação dos biscoitos de polvilho.....	52
Tabela 9 – Formulações dos Biscoitos de Polvilho conforme adição de antioxidante	53
Tabela 10 - Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos LFCP e MECP.....	60
Tabela 11 - Compostos fenólicos identificados por HPLC-MS em amostras de LFCP e MECP.....	63
Tabela 12 – Valores médios de TBARS em biscoitos de polvilho armazenados em temperatura ambiente ($23 \pm 3^{\circ}\text{C}$) por 45 dias	65
Tabela 13 - Teor de lipídios totais extraídos dos biscoitos durante armazenamento	68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estrutura química de BHA, BHT, TBHQ e PG.	30
Quadro 2 - Vantagens e desvantagens dos antioxidantes sintéticos e naturais	31

LISTA DE SIGLAS

MECP	Extrato Microencapsulado do Coproduto da Própolis
LFCP	Extrato Liofilizado do Coproduto da Própolis
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná
UFFS	Universidade Federal da Fronteira Sul
HPLC-ESI-MS/MS	Cromatografia Líquida de alta eficiência com ionização por eletro <i>spray</i> acoplada à espectrometria de massas
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil, α -difenil- β -picrilhidrazil
ABTS	ácido (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
FRAP	Poder Antioxidante de Redução do Ferro
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massa
GC-FID	Cromatografia Gasosa acoplada ao detector de ionização em chama
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
BHT	Butil hidroxitolueno
BHA	Butil hidroxianisol
TBHQ	Terc-butil-hidroxiquinona
PG	Propil galato
IV	Infravermelho
IFRS	Instituto Federal do Rio Grande do SUL
RMN	Ressonância Magnética nuclear
TBA	Ácido 2-Tiobarbitúrico
MDA	Malonaldeído
PV	Oxidados primários
AV	Oxidados secundários
IPA	Índice de p-anisidina
aw	Atividade de água
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
SC	Santa Catarina
F1	Biscoito de Polvilho isento de antioxidante
F2	Biscoito de Polvilho formulado com BHT

F3

Biscoito de Polvilho formulado com LFCP

F4

Biscoito de Polvilho formulado com MECP

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivo Geral	17
2.2 Objetivos específicos	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 Própolis e coproduto da própolis	18
3.2 Microencapsulação por <i>spray drying</i>	19
3.3 Compostos fenólicos	22
3.4 Própolis e coproduto da própolis: seus compostos fenólicos	24
3.4.1 Própolis e coproduto da própolis: propriedades antioxidantes	28
3.5 Lipídios	32
3.5.1 Óleo de canola e a oxidação lipídica em alimentos	33
3.6 Biscoitos de polvilho.....	36
3.7 Métodos para acompanhamento da oxidação lipídica	37
4 MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Materiais	42
4.2 Métodos	42
4.2.1 Preparo do extrato liofilizado do coproduto da própolis (LFCP)	43
4.2.2 Preparo do extrato microencapsulado de coproduto de própolis (MECP)	44
4.2.2.1 Preparo da Emulsão	44
4.2.2.2 Secagem por atomização	45
4.2.3 Análise da eficiência da microencapsulação (%)	46
4.2.3.1 Compostos fenólicos de superfície (TFS)	46
4.2.3.2 Compostos fenólicos encapsulados (TFE)	47
4.2.4 Compostos fenólicos totais	47
4.2.5 Estrutura e morfologia do MECP	48
4.2.6 Atividade de água do MECP	48
4.2.7 Caracterização dos extratos (LFCP e MECP) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	48
4.2.8 Análises de Atividade Antioxidante	50
4.2.8.1 Sequestro do radical DPPH.....	50
4.2.8.2 Sequestro do radical ABTS	51

4.2.8.3 Atividade antioxidante total pelo método de redução do Ferro - FRAP.....	51
4.2.9 Elaboração do Biscoito de Polvilho	52
4.2.10 Avaliação da oxidação lipídica em biscoitos de polvilho	54
4.2.10.1 Teor de Substâncias Reativas ao Ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS).....	54
4.2.10.2 Extração de lipídios e determinação da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa.....	55
4.2.10.3 Determinação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa.....	55
4.2.11 Análise estatística	56
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 Eficiência do processo de microencapsulação	57
5.2 Morfologia e atividade antioxidante do (MECP).....	58
5.3. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos LFCP e MECP	60
5.4 Identificação de compostos fenólicos (HPLC-ESI-MS)	62
5.5 Avaliação da oxidação lipídica dos biscoitos de polvilho	65
5.5.1 Análise da substância reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	65
5.5.2 Análise dos ácidos graxos por GC-FID	68
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	75
8 REFERÊNCIAS.....	77
9 APÊNDICES	89

1. INTRODUÇÃO

Durante o beneficiamento da própolis em escala industrial é gerado um coproduto (resíduo), uma borra sólida que é sedimentada nos tanques de produção do extrato, a qual é retirada e seca a temperatura ambiente (48 h), gerando o coproduto de própolis (FRANCISCO et al., 2018; REIS et al., 2017).

Na obtenção do produto comercial, Heimbach et al. (2014) menciona que apenas 10% do extrato bruto da matéria prima da própolis são aproveitados, os 90% restante acabam sendo dispensados ou empregados na melhoria da nutrição animal.

Buscar um melhor proveito da própolis através do seu coproduto, se baseia no potencial dos seus constituintes fenólicos (FRANCISCO et al., 2018), que por suas características físicas e químicas (POBIEGA *et al.*, 2019) apresentam ação antioxidante e antimicrobiano (ALMEIDA et al., 2017; REIS et al., 2017).

Na perspectiva de aproveitamento do coproduto da própolis, considera-se que a indústria alimentícia, de cosméticos e farmacêutica podem se valer do uso de compostos bioativos provenientes de subprodutos/resíduos com grandes perspectivas de êxito, uma vez que tem procurado obter melhor proveito econômico desse rejeito (TSALI; GOULA, 2018, GÓMEZ et al., 2018).

Um dos desafios para o uso da própolis solúvel em álcool em alimentos, se deve ao aroma residual característico da própolis (NORI et al., 2011; SPINELLI et al., 2015). Além disso, muitos compostos fenólicos têm por característica ser facilmente oxidados, processo que evidencia aspectos organolépticos não desejáveis da sua cor e odor, além da redução do seu potencial antioxidante (TSALI; GOULA, 2018, REIS et al., 2017).

As limitações decorrentes das características marcantes do sabor e odor da própolis e do seu coproduto, podem ser mitigadas por meio da microencapsulação de seus extratos, uma vez que pode diminuir a suscetibilidade dos compostos fenólicos possibilitando o uso em produtos alimentícios (REIS et al., 2017) e farmacêuticos (NORI et al., 2011).

Grande parte dos alimentos são constituídos por óleos e gorduras, estes compõem os principais ingredientes em formulações de biscoitos e bolachas, e tem como característica conferir aspectos marcantes quanto ao sabor, textura, aparência, além de fonte energética. Entretanto, o processo de oxidação lipídica ao

qual estão sujeitos óleos e gorduras, afeta as propriedades dos alimentos, sendo recorrente o uso de antioxidantes sintéticos como BHT, BHA e TBHQ (Butil hidroxitolueno, Butil hidroxianisol e Terc-butil-hidroxiquinona) que, em geral, também são referenciados por seus efeitos nocivos à saúde (FENNEMA et al., 2010; SHAHIDI; ZHONG, 2010b; LI et al., 2015; NOOSHKAM et al., 2019).

Considerando os processos oxidativos de lipídios em alimentos, as tentativas de aproveitar potencial antioxidante do coproduto da própolis (REIS et al., 2017), representam mais uma alternativa frente aos efeitos colaterais que antioxidantes sintéticos causam a saúde humana, por isso, pesquisas têm buscado por alternativas naturais para esses aditivos sintéticos (REIS et al., 2017; TSALI; GOULA, 2018).

Desta forma, em face as propriedades antioxidantes associadas a própolis o aproveitamento do coproduto de própolis, microencapsulado e liofilizado, pode representar alternativa natural na inibição da oxidação lipídica em produtos alimentícios constituídos por óleos e gorduras, neste contexto, biscoitos de polvilho formulados com óleo de canola podem representar uma boa via de análise.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de aplicação de extratos microencapsulados (MECP) e liofilizados (LFCP) do coproduto da extração comercial da própolis, como antioxidante natural na prevenção da oxidação lipídica em biscoitos de polvilho.

2.2 Objetivos específicos

- Preparar os extratos do coproduto da própolis para a liofilização e a microencapsulação;
- Realizar a liofilização e a microencapsulação do extrato hidroalcoólico do coproduto da própolis por atomização em *spray dryer*;
- Analisar o aspecto físico do material microencapsulado sua morfologia e tamanho de partícula (MEV);
- Avaliar o rendimento e eficiência da microencapsulação por meio da análise do conteúdo fenólico total (CFT);
- Identificar os compostos fenólicos presentes no LFCP e MECP (HPLC-ESI-MS);
- Analisar a atividade antioxidante dos extratos LFCP e MECP;
- Elaborar os biscoitos de polvilho contendo os extratos LFCP e MECP;
- Analisar a inibição da oxidação lipídica em biscoitos de polvilho elaborados com o LFCP, MECP e BHT através das análises de T-BARS e análise de ácidos graxos por GC-FID.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Própolis e coproduto da própolis

A própolis é constituída em grande parte da resina coletada pelas abelhas em ramos, flores, folhas, secreções em caules e troncos de diversos vegetais, além de ceras, óleos e outros microelementos. A ação enzimática salivar das abelhas somada aos metabólitos de defesa vegetal, ao néctar e ao pólen são responsáveis pelas características da própolis produzida pelas abelhas, sendo utilizado como recurso na defesa da colmeia contra pragas e patógenos (BANKOVA 2005, BANKOVA et al., 2018; OLDONI et al., 2015; CABRAL et al., 2009; SIMONE-FINSTROM et al., 2017, JANSEN-ALVES et al., 2018).

O interesse pelas propriedades antioxidante e antimicrobiana da própolis é objeto de vários estudos, com vistas identificar e otimizar sua aplicação isolada ou como coadjuvante na formulação de alimentos (REIS et al., 2017), cicatrizante (JACOB et al., 2015), anti-inflamatória e fungicida (BÚFALO et al., 2013; BÚFALO et al., 2014) e imunomoduladora (ORŠOLIĆ et al., 2004).

O coproduto da própolis se refere à um subproduto do beneficiamento da própolis, sua correlação quanto à composição físico química e o conteúdo fenólico com a própolis de origem (FRANCISCO et al., 2018) suscita a possibilidade de se avaliar o aproveitamento da mesma (REIS et al., 2017; HEIMBACH et al., 2014; FRANCISCO et al., 2018).

Além da correlação da manutenção da composição físico-química da própolis em seu coproduto, estima-se a manutenção de suas propriedades antioxidante, decorrente dos compostos fenólicos presente em ambos. Neste viés, a busca na implementação de práticas sustentáveis, redução da emissão e descarte de resíduos dos processos industriais, visando mitigar os efeitos destes no meio ambiente (FRANCISCO et al., 2018), corroboram com estudo para o aproveitamento do coproduto da própolis.

Francisco et al. (2018) acrescenta que as alterações decorrentes da vida moderna, a demanda por alimentos, e evolução dos processos industriais de elaboração e meios de produção dos alimentos impactam no perfil alimentar e no consumo, sendo imprescindível que se pense em alternativas sustentáveis (reduzir,

reutilizar e reciclar) para suprir as necessidades bem como para o melhor aproveitamento e disponibilidade dos alimentos e de seus nutrientes.

As expectativas no aumento da produção da própolis, bem como inúmeros estudos que versam acerca da elaboração de plásticos filme com resíduo da extração de própolis, desenvolvimento de sistemas lipídicos nano estruturados contendo resíduo da própolis no tratamento de feridas, estudo do efeito da adição do coproduto da própolis na dieta de ruminantes bem como do emprego do coproduto da própolis microencapsulada na conservação de hambúrgueres (FRANCISCO et al., 2018; TOLEDO et al., 2015; ROSSETO et al., 2017, REIS et al., 2017), servem de fomento ao presente estudo que também visa ampliar as possibilidades de aproveitamento de coproduto de origem natural.

3.2 Microencapsulação por *spray drying*

Aspectos sensoriais característicos da própolis e do seu coproduto bem como a degradação dos compostos fenólicos podem comprometer o emprego do coproduto da própolis (NORI et al., 2011; SPINELLI et al., 2015; TSALI GOULA, 2018; REIS et al., 2017), tais aspectos sugerem e requerem a realização de processos que promovam a conservação dos compostos químicos suscetíveis, neste sentido, a microencapsulação se apresenta como alternativa à preservação destes.

A técnica de microencapsulação consiste em revestir compostos de interesse dentro de uma ou mais matrizes encapsulante de modo a constituir uma cápsula protetora, em geral, com alguns micrômetros de diâmetro (YE et al., 2018). A microencapsulação tem por objetivo envolver as substâncias de interesse com o intuito de impedir o contato desta com o meio externo, preservando-a (GHARSALLAOUI et al., 2007; BAKRY et al., 2016).

A microencapsulação por *spray drying*, secagem por pulverização ou secagem por atomização, refere-se à um processo no qual há a secagem de um líquido (emulsão) onde estão presentes o encapsulante e o material a ser revestido (núcleo). Em geral, o encapsulamento de compostos bioativos, seja para aplicação em estado líquido ou como pó (secos), é precedido pelo preparo de emulsão contendo o óleo ou extrato a ser encapsulado com o material de revestimento (BAKRY et al., 2016; GÓMEZ et al., 2018).

Após preparo da emulsão (nucleo + encapsulante), a mesma é pulverizada passando por um atomizador em contato com um gás inerte ou ar sob pressão, num fluxo corrente ou contra-corrente de ar (GHARSALLAOUI et al., 2007; GÓMEZ et al., 2018).

A microencapsulação pode ser realizada por diferentes procedimentos físicos (extrusão por centrifugação, liofilização, *spray-cooling*, *spray drying*, fluido supercrítico), químicos (complexação intra molecular, polimerização intrafacial) e físicos-químicos (coacervação, geleificação iônica) (GHARSALLAOUI et al., 2007; OZKAN et al., 2019; BANSODE et al., 2010).

Processo de revestimento por *spray drying* contribui para mascarar aromas marcantes e indesejáveis, promover a estabilidade e disponibilidade por meio da liberação controlada (JANSEN-ALVES et al., 2018), manutenção das propriedades físicas, químicas e funcionais do material encapsulado (YE et al., 2018, NORI et al., 2011).

Bansode et al. (2010) acrescenta também que a microencapsulação pode ser empregada de modo minimizar efeitos tóxicos de produtos químicos e a incompatibilidade na formulação de fármacos.

O processo de encapsulação em *spray dryer* resulta em material em pó, que tem por característica apresentar baixa atividade de água, em virtude disso, favorece a manipulação, embalagem e armazenamento para comercialização (SILVA et al., 2014), agregando valor aos elementos encapsulados (REIS et al., 2018).

A temperatura de entrada/secagem, o fluxo de alimentação da emulsão e do gás (ar), o material de revestimento, a direção da corrente, bem como as fases de preparo, homogeneização e dispersão da solução (emulsão/dispersão) no atomizador, interferem nas propriedades dos pós obtidos no processo de secagem por pulverização (SCHOUBBEN et al., 2010; GHARSALLAOUI et al., 2007).

A avaliação do encapsulante deve levar em consideração a estabilidade proporcionada ao material encapsulado, o material envoltório deve ser inerte, não aglutinar, atóxico e de baixo custo, as interações entre ambos, núcleo e revestimento, a solubilidade, higroscopicidade, flexibilidade do conjunto deve ocorrer de tal modo alcançar resultados satisfatórios em relação a aplicação e a disponibilização do material nucleado (BANSODE et al., 2010; YE et al., 2018).

Em decorrência dos aspectos e parâmetros mencionados anteriormente, resultam diferenças de tamanho de partículas, uma vez que estes interferem na taxa

de redução do material (SILVA et al., 2013), no modo e tempo com que os elementos nucleados serão disponibilizados (LABUSCHAGNE, 2018), bem como nas características morfológicas do material e seu emprego (BAKRY et al., 2016; GÓMEZ et al., 2018; GHARSALLAOUI et al., 2007).

Os materiais encapsulados provenientes do processo de microencapsulação por *spray drying*, em geral, são identificados de acordo com a forma que o material a ser encapsulado e o envoltório se distribuem no complexo formado por estes, como exemplificado na Figura 2 (ESTEVINHO et al., 2013). O material revestido pode assumir formas do tipo cápsulas, quando o mesmo se encontra nucleado e revestido pelo encapsulante ou na forma de esferas quando os compostos de interesse se encontram distribuídos no material encapsulante (GÓMEZ et al., 2018). A quantidade de material encapsulado e a sua liberação no meio de interesse está associada à distribuição dos compostos bioativos na parede e no interior das microcápsulas, espessura e permeabilidade dessas microcápsulas (GHARSALLAOUI et al., 2007; SILVA et al., 2013).

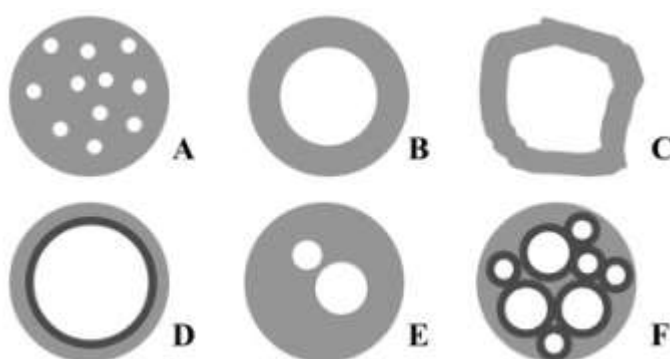


Figura 1 - Morfologia de diferentes estruturas de microcápsulas

Fonte: Estevinho et al. (2013).

Legenda: A - Matricial, B - revestimento simples, C - microcápsula irregular, D - múltiplo revestimento, E - múltiplos núcleos; F - agregado de microcápsulas revestidas.

O uso de amido de goma arábica associado ao anidrido octenil succínico como meios de obtenção da própolis seca e livre de álcool resulta em material estável quando conservado em temperatura ambiente, com baixa absorção de umidade e elevada dispersibilidade em água a temperaturas abaixo da temperatura ambiente, mantendo as propriedades antioxidantes do extrato da própolis (SILVA et al., 2013). Um ajuste ideal do teor de sólidos associado ao material encapsulante

impacta na retenção dos componentes, rendimento e teor de absorção de umidade no pó obtido (RAJABI et al., 2015).

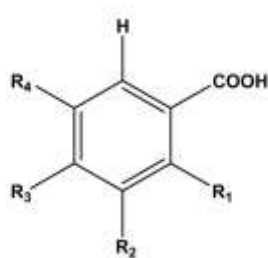
No contexto do aproveitamento de compostos presentes na própolis, Nori et al. (2011) e Reis et al. (2017) em seus trabalhos com microencapsulação de extratos de própolis e do coproduto da própolis, respectivamente, em *spray dryer*, constataram que a técnica empregada pode ser considerada como opção para a conservação dos compostos bioativos voláteis presentes na própolis.

3.3 Compostos fenólicos

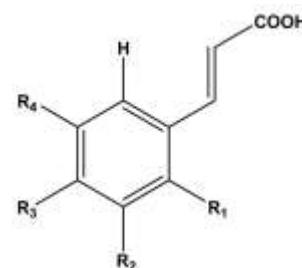
Os compostos fenólicos presentes em própolis estão relacionados às fontes botânicas nas quais as abelhas extraem seus nutrientes (PARK et al., 2004; BANKOVA et al., 2018; FRANCISCO et al., 2018), representam metabólitos especializados de espécies vegetais associados mecanismos de preservação e defesa das plantas (GARCIA-SALAS et al., 2010; ESCARPA; GONZALEZ, 2001).

Os compostos fenólicos são substâncias orgânicas que possuem estrutura química característica constituída por anel aromático, podem ter suas hidroxilas substituídas, por exemplo, por ésteres, metil ésteres, mono ou polissacarídeos, resultando em uma grande variedade de compostos com diferentes estruturas (HARBORNE et al., 1999; ESCARPA; GONZALEZ, 2001).

A variedade dos ácidos fenólicos determinada pela variação das hidroxilas e dos substituintes, os ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos, exemplificados na Figura 2 e Tabela 1, são ácidos fenólicos resultantes de reações de desaminação (NH_3), hidroxilação (OH) e metilação (CH_3) de ácidos benzoicos e ácidos cinâmicos, resultam, por exemplo, em ácido ferrúlico e ácido cafeico, (HELENO et al., 2015; STALIKAS, 2007).



Ácidos Hidroxibenzóicos



Ácidos Hidroxicinâmicos

Figura 2 - Ácidos fenólicos derivados de Ácidos Hidroxibenzóicos e Hidroxicinâmicos.
Fonte: Adaptado de Stalikas (2007).

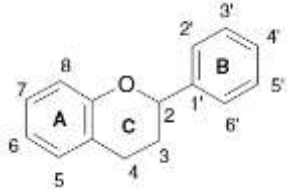
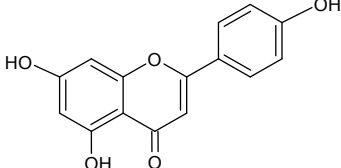
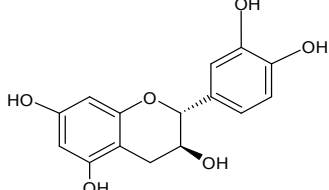
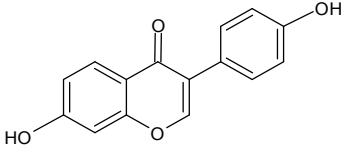
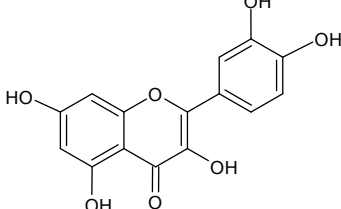
Tabela 1 – Alguns substituintes em Ácidos fenólicos.

Ácido	R1	R2	R3	R4	Ácido	R1	R2	R3	R4
Benzóico	H	H	H	H	Cinâmico	H	H	H	H
p-hidroxibenzóico	H	H	OH	H	o-Cumárico	OH	H	H	H
Vanílico	H	OCH ₃	OH	H	m-Cumárico	H	OH	H	H
Gálico	H	OH	OH	OH	p-Cumárico	H	H	OH	H
Siringico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	Ferrúlico	H	OCH ₃	OH	H
Verátrico	H	OCH ₃	OCH ₃	H	Sinápico	H	OCH ₃	OH	OCH ₃
Salicílico	OH	H	H	H	Caféico	H	OH	OH	H

Fonte: Adaptado de Stalikas (2007).

Os flavonóides, também pertencentes ao grupo dos compostos fenólicos, Tabela 2, podem ser identificados por sua estrutura nuclear de flavano (2-fenil-benzo- γ -pirano) onde dois anéis benzênicos (A e B) são ligados por um anel pirano (C), podendo ser representada por C6-C3-C6. Os flavonóides representam maior percentual dos compostos fenólicos disponíveis, o estado de oxidação, hidroxilação e substituinte do C3 determina a subclasse nas quais os flavonóides são classificados, podem formar estruturas poliméricas complexas, como os taninos, não representados na tabela 2, mas que se referem ao grupo de compostos poliméricos, ou seja, condensados e hidrolisáveis (STALIKAS, 2007; GARCIA-SALAS et al., 2010; LEOPOLDINI et al., 2011).

Tabela 2 - Algumas subclasses de flavonoides

Número de Carbonos	Classes	Estrutura Básica
C6-C3-C6	Flavonoides – Estrutura Básica	
C6-C3-C6	Flavonas – Apigenina	
C6-C3-C6	Flavanol – Catequina	
C6-C3-C6	Isoflavonas - Daidzeína	
C6-C3-C6	Flavonóis - Quercetina	

Fonte: Adaptado de Stalikas (2007).

3.4 Própolis e coproduto da própolis: seus compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são constituintes comuns a vários tipos de própolis, Oldoni et al. (2015), em seus trabalhos de caracterização dos compostos fenólicos, provenientes da otimização do processo de extração dos compostos bioativos da própolis, identificou a presença de três ácidos fenólicos: ferrúlico, cafeico e p-cumárico.

Cabral et al. (2009) identificou nas frações de clorofórmio do extrato da própolis vermelha a presença do flavonoide quercetina e das isoflavonas, formononetina e daidzeína, além dos ácidos fenólico e ferrúlico. Veiga et al. (2017) através da análise por HPLC, identificou a presença de Artepillin C em extratos de

própolis e na espécie vegetal *Baccharis dracunculifolia*, tida como fonte originária da própolis.

A determinação da atividade antioxidante de produtos de origem natural por diferentes metodologias é essencial para dimensionar o potencial antioxidante das espécies de interesse (ALMEIDA et al., 2014). O emprego de métodos distintos de análise do perfil e potencial antioxidante estão associados ao aumento de pesquisas com antioxidantes naturais (PISOSCHI; NEGULESCU, 2012).

Os métodos mais empregados na determinação *in vitro* da capacidade antioxidante se referem ao sequestro/remoção de radicais livres pelos compostos antioxidantes dos complexos biológicos de interesse, dentre os quais podemos citar a análise por redução férrica (FRAP), que se baseia na determinação da capacidade do antioxidante em reduzir Fe^{3+} complexado por 2,4,6- tripiridil-s-triazina (TPTZ) a Fe^{2+} (BENZIE; STRAIN, 1996; APAK et al., 2013; JONES et al., 2017; RUFINO et al., 2006).

Além da análise de FRAP, análise de radicais como a redução do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil, α -difenil- β -picrilhidrazil) (DPPH $^{\bullet}$), e sequestro do radical ABTS $^{+\bullet}$ estão baseados também na redução destes radicais em relação a ação de um antioxidante referência, muitas vezes o Trolox. Em decorrência da ação do antioxidante observa-se alteração da coloração do meio, sendo a absorbância aferida por espectrofotometria em comprimento de onda específicos para cada metodologia (GIADA, 2014; APAK et al., 2013; RUFINO et al., 2006; RUFINO et al., 2007).

O emprego do método de determinação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência permitem identificar e quantificar os compostos fenólicos presentes em extratos de própolis, sendo amplamente empregados (REIS et al., 2017; ANDRADE et al., 2017; JANSEN-ALVES et al., 2019).

Na Tabela 3 são apresentados resultados para análise do teor de compostos fenólicos e de análises da atividade antioxidante para amostras de própolis e coproduto da própolis em extratos não encapsulados e encapsulado encontrados na literatura.

Tabela 3 - Teor de Compostos Fenólicos e Atividade Antioxidante para estudos de própolis

Autor	Amostra	Fenólicos (mgEAG g ⁻¹)	FRAP (μmolFe ²⁺ g ⁻¹)	ABTS (μmol Trolox g ⁻¹)	DPPH	
Oldoni et al. (2015)	Extrato Etanólico de Própolis	2,42 a 5,75	259,30	95,88	31,6 a 87,5	
Calegari et al. (2017)	Extratos de própolis (2013-2015)	5,36 a 48,2	89,7 a 1041,0	25,5 a 439,2	11,8 a 235,6	
Francisco et al. (2018)	Extrato de própolis verde (PRP)	100,7	1536,40	-	-	
-Francisco et al. (2018)	Subproduto de própolis (WP)	97,83	1273,35	-	-	
Tiveron et al. (2016)	Extratos de variedades orgânicas de própolis	17,59 a 79,84	-	290,0 a 1240,0	10,0 a 380	
Cottica et al. (2011)	Amostras de própolis secas por pulverização	48 a 87	528 a 1365	-	-	
Andrade et al. (2017)	Própolis	Verde	90,55	604,20*	2214,96	4454,35
		Marrom	55,74	471,51*	1868,45	4431,00
		Vermelha	91,32	633,18*	2913,15	4663,80
Andrade et al. (2018)	Própolis encapsulada em Goma-arábica	Verde	47,95	396,09	13044,48	22843,83
		Marrom	28,35	213,76	15042,12	23183,45
	Própolis encapsulada em Maltodextrina	Vermelha	39,51	326,39	10623,48	24047,49
		Verde	48,38	293,49	15106,07	24461,65
Reis et al. (2017)	Coproduto de própolis microencapsulado em amido modificado (Capsul [®])	Marrom	23,36	144,87	11955,42	23096,41
		Vermelha	45,94	235,61	12,994,33	24685,82
		-	-	3,39	71,84	2,31
Jansen-Alves et al. (2019)	Microcápsulas de Própolis em Proteína de Ervilha	-	34,14 a 129,31*	-	16,53 a 19,09	
Busch et al. (2017)	Sistema própolis-maltodextrina sem goma arábica	1,67	10,7 ^a	-	0,58 ^b	
	Sistema própolis-maltodextrina com goma vinal	1,70	12,5 ^a	-	0,55 ^b	
	Sistema própolis-maltodextrina com goma arábica	2,60	14,7 ^a	-	0,79 ^b	

Fonte: Oldoni et al. (2015), Francisco et al. (2018), Tiveron et al. (2016), Cottica et al. (2011), Andrade et al. (2017), Andrade et al. (2018), Reis et al. (2017), Jansen-Alves et al. (2019), Busch et al. (2017), adaptado pelo autor.

Onde: * valores de atividade antioxidante expressos em $\mu\text{molTrolox g}^{-1}$ de amostra; a: valores de atividade antioxidante expressos em mM de $\text{FeSO}_4 \text{ g}^{-1}$ de amostra; b: valores de atividade antioxidante para DPPH em mgEAG g^{-1} .

Na Tabela 4 a seguir, são referenciados compostos fenólicos identificados em pesquisas com extratos de própolis e de coproduto de própolis.

Tabela 4 - Compostos Fenólicos identificados em própolis por meio de HPLC.

Autor	Tipo de amostra	Compostos (>concentração)	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$ de amostra)
Reis et al. (2017)	Coproduto da própolis encapsulado	Ácido Cafeico	150,27
		Ácido p-Cumárico	635,62
		Epicatequina	566,40
		Rutina, Ác. Ferúlico e Ác. Vanílico	112,53
Oldoni et al. (2015)	Extrato de Própolis	Ácido Cafeico	142,2
		Ácido Cumárico	370,5
		Ácido Ferúlico	154,4
Tiveron et al. (2016)	Própolis Orgânicas (PO4, PO5, PO7)	Ácido Gálico	2115,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PO7)
		Ácido Cafeico	466,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PO5)
		Ácido Cumárico	11635 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PO4)
		Pinocembrina	669,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PO7)
		Artepelin C	22303,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (PO4)
Yang et al. (2013)	Própolis Chinesa (2010)	Rutina	397,6
		Quercetina	643,3
		Luteolina	1170,0
		Ginesteína	844,5
		Galangina	2785
		Curcumina	14,0
		Ácido Cumárico	2640,0 (BP); 5340,0 (GP); 10,0 (RP)
Andrade et al. (2017)	Extratos de Própolis	Rutina	130,0 (BP); 160,0 (GP); 50,0 (RP)
		Kaempferol	610,0 (BP); 1480,0 (GP); 590,0 (RP)
		Quercetina-3-glucosideo	240,0 (BP); 450,0 (GP); <LQ (RP)
		Ácido Cafeico	590,0 (BP); 1060,0 (GP); <LQ (RP)
Andrade et al. (2018a) *	Própolis Microencapsuladas	Ácido Cumárico	1390,0 (BMD); 3005,0 (GMD); 1,0 (RMD)
		Rutina	40,0 (BMD); 50,0 (GMD); 10,0 (RMD)
		Kaempferol	220,0 (BMD); 440,0 (GMD); 20,0 (RMD)
		Quercetina-3-glucosideo	50,0 (BMD); 140,0 (GMD); <LQ (RMD)
		Ácido Cafeico	320,0 (BMD); 380,0 (GMD); <LQ (RMD)

Fonte: Reis et al. (2017), Oldoni et al. (2015), Tiveron et al. (2016), Yang et al. (2013), Andrade et al. (2018a)*, adaptado pelo autor.

BMD-Própolis marrom encapsulada com maltodextrina; GMD-Própolis verde encapsulada com maltodextrina; RMD-Própolis vermelha encapsulada com maltodextrina; BP-Própolis Marrom; GP-Própolis Verde; RP-Própolis Vermelha; LQ-limite de quantificação; * Somente alguns compostos fenólicos identificados em própolis encapsuladas com maltodextrina são relatadas na tabela acima.

3.4.1 Própolis e coproduto da própolis: propriedades antioxidantes

Os interesses no coproduto da própolis estão obviamente associados as propriedades já descritas e presentes na própolis, neste sentido, as semelhanças constatadas por Francisco et al. (2018) quanto ao conteúdo fenólico total, atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP), aspectos físicos e químicos, entre a própolis e seu coproduto, reforçam as possibilidades de aproveitamento do coproduto da própolis.

Em face das propriedades dos compostos fenólicos presentes na própolis (SPINELLI et al., 2015; POBIEGA et al., 2019) e em extratos do coproduto da própolis (REIS et al., 2014) suscita-se possibilidade de empregá-los na formulação de alimentos constituídos por óleos e gorduras, como antioxidantes na inibição da oxidação dos lipídeos (REIS et al., 2017).

O emprego de antioxidantes representa alternativa recorrente na inibição da oxidação lipídica de óleos, gorduras e de alimentos constituídos por estes, evitando a degradação, preservando a qualidade dos alimentos processados (REIS et al., 2017; SILVA et al., 1999; SHAHIDI; ZHONG, 2010). O empregos destes costuma estar associado a menor interferência nas características naturais dos alimentos (MADHAVI et al., 1996; RAMALHO E JORGE, 2006; NANDITHA; PRABHASANKAR, 2008).

O conceito de antioxidante pode ser estabelecido para qualquer substância que em concentrações menores que o substrato reduz ou impede a oxidação deste, Os antioxidantes podem ser classificados em vários mecanismos de ação: primário, secundário, sinergista, sequestrante, ou seja, que promovem a quebra da cadeia oxidativa ou reduzem a taxa de oxidação, respectivamente (MADHAVI et al., 1996; GUTTERIDGE, 1994; ANTOLOVICH et al., 2002; NANDITHA; PRABHASANKAR, 2008).

Os atributos da atividade antioxidante dos compostos fenólicos, não apenas no que se refere aqueles presentes na própolis e no seu coproduto, em geral, resultam da sua interação com compostos lipofílicos, vitaminas e das suas estruturas

químicas (anéis conjugados) que através das hidroxilas lhe permitem doar elétrons promovendo a inibição de radicais livres (BITTENCOURT et al., 2015).

O potencial da ação antioxidante dos compostos fenólicos está associado ao número de hidroxilas substituintes ligados ao anel aromático, mediante doação de hidrogênio estes compostos atuam como agentes redutores e inibidores do oxigênio singlete (EMBUSCADO, 2015; BALASUNDRAM et al., 2006), eliminando peróxidos e cessando a ação de radicais livres, como demonstrado no esquema da Figura 3. (LEOPOLDINI et al., 2011).

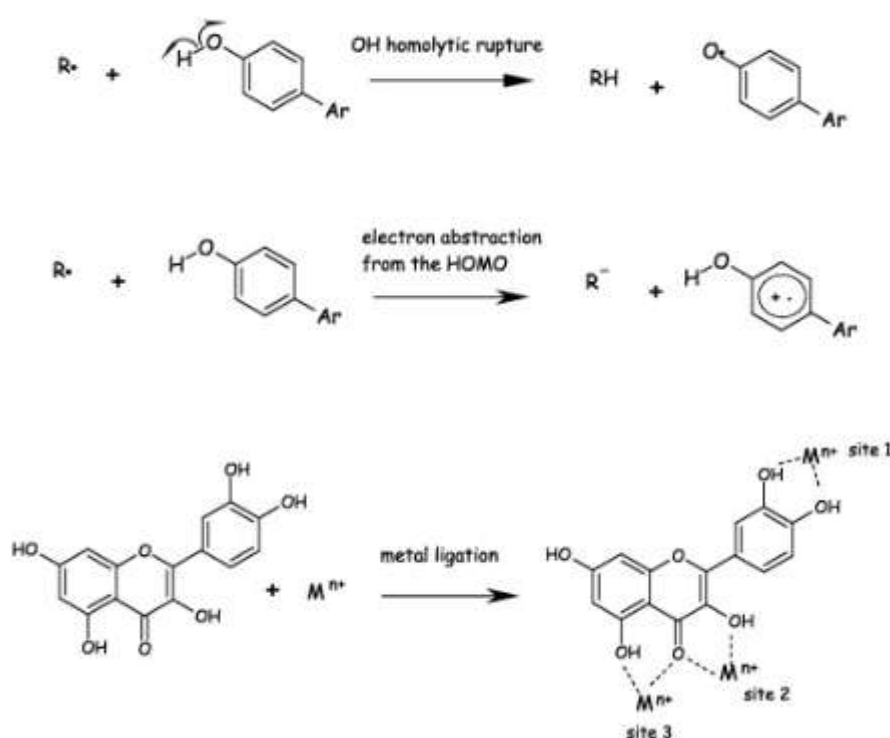


Figura 3 - Mecanismos relacionados atividade antioxidante.

Fonte: Leopoldini et al. (2011).

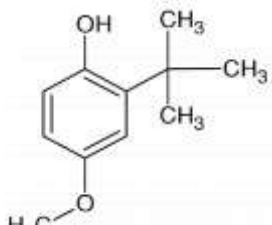
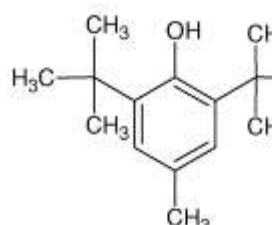
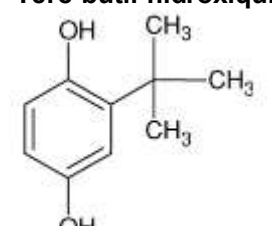
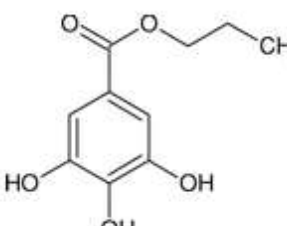
O uso de antioxidantes artificiais já foi relacionado a efeitos prejudiciais a saúde, associando-os a mutações do DNA, incidência de câncer e problemas no aparelho digestivo (SASAKI et al., 2002; SOUZA et al., 2019; WILLIAMS et al., 1999), esses aspectos reforçam as pesquisas que buscam alternativas em fontes naturais de antioxidantes (REIS et al. 2017; GONZÁLEZ-CENTENO et al., 2015).

Antioxidantes sintéticos empregados nas indústrias de alimentos estão presentes na dieta humana (ADEGOKE et al., 1998), dentre os quais podemos citar os mais usados, BHT (Butil hidroxitolueno), BHA (Butil hidroxianisol), TBHQ (Terc-

butil-hidroxiquinona) e PG (Propil galato), (RAMALHO; JORGE, 2006; ANTOLOVICH et al., 2002; NANDITHA; PRABHASANKAR, 2008).

Como apresentado no Quadro 1, antioxidantes como BHT, BHA, TBHQ e PG, assim como os compostos fenólicos, dispõem de estrutura fenólica que possibilita a doação de prótons na inibição de radicais livres. O TBHQ atua melhor em óleos vegetais, já o BHA desempenha melhor atividade antioxidante em óleos de origem animal. BHT, BHA, TBHQ e PG podem atuar com outros antioxidantes de forma sinérgica atuando na inibição da oxidação e sendo regenerados (MADHAVI et al., 1996; RAMALHO; JORGE, 2006; NANDITHA; PRABHASANKAR, 2008; NANDITHA; PRABHASANKAR, 2008).

Quadro 1 - Estrutura química de BHA, BHT, TBHQ e PG.

<p>BHA - Butil hidroxianisol</p>  <p>IUPAC: 3-terc-butil-4-hidroxianisol</p>	<p>BHT - Butil hidroxitolueno</p>  <p>IUPAC: 2,6-di terc-butil-p-cresol</p>
<p>TBHQ - Terc-butil-hidroxiquinona</p>  <p>IUPAC: 2-(1,1-Dimetiletil)-1,4-benzenodiol</p>	<p>Galato de propila</p>  <p>IUPAC: 3,4,5-tri-hidroxibenzoato de propila</p>

Fonte: Adaptado de Ramalho; Jorge (2006) e Nanditha; Prabhasankar (2008).

No Quadro 2 apresenta-se análise resumida acerca das vantagens e desvantagens dos antioxidantes sintéticos e naturais, neste sentido, o presente trabalho se dá de modo a analisar uma fonte alternativa dentre os antioxidantes naturais, por meio do coproduto da própolis, no controle da oxidação lipídica de biscoitos de polvilho.

Quadro 2 - Vantagens e desvantagens dos antioxidantes sintéticos e naturais

Antioxidantes sintéticos	
Vantagens	Desvantagens
Eficazes - mecanismo de ação consolidados Menor custo Maior estabilidade Purificação para uso mais simples	Relacionados com efeitos toxicológicas Interferência na aparência, sabor e aroma Crescente resistência dos consumidores Regulado pela FDA
Antioxidantes Naturais	
Maior aceitabilidade do consumidor São reconhecidamente mais seguros Toxicologia ainda não comprovada Pode atuar como corantes (β -caroteno)	Purificação mais cara Menor estabilidade Carece melhor definição da interação com substrato Menos resistente a variações de temperatura

Fonte: Adaptado de Barriuso et al. (2013), Madhavi et al. (1996) e Niki et al. (1996).

A legislação brasileira, Resolução N° 383, de 5 de agosto de 1999 (BRASIL, 1999) que regulamenta o uso de aditivos alimentares suas funções, estabelece a quantidade máxima de antioxidantes artificiais conforme o teor de gordura para produtos de panificação, biscoitos e similares com ou sem recheio, com ou sem cobertura, categoria na qual se enquadram biscoitos de polvilho (BRASIL, 1999). Conforme a legislação brasileira (BRASIL, 1999) o uso de BHA e TBHQ deve obedecer o limite máximo de 200 mg/kg de gordura, já o galato de propila e o BHT podem ser empregados com limite máximo de 100 mg/kg de gordura (BRASIL, 1999).

Quanto ao emprego da própolis com antioxidante natural em formulações de alimentos, este estudo observou que trabalho empregando uso de coproduto de própolis em alimento cárneo (hambúrgueres) submetido a conservação sob temperatura de $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ considerou uso de 300 mg Kg^{-1} de gordura (REIS et al., 2017). Também, extratos de própolis foram aplicados em salame italianos nas quantidades de 100 e 500 mg kg^{-1} de massa total de salame armazenados por 35 dias (KUNRATH et al., 2017). Extrato de alecrim, foram usados na quantidade de 200 mg Kg^{-1} de hambúrguer de frango refrigerado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 21 dias (PEREIRA et al., 2017).

3.5 Lipídios

Nutrientes indispensáveis à dieta humana, os lipídios além de fonte energética fundamental ao metabolismo dos organismos compõem a estrutura das membranas celulares (ORSAVOVA et al., 2015).

No que se refere à óleos e gorduras, estes são classificados de acordo com seu estado físico, sendo óleos quando líquidos em temperatura ambiente (abaixo de 20 °C) e gorduras quando no estado sólido. Sem distinção dos componentes menores como esteróis, carotenoides, ceras, glicosídeos e impurezas dentre outros, os lipídios são insolúveis em água e solúveis em solvente orgânicos (VISENTAINER;FRANCO, 2006; GUNSTONE, 2002; GIOIELLI, 1996; RAMALHO; SUAREZ, 2013).

A Resolução RDC-N° 270 da ANVISA que fixa a identidade e as características limites de qualidade para óleos, gorduras e cremes vegetais, define-se que óleos e gorduras vegetais são substâncias constituídos majoritariamente por glicerídeos de ácidos graxos de espécies vegetais além de constituintes menores como fosfolipídios, material insaponificável e ácidos graxos livres de óleos e gorduras de origem vegetal (BRASIL, 2005).

Óleos e gorduras são formados por ésteres, provenientes da reação de esterificação do glicerol (álcool) com ácidos graxos (ácidos carboxílicos), resultando, por exemplo, em triacilglicerídeos. A estrutura e conformação química dos lipídios, suas ligações químicas e o tamanho das cadeias carbônicas interfere nas propriedades físico-químicas destes compostos (GIOIELLI, 1996; RAMALHO; SUAREZ, 2013).

Estrutura básica majoritária dos lipídios em óleos, os ácidos graxos são identificados pelo tamanho da cadeia carbônica e pela presença de saturação e instauração entre as ligações de carbono. Suas cadeias carbônicas são compostas por número par de carbonos e poucas ramificações, geralmente, identificados na forma de monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos e triacilglicerídeos, havendo ainda, compostos derivados dos ácidos graxos como fosfolipídios, esteróis, carotenoides e ceras (GIOIELLI, 1996; RAMALHO; SUAREZ, 2013).

Na Figura 4 são apresentados alguns exemplos de ácidos graxos presentes em óleos vegetais como a canola, soja, algodão, girassol e palma.

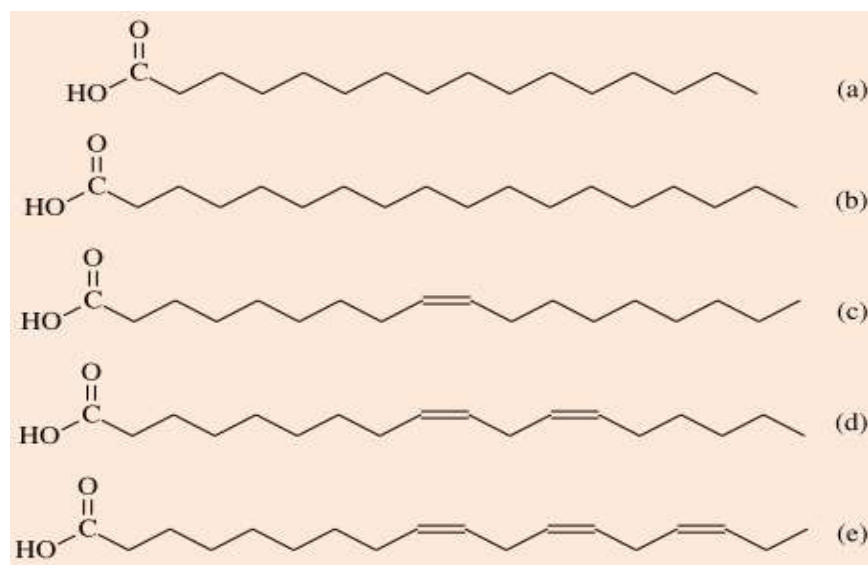


Figura 4 - Ácido graxos: saturado (a-palmítico (C16), b-esteárico (C18)); ácido graxo monoinsaturado (c-ácido oleico (C18:1n-9)); ácidos graxos insaturados (d-linoleico (C18:2n-6), e-linolênico (C18:3n-3)).

Fonte: Ramalho; Suarez (2013)

3.5.1 Óleo de canola e a oxidação lipídica em alimentos

O óleo de Canola é proveniente de espécie vegetal derivada da colza, pertencente família das crucíferas, do gênero *Brassica* (*Brassica napus* L., *Brassica rappa* L. e *Brassica juncea* L.). O óleo de canola e o termo canola se originaram em estudos no Canadá no melhoramento das espécies vegetais citadas com objetivo de reduzir os teores de ácido erúico, dispensável à dieta humana e que apresentara toxicidade quando testado em ratos, e de glucosinolatos, que causavam problemas de desenvolvimento e nutricionais à nutrição animal. Já o termo canola se refere ao óleo canadense de baixa acidez (Canadian Oil Low Acid) (GUNSTONE, 2002; DE MORI, 2014; ZAMBRANO, 2012; GRIMALDI; TOMM, 2018).

A legislação brasileira, por meio da Instrução Normativa Nº 49 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2006), define as características de identidade e qualidade de óleos vegetais refinados, bem como estabelece o percentual dos ácidos graxos em óleos canola e que o mesmo é obtido de sementes das espécies *Brassica campestris* L., *Brassica napus* L. e *Brassica juncea* L.

Presentes em relevantes percentuais no óleo de canola, ácidos graxos da família ômega (ω) são fornecidos somente de fonte vegetais, são primordiais ao organismo humano, dentre os quais, se destacam os ácido oleico (C18:1,n-9 ou ω -9) e linoleico (C18:2,n-6 ou ω -6) que atuam no metabolismo das membranas celulares e no sistema nervoso (MARTIN et al., 2006).

O óleo de canola apresenta composição rica em ácidos graxo insaturados, sendo que os monoinsaturados representam entre 61 a 62,4% e os poli-insaturados entre 21 e 31,4%, já os ácidos graxos saturados representam 9% do total. Na composição do óleo de canola destaca-se a presença de ácidos graxos essenciais como os ácidos graxos oleico (C18:1n-9 ou ω -9) 61,6% (monoinsaturado), linoleico (C18:2n-6 ou ω -6) 21,7% e, α -linolênico (C18:3, 3n-3 ou ω -3) 9,7%, esses dois últimos poli-insaturados (GUNSTONE, 2002; ZAMBRANO, 2012).

Por sua versatilidade e características conferidas em bolachas, gorduras hidrogenadas, óleos vegetais e margarinas tem sido incorporado nas formulações de biscoitos e bolachas. A importância dos lipídeos na formulação dos alimentos está associada aos seus efeitos no sabor, aroma, textura e aparência, entretanto, estão sujeitos a degradação em seu processamento (CAPONIO et al., 2007).

O percentual de gorduras e a sua composição podem determinar o grau de oxidação do alimento interferindo negativamente no sabor e aroma dos produtos, neste sentido, o desafio está centrado no controle da oxidação lipídica e manutenção da qualidade destes alimentos (VISCIDI et al., 2004; SILVA et al., 1999).

A estabilidade ou instabilidade oxidativa do óleo de canola se aproxima ao comportamento de óleos de soja, entretanto, em virtude do teor de ácido linoleico, da decomposição deste e da presença de outros ácidos graxos poli-insaturados, espécies mais reativas são formadas acelerando o processo de oxidação lipídica. Em face a presença de clorofila, processo de foto oxidação é favorecido, somando-se a esse fator, a presença e solubilidade do oxigênio em óleo o sujeita à foto oxidação resultando em oxigênio singlete que contribui com o processo de oxidação do óleo, além do aquecimento e da presença de agentes pró oxidação como presença de metais como ferro e cobre que, desencadeiam o processo de oxidação lipídica (GUNSTONE, 2002).

O controle e redução da oxidação lipídica nas etapas de processamento e armazenamento representa desafio constante das indústrias de alimentos para

manutenção da qualidade dos alimentos produzidos, inúmeros são os processos realizados de modo preservar ao máximo as características naturais dos alimentos (REIS et al., 2017; SILVA et al., 1999).

O processo de oxidação dos alimentos está relacionado a uma gama de reações que, a partir da formação de radicais alquila e peróxidos (GOIJOT et al., 2019), interfere na qualidade e tempo de prateleira de produtos comerciais (KOCZON et al., 2016).

Os processos oxidativos de lipídeos em alimentos podem ocorrer por meio de reações hidrolíticas, oxidação enzimática, fotoxidação e autooxidação (SILVA et al., 1999), a autooxidação de óleos e gorduras é o principal mecanismo de degradação dos lipídeos (FARMER et al., 1942).

Em decorrência da incidência de luz, calor, pH, fatores antioxidantes e pró-oxidação, como a presença de íons metálicos e radicais livres, tais aspectos exercem ação catalítica. As reações de oxidação se iniciam pela ação de radical livre que reagem com ácidos graxos insaturados suscetíveis a degradação (GOIJOT et al., 2019; SILVA et al., 1999).

A autooxidação de óleos e gorduras ocorre de acordo com as reações demonstradas na Figura 5, sendo o principal mecanismo de degradação dos lipídeos (FARMER et al., 1942), as etapas envolvidas no processo de autooxidação lipídica e formação de radicais livres são representadas a seguir:

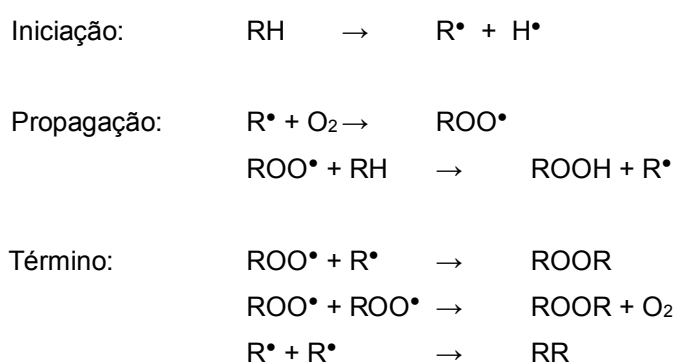


Figura 5 - Representação da autooxidação lipídica em alimentos.

Fonte: Ramalho; Jorge (2006)

Onde: RH - Ácido graxo insaturado; R^{\bullet} - Radical livre; ROO^{\bullet} : Radical Peróxido; ROOH – Radical Hidroperóxido.

A autooxidação lipídica está sujeita a ação catalítica da temperatura, pH, íons metálicos e presença de radicais livres. Decorrente da ação catalítica favorecida pela radiação UV e calor, na etapa inicial oxigênio (3O_2) e ácidos graxos insaturados

(RH) reagem originando radicais livres (R^\bullet), os radicais livres reagem propagando a reação de forma autocatalítica formando radicais peróxido (ROO^\bullet) e hidroperóxidos ($ROOH$), nesta etapa é possível notar odor e sabor característicos do processo de rancificação resultante da degradação dos radicais hidroxiperóxidos (RAMALHO; JORGE, 2006; SILVA et al., 1999; FENNEMA et al., 2010).

Na etapa de terminação a redução do teor de ácidos graxos insaturados (RH) indica a reação entre si dos radicais (R^\bullet) formando compostos estáveis (RR, ROOR), sendo notada a alteração do sabor, odor, cor, textura, ranço característico de compostos secundários (e.g. voláteis, não voláteis e epóxidos) (RAMALHO; JORGE, 2006; SILVA et al., 1999). A oxidação lipídica resulta na formação de cetonas, epóxidos aldeídos, dentre os quais há compostos voláteis e não voláteis (BARRIUSO et al., 2013).

3.6 Biscoitos de polvilho

Os óleos vegetais e margarinas são ingredientes incorporados nas formulações de biscoitos e bolachas, os teores e os tipos de gordura variam muito entre os produtos disponíveis no mercado, não havendo um padrão do teor de gordura empregado na formulação de biscoitos de polvilho (SEPAROVIC; AUED-PIMENTEL, 2016).

Considera-se que as informações acerca da diversidade óleos e gorduras empregadas na confecção de biscoitos de polvilho (SEPAROVIC; AUED-PIMENTEL, 2016), e as limitações imposta pela legislação (BRASIL, 1999) no emprego de antioxidantes em alimentos como biscoitos e bolachas, suscita-se que biscoitos de polvilho podem ser um bom meio para verificação do potencial antioxidante natural como os coprodutos de própolis.

Separovic; Aued-Pimentel (2016), constataram que biscoitos de polvilho produzidos no Estado de São Paulo nos anos de 2009 e 2013, eram constituídos de gorduras vegetal, vegetal hidrogenada, óleo vegetal, óleo de soja e gorduras de palma e coco, nos quais o teor de gordura total foram de 17 a 18% da composição dos biscoitos e 3% de ácidos graxos trans.

De acordo com Separovic; Aued-Pimentel (2016) 80% das amostras de biscoito de polvilho avaliadas continham gordura hidrogenada, 12% óleo de palma e

8% eram constituídas de óleo vegetal, estando os teores mais elevados de ácidos graxos trans associados aos produtos compostos por gordura hidrogenada.

Biscoitos de polvilho são formulados tendo como ingrediente base o polvilho azedo, uma das características marcantes destes produtos é a crocância, em geral, são produzidos a partir da mistura de polvilho azedo, óleos ou gorduras, sal e água, o processo de cocção passa pelo escaldamento de ingredientes, modelagem e posteriormente são assados (RIBEIRO, 2006; RODRIGUES et al., 2011). De acordo com Cereda (1987) o polvilho confere leveza, volume e crocância, resulta da expansão do polvilho azedo durante a etapa de cocção em fornos.

A formulação básica do biscoito de polvilho definida por Maeda; Cereda (2001), foi elaborada tendo aproximadamente 25% de gordura hidrogenada, 4% de sal e aproximadamente 80% de água, percentuais definidos em relação a quantidade de polvilho empregada na formulação (MAEDA; CEREDA, 2001). Aplevicz; Demiate (2007) relatam que é possível verificar uma grande variedade de formulações para biscoitos de polvilho tendo como ingredientes além do polvilho azedo, polvilho doce, farinha de milho, ovos, leite e sal.

Em estudos de análise sensorial de biscoitos formulados pela substituição da fécula de mandioca por farelo de mandioca, é possível constatar que os biscoitos de polvilho azedo são referenciados tendo em sua formulação padrão 44% fécula de mandioca, 26% de ovos, 22% de água, 6,5% de óleo e 1,5% de sal (RODRIGUES et al., 2011).

3.7 Métodos para acompanhamento da oxidação lipídica

Alimentos constituídos em gorduras estão sujeitos ao processo de oxidação dos lipídios, neste sentido, é indispensável a realização de análises de verificação e acompanhamento de processos de degradação lipídica. O acompanhamento do processo contribui para estabelecer parâmetros que possam impedir e minimizar a rancificação garantindo alimentos de qualidade (SILVA et al., 1999, BARRIUSO et al., 2013).

O nível de degradação a ser observado, a acurácia e as características da matriz em estudo são aspectos que determinam a escolha do método para análise da oxidação lipídica, desta forma, destaca-se ser importante relacionar diferentes

métodos e parâmetros para acompanhamento de processos oxidativos (BARRIUSO et al., 2013).

Métodos de verificação da oxidação lipídica, abrangem desde a análise sensorial a métodos avançados (Infra Vermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), HPLC-ESI-MS, CGMS), os métodos consideram por exemplo, análise de substrato pelo consumo de oxigênio (métodos manométricos, polarográficos, ponderais ou cromatográficos), análises de teor residual de ácidos graxos (cromatografia gasosa e índice de acidez - I_A), produtos primários da oxidação (Índice de peróxidos, método iodométrico de Lea e de oxidação do Fe²⁺ em Fe³⁺, colorimétrico, calorimetria diferencial, dienos conjugados e outros), produtos secundários de oxidação (Teste do Ácido 2-Tiobarbitúrico (TBA), Índice de *p*-Anisidina (I_{pA})), compostos voláteis e ácidos oxidados (CG-MS) (SILVA et al., 1999 e BARRIUSO et al., 2013).

Considerando que a oxidação lipídica pode resultar, dentre outros subprodutos, na formação de cetonas, epóxidos e aldeídos, dentre os quais há compostos voláteis e não voláteis (BARRIUSO et al., 2013), um dos métodos analíticos para detectar aldeídos resultantes da degradação de hidroperóxidos, observa a formação de complexo resultante da reação do ácido 2-tiobarbitúrico – TBA com malonaldeído (MDA), conforme reação esboçada na Figura 6.

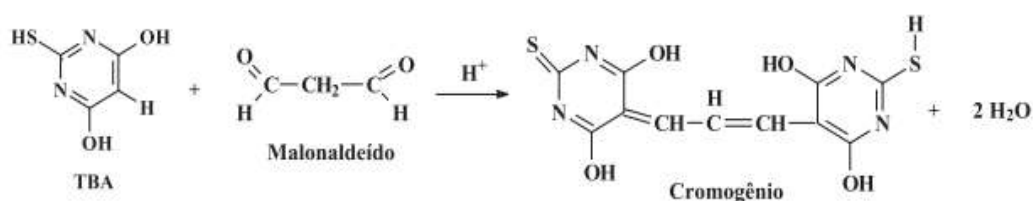


Figura 6 - Reação de formação do composto cromogênio resultante do teste de TBA.
Fonte: Osawa et al. (2005).

O complexo (MDA-TBA) formado tem coloração vermelha, podendo ser mensurado por espectrofotometria pela absorção no comprimento de onda de aproximadamente 532-535 nm. (SILVA et al., 1999; BARRIUSO et al., 2013). Em geral os resultados obtidos de ensaios com TBA são expressos em unidades de absorvância por unidade de peso da amostra ou em valor ou número de TBA, ou seja, o resultado representa a quantidade em miligramas de malonaldeído por quilograma da amostra (mg MDA Kg⁻¹) (SILVA et al., 1999; BARRIUSO et al., 2013).

Abaixo, na Tabela 5, são apresentados alguns resultados de estudos que versam acerca da análise da oxidação lipídica por TBARS em alimentos.

Tabela 5- Estudos de oxidação lipídica em alimentos pelo método de TBARS

Fonte	Material	Condições de Armazenamento	Período de Análise	mg de MDA Kg ⁻¹ de amostra
Carpes et al. (2020)	Patê de Frango com bagaço de uva	Sob refrigeração a 4°C	0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias	1,42 a 2,89
Almeida et al. (2017)	Salsichas de carne suína com pólen	Sob refrigeração a 4°C	0, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 dias	1,29 a 4,22
Reis et al. (2017)	Hambúrguer com resíduo de própolis	Sob congelamento a -15 °C	0, 7, 14, 21 e 28 dias	0,67 a 1,29
Osuna et al. (2018)	Pães de farinhas integrais e óleos vegetais com ácido ascórbico e α -tocoferol	Temperatura ambiente 25° C	0 e 6 dias	4,22 e 11,75
Bajaj et al. (2016)	Bolachas formuladas com hortelã	Temperatura ambiente	0, 1, 2, 3, 4 e 5 meses	3,2 a 4,0
Izzreen; Noriham (2011)	Bolos com ervas da Malásia, ácido ascórbico, BHA e BHT	Temperatura ambiente	0, 3, 6, 9, 12, 15	0,1 a 1,4
Patrignani et al. (2014)	Biscoitos com óleos de milho, girassol e girassol rico em ác. oléico	20 °C	Em 145 e 186 dias de armazenamento	0,85 e 2,59
Mišan et al. (2011)	Biscoitos com mistura de ervas (salsa, casca de espinheiro, hortelã e cominho)	Temperatura ambiente	0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 semanas	1,31 a 6,89
Papastergiadis et al. (2012)	Biscoitos doces de canela	Temperatura de 20 °C a 26 °C	0, 14, 37, 69 e 92 dias	3,13 e 24,07
Vargas et al. (2019)	Óleo de Canola enriquecido com extrato de pitanga	60 C	16 dias	0,75 a 4,85

Fonte: De acordo com Carpes et al. (2020); Almeida et al. (2017); Reis et al. (2017); Osuna et al. (2016); Bajaj et al. (2016); Izzreen; Noriham (2011); Patrignani et al. (2014); Mišan et al. (2011); Papastergiadis et al. (2012); Vargas et al. (2019).

Uma vez que os métodos analíticos podem não estabelecer uma relação ideal com a percepção de alterações que podem ocorrer no sabor e aroma dos produtos, neste sentido, é importante que o método analítico seja executado de modo

sistemático (BARRIUSO et al., 2013) possibilitando identificar o ponto crítico do processo de oxidação (SILVA et al., 1999).

Dentre as metodologias já citadas, observa-se que análise de ácidos graxos por cromatografia gasosa fora realizada em biscoitos de polvilho com objetivo de analisar a composição dos ácidos graxos de diferentes biscoitos produzidos no estado de São Paulo (SEPAROVIC; AUED-PIMENTEL, 2016).

Os procedimentos empregados até determinação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa acoplada ao FID, extração lipídica, quantificação dos lipídios totais e preparo dos ésteres dos ácidos graxos requerem preparo e cuidado na execução das etapas.

O processo de extração lipídica precisa garantir a extração dos diferentes constituintes dos ácidos graxos, evitando perdas, neste sentido, o emprego do método Bligh e Deyer (1959) representa uma boa alternativa. Nesta etapa, é necessário observar o teor e a polaridade dos solventes empregados, as características da amostra a ser analisada, seu teor de água, o tempo de extração e agitação de modo que o processo seja eficiente.

A análise por cromatografia gasosa requer que os analitos sejam voláteis, desta forma, é indispensável que os ácidos graxos sejam submetidos a reações de derivação (esterificação ou transesterificação), resultando em ésteres metílicos ou etílicos que serão analisados. O método Hartman e Lago (1973), amplamente usado na obtenção de ésteres metílicos representa alternativa viável pelo emprego de reagentes de baixo custo, por ser uma metodologia simples, de breve execução no preparo de ácidos graxos.

O emprego da técnica de cromatografia gasosa acoplada ao detector de chama por ionização (GC-FID) com propósito analisar a ocorrência de alteração na composição dos ácidos graxos tem sido recorrente, desta forma, também foi considerada na análise dos ácidos graxos do óleo de canola, posteriormente extraído das formulações de biscoitos de polvilho.

A Tabela 6 traz informações da literatura quanto ao percentual para ácidos graxos palmítico (C16:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n-9), linoleico (C18:2n-6) e linolênico (C18:3n-3) identificados e quantificados em amostras de óleo de canola.

Tabela 6 - Composição percentual dos ácidos Graxos em óleo de canola na literatura

Fonte	Ac Graxo				
	C16:0	C18:0	C18:1n-9	C18:2n-6	C18:3n-3
Brasil (2006)	2,5 – 7,0	0,8 – 3,0	51,0 – 80,0	15,0 - 30,0	4,0 – 14,0 %
Santos et al. (2020)	3,76 – 7,90	2,26 – 3,73	63,22 – 67,0	17,0	7,0
Gunstone (2011)	3,6	1,5	61,6	21,7	9,6
Porto et al. (2016)	4,5 – 4,7	2,2 – 2,3	62,5 – 63,2	16,0 - 17,3	3,6 – 4,5
Boroski et al. (2018)	4,62	2,52	58,65	16,64	5,03
Vargas et al. (2019)	4,59 – 5,06	1,67 – 1,91	59,84 – 64,36	19,01 – 21,09	4,85 – 6,24

Fonte: Conforme Brasil (2006); Santos et al. (2020); Gunstone (2011); Porto et al. (2016); Boroski et al. (2018); Vargas et al. (2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O coproduto da própolis foi gerado durante o processo de produção industrial de extratos hidroalcoólico de própolis comercializada pela empresa produtora e exportadora de produtos apícolas, a Breyer & Cia Ltda de União da Vitória, Paraná, Brasil (latitude 26 ° 11' 48,8 "S, longitude 51 ° 06' 48,4" W). A própolis produzida pelas abelhas *Apis mellifera*, que originou o coproduto foi coletada durante a primavera de 2018 pelos apicultores da região de União da Vitória – PR cadastrados pela empresa. O coproduto foi seco em temperatura ambiente por 48 horas, com teor de umidade média de 7 % foi armazenado sob refrigeração a $-15 \pm 0,6$ °C para conservação das suas propriedades biológicas. O polvilho azedo (YOKI™, Paranaíba, Brasil), e o óleo de canola (SALADA, Bunge Alimentos S/A, Gaspar, Brasil) foram adquiridos no comércio local do Município de Chapecó, Santa Catarina-Brasil.

4.2 Métodos

Conforme objetivos elencados, o desenvolvimento do presente projeto consistiu na extração dos compostos fenólicos do coproduto da própolis, a presença de compostos (Fenóis totais por Folin-Ciocalteu e HPLC-ESI-MS) e a atividade antioxidante (DPPH, FRAP e ABTS) foram aferidas em extratos do coproduto liofilizados (LFCP, liofilização) e microencapsulados (MECP, spray dryer).

O potencial como inibidor de oxidação de lipídios foi analisado em biscoitos de polvilho elaborados com óleo de canola, considerando quatro formulações distintas entre si em função do antioxidante empregado, sendo: F1-isenta, F2-BHT, F3-MECP e F4-LFCP.

O processo de elaboração dos biscoitos se deu pelo escaldamento do polvilho salgado, as formulações F1, F2, F3 e F4, com os respectivos antioxidantes, foram preparadas individualmente, os biscoitos foram moldados em formas de alumínio a cocção realizada em forno elétrico à 180 °C. Após resfriamento em temperatura

ambiente os biscoitos foram embalados em embalagens plásticas transparentes armazenados sob temperatura ambiente (entre 20 e 26 °C).

O acompanhamento da oxidação lipídica foi realizado através da análise das substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS) e do perfil dos ácidos graxos por cromatografia gasosa acoplada ao detector de ionização por chama (GC-FID) num período de 45 dias, sendo as análises realizadas quinzenalmente nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias.

A etapa de extração e preparo do extrato liofilizado (LFCP) do coproduto da própolis, análise do conteúdo fenólico total (CFT), análises de atividade antioxidante (DPPH, ABTS e FRAP), análise do material microencapsulado (MEV) foram realizadas na UTFPR – *Campus* Pato Branco. O preparo do material microencapsulado (MECP) foi realizado na UTFPR - *Campus* Campo Moura. Análises de determinação dos compostos fenólicos nos extratos LFCP e MECP realizada por cromatografia líquida e a determinação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos por cromatografia gasosa (GC-FID) foram realizadas no IFRS – *Campus* Sertão. A formulação e preparo dos biscoitos, análise de lipídios totais, etapa de esterificação dos ácidos graxos e análise de TBARS, foram realizadas na UFFS – *Campus* Chapecó –SC.

4.2.1 Preparo do extrato liofilizado do coproduto da própolis (LFCP)

As condições de extração foram estabelecidas com base nos parâmetros (concentração do solvente, temperatura e tempo de agitação) definidos em estudos prévios realizados por Serafini et al. (2012) e Carpes et al. (2007).

Alíquotas de 10 g de coproduto de própolis foram maceradas e extraída com 100 mL de etanol 80% (v/v) em frascos Erlenmeyer de 250 mL. A extração foi conduzida em incubadora com controle de temperatura e agitação orbital tipo Shaker (FORTINOX - Star FT38, Piracicaba- Brasil) a temperatura de 40 °C, durante 60 min sob agitação de 145 rpm. Os extratos foram filtrados em papel filtro Watman nº 5. Nessas condições, foi preparado um total de 1000 mL de extrato na concentração de 0,1 g/mL. Para a elaboração do LFCP, o sobrenadante de uma das extrações (aproximadamente 100 mL) foi evaporado em evaporador rotativo (TE-211, TECNAL, Piracicaba, Brasil) até a completa evaporação do solvente. O resíduo foi

liofilizado (Liofilizador L101 - LIOTOP, São Carlos, Brasil) sob alto vácuo por 48 horas em temperatura de -50 °C e armazenado sob refrigeração a -18 °C para posterior realização das análises. Após essa etapa de liofilização, extratos do LFCP na concentração de 0,2 mg/mL (etanol 80% v/v) foram preparados para a análise de compostos fenólicos e atividade antioxidante. O sobrenadante restante (aproximadamente 900 mL) foi guardado em freezer a -18 °C para o preparo do extrato microencapsulado (MECP).

4.2.2 Preparo do extrato microencapsulado de coproduto de própolis (MECP)

Para o preparo do MECP, aproximadamente 900 mL do extrato hidroalcoólico foi concentrado em evaporador rotativo a 40°C até uma redução de 50% do seu volume inicial. Concentração essa necessária para conseguir obter um extrato com teor de sólidos totais de 21,4% (Brix), ideal para ser microencapsulado em *spray dryer*. O teor de sólidos foi determinado em refratômetro manual (Portable Refractometer).

4.2.2.1 Preparo da Emulsão

O preparo da emulsão foi realizado considerando um teor de sólidos (extrato/solvente/encapsulante) final de 20-30% (Brix). O material encapsulante, amido modificado de alto desempenho (50 g), EP 1002 – Cargill Agrícola S.A., Lote 1403102, foi disperso em volume de água destilada. Inicialmente foi usado 50 mL de água a temperatura ambiente o suficiente apenas para a completa dissolução, e em seguida, sob agitação mecânica (Fisatom 713D – AAKER, São Paulo, Brasil) de 2500 rpm foi adicionada mais 50 mL de água destilada a 90 °C. A velocidade do homogeneizador foi sendo incrementada aos poucos até o limite de 4000 rpm por 3 min, até observação de uma emulsão homogênea, após esse procedimento as amostras foram secas por atomização em *spray dryer*.

4.2.2.2 Secagem por atomização

A microencapsulação foi realizada em equipamento *spray dryer* (Labmaq – LM MSD 1.0- Ribeirão Preto, Brasil), com atomizador para dois fluidos (ar/amostra) de diâmetro de 1 mm (Figura 7). A emulsão, sob agitação constante (1000 rpm) (encapsulante + extrato) foi bombeada em regime de fluxo a favor da corrente de ar de 0,70 L/h. A temperatura de entrada aplicada (controlada) para secagem por pulverização foi de 150 °C e de saída de 72 ± 2 °C (não controlada). A taxa de alimentação de ar de entrada no equipamento (atomização) foi ajustada em 3,6 L/min, sendo que a alimentação de ar registrada no compressor variou entre 45 a 50 L/min. O material em pó foi denominado de MECP e foi acondicionado em frasco de 250 mL com tampa rosqueável, envoltos em papel alumínio e armazenados -18 °C até a realização das análises e uso na formulação dos biscoitos.



Figura 7 – Equipamento Spray Dryer (Labmaq – LM MSD 1.0)
Fonte: Autoria própria – (2021)

4.2.3 Análise da eficiência da microencapsulação (%)

Análise da eficiência da microencapsulação levou em consideração a diferença percentual dos compostos fenólicos totais revestidos, presentes no interior das microcápsulas em relação aos compostos fenólicos presentes na superfície, ou seja, aqueles que não foram revestidos. Para isso foram executadas etapas de extração e liberação dos compostos fenólicos de superfície (TFS) e dos compostos fenólicos encapsulados (TFE), conforme metodologia descrita por Reis et al. (2017) e Carpes et al. (2020). A eficiência da microencapsulação (E.M) para o MECP foi determinada pela Equação 1.

$$E.M (\%) = [1 - (TFS / TFE) \times 100] \quad \text{Equação (1)}$$

Onde:

TFS: Teor de compostos fenólicos na superfície do material, quantidade de compostos fenólicos presentes na superfície de uma massa definida de microcápsulas;

TFE: Total de compostos fenólicos encapsulados e na superfície do material, quantidade de compostos fenólicos liberados presentes em uma massa definida de microcápsulas.

4.2.3.1 Compostos fenólicos de superfície (TFS)

Aliquotas de 0,2 g de MECP foram dissolvidos em 2,0 mL de etanol 80 % (v/v). Após dissolução a mistura foi agitada em agitador de tubo tipo Vortex por 30 segundos e centrifugada a 4000xg por 2 minutos (Sigma 3-16KL, Osterode am Harz, Alemanha). Em seguida o teor de compostos fenólicos do sobrenadante foi quantificado em espectrofotômetro Bel photonics (Modelo 2000 UV, Osasco, Brasil), conforme metodologia descrita no Item 4.2.4.

4.2.3.2 Compostos fenólicos encapsulados (TFE)

A determinação dos compostos fenólicos encapsulados foi determinada após a ruptura das micropartículas e liberação dos compostos bioativos. Em tubos tipo Falcon de 50 mL, 0,5 g de extrato microencapsulado (MECP) foi dissolvido em 20 mL de álcool metílico 80% (v/v). O extrato foi agitado em agitador tipo Vortex por 2 min, sonicado em lavadora ultrassônica (Ultronique-Q5.9L/40A, Indaiatuba, Brasil) por 15 min e centrifugado (Sigma 3-16KL, Osterode am Harz, Alemanha) a $6000 \times g$ por 5 min. O sobrenadante foi filtrado em papel de filtro e utilizado para a determinação do teor de fenólicos totais (4.2.4), atividade antioxidante e posterior análises cromatográficas.

4.2.4 Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pelo método descrito por Singleton et al. (1999), utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e o ácido gálico como padrão de referência, o método foi empregado em amostras de extrato liofilizado (LFCP) e microencapsulado (MECP) do coproduto da própolis. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (Femto UV 2000, São Paulo, Brasil) a 740 nm. Para determinação alíquotas 500 μL do extrato (1:20) foram solubilizadas em 2,5 mL de solução Folin-Ciocalteu 10% em tubos tipo Falcon e mantidos em repouso por 5 minutos. Após o período de repouso, 2,0 mL de solução de carbonato de sódio 4% (m/v) foi adicionado aos tubos para ser homogeneizados em vortex e mantidos em repouso por 2 horas sob temperatura ambiente e sem incidência de luz. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro a 740 nm. Uma curva padrão com ácido gálico foi construída nas seguintes concentrações de 25,0; 37,5; 50,0; 62,5; 75,0; 100,0 e 125,0 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados foram expressos em equivalente em ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g^{-1} de amostra). A análise foi realizada em triplicata.

4.2.5 Estrutura e morfologia do MECP

As características estruturais do material microencapsulado (MECP) foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em microscópio eletrônico de varredura digital (TM-3000, Hitachi Tabletop Microscope, Tóquio, Japão). A amostra (pó) foi aderida em fita adesiva dupla face e disposta em porta amostra metálico (stubs) de 12 mm de diâmetro. As imagens de MEV foram obtidas usando uma voltagem de 5 kV e corrente de 1750 mA. As ampliações de 100 a 1500x foram registradas pelo software, Shadow 1 (Hitachi Tabletop).

4.2.6 Atividade de água do MECP

A atividade de água (a_w) foi medida por leitura direta no equipamento de análise automática (LabTouch - Novasina, Brasil) de acordo com a métodos físico químicos para análise de alimentos (IAL, 2008).

4.2.7 Caracterização dos extratos (LFCP e MECP) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

Os compostos fenólicos presente nos extratos LFCP e MECP foram analisados e identificados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa com fonte de ionização por eletrospray (LC-ESI-MS) no sistema cromatográfico Shimadzu (LC-MS-2020, Kyoto, Japão). A separação dos compostos foi realizada utilizando uma coluna Shim-Pack VP-ODS (150 mm x 2,0 mm x 4,6 μm) (Shimadzu, Kyoto, Japão) a uma temperatura ajustada em 40 °C. Em circunstâncias da disponibilidade de material, reagentes e possibilidades do laboratório em executar análise, os métodos empregados para análise quantitativa e qualitativa dos compostos fenólicos foram realizados de acordo com de Arruda et al. (2018), Pereira et al. (2018) e Bataglioni et al. (2015). Nesse estudo, os extratos LFCP e MECP foram solubilizados em metanol grau HPLC, nas concentrações de 5 mg mL⁻¹ e 25 mg mL⁻¹, respectivamente, sendo o MECP submetido a ruptura

conforme 4.2.3.2, ambos extratos foram filtrados em filtro com porosidade de 0,22 μm (Milipore), sendo volume de injeção das amostras de 10 μL .

A fase móvel binária foi constituída pelo solvente A – Ácido Fórmico 0,3% e o solvente B – Metanol e eluídos a um fluxo de 0,4 mL/min, de acordo com a seguinte programação: 0,1-1 min., 5% B; 1-4 min., 5-60% de B; 4-7 min., 60-70% de B; 7-10 min., 70-100% de B; 10-11,5 min., 100% B; 11,5-12,5 min., 100-5% de B; 12,5-15min., 5% de B, conforme Tabela 7. Os parâmetros adotados para fonte ESI foram de 1,5 Kv de tensão capilar, 200 °C para temperatura do bloco, 250 °C para linha de dessolvatação. O fluxo do gás secante (N_2) e de nebulização foi de 15,0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ e 1,5 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 7- Concentração de metanol (Fase móvel B) em função do tempo (%)

Tempo (min.)	Conc B (%)
0,01	5
1,00	5
4,00	60
7,00	70
10,00	100
11,5	100
12,5	5
15,0	5
15,0	Stop

Fonte: Aatoria própria (2021).

Compostos fenólicos dos extratos foram determinados por meio de curva de calibração em relação aos padrões externos autênticos (Sigma-Aldrich) dos seguintes compostos ácido cafeico, pirocatecol, ácido siríngico, mangiferina, kaempferol, ácido p-cumárico e flavona. Inicialmente uma solução padrão de cada composto foi individualmente preparada na concentração de 1000 mg L^{-1} em metanol. Em seguida, por diluição em metanol foram preparadas soluções padrão contendo todos os compostos nas concentrações de 1,5; 3,12, 6,25 e 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol. Os íons precursores mais abundantes das moléculas desprotonadas $[\text{M-H}]^-$ de cada padrão foram considerados para determinação, comparando-se o tempo de retenção dos padrões com os compostos fenólicos presentes nos extratos LFCP e MECP. A curva de calibração foi construída para quatro concentrações (1,5; 3,12, 6,25 e 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de cada um dos padrões disponíveis (ácido cafeico, pirocatecol, ácido siríngico, mangiferina, kaempferol, ácido p-cumárico e flavona), o volume de injeção foi de 10 μL em triplicata, os compostos presentes nos extratos

foram mensurados em relação à curva de calibração dos padrões, sendo expressos em $\mu\text{g g}^{-1}$ de amostra.

4.2.8 Análises de Atividade Antioxidante

Nenhum método para análise da atividade antioxidante isoladamente é suficiente para se estimar o potencial antioxidante de extratos de plantas, assim, faz-se necessário a aplicação de métodos distintos para avaliar a atividade antioxidante, uma vez que há diferentes classes de compostos fenólicos com diferentes mecanismos de ação (ANTOLOVICH et al., 2002; ALMEIDA et al., 2017; REIS et al., 2017). Desta forma, as propriedades antioxidantes dos extratos LFCP e MECP foram avaliadas por três métodos, DPPH, ABTS e FRAP.

4.2.8.1 Sequestro do radical DPPH.

A atividade antioxidante pelo método DPPH foi realizada de acordo com os procedimentos realizados por Brand-Williams et al. (1995). Os extratos MECP e LFCP foram diluídos em etanol 80% e preparados na concentração de 45,45 mg/mL e 0,2 mg/mL, respectivamente. Desta forma, alíquotas de 500 μL de cada extrato foram adicionadas separadamente à 3 mL de etanol P.A e à 300 μL da solução de DPPH (0,5 mM). Amostra controle sem os extratos foi preparada com 3,5 mL de etanol e à 300 μL da solução de DPPH (0,5 mM). As amostras foram homogeneizadas e mantidas ao abrigo da luz por 30 minutos e as leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Femto UV-2000, São Paulo, Brasil) a 517 nm. Uma curva padrão com Trolox nas concentrações de 0,0; 5,0; 15,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0 e 125,0 μmol de trolox foi preparada e os resultados foram expressos em μmol de Trolox g^{-1} de amostra. A análise foi realizada em triplicata.

4.2.8.2 Sequestro do radical ABTS

Análise da atividade antioxidante pelo sequestro/redução do radical ABTS^{•+} (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) foi realizada conforme Re et al. (1999) e adaptações do procedimento feito por Reis et al. (2017). O radical ABTS^{•+} foi obtido a partir da reação da solução de ABTS (7,0 mM) com persulfato de potássio (140 mM) durante um período de 16 horas sob temperatura ambiente e sem incidência de luz. Após esse período, a solução contendo radical foi diluída em etanol p.a até atingir uma absorbância de 0,7 a 734 nm.

O meio reacional foi composto por 3,0 mL da solução contendo radical ABTS^{•+}, o qual foi homogeneizado separadamente com 30 µL de cada extrato e deixado em repouso por 7 min sem incidência de luz e em temperatura ambiente. Nessa análise os extratos MECP e LFCP foram diluídos na concentração de 50 mg/mL e 0,2 mg/mL, respectivamente. As absorbâncias foram aferidas no comprimento de onda de 734 nm e a análise foi realizada em triplicata. Uma curva padrão de Trolox foi construída nas concentrações de 0, 50; 100; 500; 1000 e 1500 µmol Trolox, e os resultados expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (µmol TEAC g⁻¹).

4.2.8.3 Atividade antioxidante total pelo método de redução do Ferro - FRAP

A determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP) consiste na aferição da habilidade dos antioxidantes em reduzir, em meio ácido (pH 3,6) o complexo Fe³⁺/TPTZ. Nesta reação o Fe²⁺ de intensa cor azul é formado e a absorção máxima é medida em comprimento de onda de 595 nm (Benzie; Strain, 1996). Tal como foi para a análise de ABTS, os extratos MECP e LFCP foram diluídos na concentração de 50 mg/mL e 0,2 mg/mL, respectivamente. O reagente FRAP foi previamente preparado com 50 mL de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 5 mL de solução TPTZ (10 mmol de TPTZ em 250 mL de HCl 40 mM) e 5 mL de FeCl₃ (20 mM) em solução aquosa.

Alíquotas de 90 µL dos extratos LFCP e MECP foram adicionados a 2,7 mL do reagente FRAP e incubadas por 30 min em banho-maria a 37 °C sem incidência

de luz. Decorrido o tempo de reação, as absorvâncias das amostras foram medidas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm. Uma curva de referência com sulfato ferroso foi elaborada na concentração 100 a 2000 μM e os resultados obtidos foram expressos em $\mu\text{mol Fe}^{2+}$ por g de amostra ($\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$). As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.9 Elaboração do Biscoito de Polvilho

Os biscoitos de polvilho foram produzidos de acordo com estudo prévios de acordo com Montenegro et al. (2008), Rodrigues et al. (2011) e Aplevicz; Demiate (2007) com algumas modificações quanto às quantidades de cada ingrediente.

Neste estudo o polvilho azedo, sal, leite, gordura vegetal e ovos foram adquiridos no comércio da cidade de Chapecó – SC. Os antioxidantes empregados foram o BHT (comercial artificial), o MECP e o LFCP. A Tabela 8 mostra a composição percentual aproximada dos ingredientes que foram empregados nas formulações dos biscoitos.

Tabela 8 - Porcentagem mássica dos ingredientes para formulação dos biscoitos de polvilho.

Massa base para biscoito de polvilho		
Ingredientes	Quantidade (%)	Quantidade (g)
Polvilho Azedo	41,12	500
Sal	1,31	16
Óleo de Canola	16,45	200
Leite	16,45	200
Ovo	8,22	100
Água	16,45	200

Fonte: Adaptado pelo autor (2021), com base em Aplevicz; Demiate (2007).

A avaliação da oxidação lipídica nos biscoitos foi observada em relação a ausência e a presença de antioxidantes sendo considerada quatro formulações de biscoito, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 – Formulações dos Biscoitos de Polvilho conforme adição de antioxidante

Formulação	Antioxidante
F1	Isento de antioxidante – formulação controle
F2	BHT (conforme legislação, 100 mg Kg ⁻¹ de gordura)
F3	MECP (500 mg Kg ⁻¹ de gordura)
F4	LFCP (750 mg Kg ⁻¹ de gordura)

Fonte: Autoria própria (2021).

A concentração de BHT nos biscoitos seguiu os limites estabelecidos da legislação brasileira, Resolução N° 383, de 5 de agosto de 1999, que regulamenta o uso de aditivos alimentares suas funções, estabelecendo a quantidade máxima de antioxidantes artificiais conforme o teor de gordura para produtos de panificação, biscoitos e similares com ou sem recheio, com ou sem cobertura, categoria na qual se enquadram biscoitos de polvilho (BRASIL, 1999). Conforme a legislação brasileira o BHT pode ser empregado em biscoitos sem recheio e sem cobertura no limite máximo de 100 mg/kg de gordura (BRASIL, 1999).

Não foram encontradas referências para o teor de antioxidante natural empregado em biscoitos de polvilho, a literatura versa que a própolis e seu coproduto já foram empregados em produtos cárneos submetidos ao congelamento, resfriamento e sob temperatura ambiente (REIS et al., 2017; ALMEIDA et al., 2017; BIANCHIN et al., 2017), com teores de antioxidante que variavam entre 100 e 500 mg Kg⁻¹ de amostra do alimento. As quantidades de antioxidante empregado nos biscoitos de polvilho, foram definidas aleatoriamente, sendo a quantidade de LFCP superior a quantidade de MECP.

O preparo da massa base foi iniciado pelo processo de escaldamento, desta forma, a mistura de polvilho com o sal foi escaldada por uma mistura de óleo e água em ponto de fervura (aproximadamente de 100 °C) e homogeneizado por 3 a 5 min. Em seguida, lentamente, foi adicionada ao polvilho escaldado uma mistura previamente homogeneizada de leite e ovo em temperatura ambiente, obtendo-se uma massa lisa e homogênea, por fim, foi adicionado o antioxidante de acordo com a Tabela 5.

A massa de cada formulação foi preparada separadamente, moldada com manga de confeitaria no formato cilíndrico em formas de alumínio. No momento de levar a cocção os biscoitos foram borrifados com água quente na temperatura de 98 °C e assados em forno elétrico (Fischer Fit-Line, Brusque, Brasil) com aquecimento

inferior e superior programado em 180 °C por um tempo de 10 - 13 min. Após essa etapa, os biscoitos foram resfriados em temperatura ambiente, embalados em embalagens comerciais simples de plástico transparente e armazenados em salas com temperatura ambiente e iluminação natural para o dia e a noite de aproximadamente 12 horas cada.

4.2.10 Avaliação da oxidação lipídica em biscoitos de polvilho

4.2.10.1 Teor de Substâncias Reativas ao Ácido 2-tiobarbitúrico (TBARS)

Análise da oxidação lipídica das formulações de biscoito de polvilho foi realizada com base no teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com adaptações ao método proposto por Vyncke (1970). Para extração de aldeídos das amostras de biscoito foi preparada uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 7,5 % (m/v), contendo 0,1 % (m/v) de propil galato e 0,1 % (m/v) de EDTA, responsáveis por evitar ação de interferentes pró oxidação.

Alíquotas de 2,5 gramas de cada formulação de biscoito foram previamente moídas e dissolvidas em 25 mL de TCA em tubos Falcon de 50,0 mL, sendo vigorosamente agitado por 1 min., em agitador de tubos tipo vortex. Em seguida a amostra foi filtrada, e 4 mL do filtrado foram colocados em tubo com tampa rosqueável com 1 mL de TCA 7,5% e 5 mL de TBA 0,02 mol L⁻¹. Os tubos com as amostras foram homogeneizados e colocados em banho-maria (95 °C) por 40 minutos. Decorrido o tempo de incubação, os tubos foram resfriados em banho de gelo e absorbância das amostras e das soluções de branco (5 mL de TBA e 5 mL de TCA) foram lidas a 538 nm em espectrofotômetro UV/VIS (UV/VIS 5300PC, Shangai, China).

Para determinação do malonaldeído (MDA) produzido durante a reação, uma curva de calibração com o padrão 1,1,3,3-tetrametoxipropano (TMP) foi construída em concentração variando de 0,0 mols a 4,50.10⁻⁸ mols. Os resultados foram calculados pela equação de reta e expressos em mg de MDA Kg⁻¹ de amostra.

4.2.10.2 Extração de lipídios e determinação da composição de ácidos graxos por cromatografia gasosa.

Primeiramente, amostras de biscoito de polvilho foram submetidas ao processo de extração lipídica pelo método Bligh; Dyer (1959) com algumas adaptações. Para extração, 5,0 g de amostra de biscoito triturado e homogeneizado foram inicialmente solubilizadas com água destilada e em seguida foi adicionado clorofórmio e metanol, respectivamente, na razão de 0,8:1:2 e submetidas a agitação em agitador magnético. Após 25 minutos de agitação foram adicionados novamente 10,0 mL de clorofórmio e sulfato de sódio 1,5% (m/v), e agitados por mais 5 minutos. A amostra foi filtrada e a fase orgânica separada em funil de separação, o solvente evaporado em estufa a 105 °C por 45 minutos.

O teor de lipídeos total (%) da amostra foi determinado conforme Equação 2.

$$\text{Teor de Lipídeos (\%)} = [(M_{\text{cadinho+lipídeos}} - M_{\text{cadinho}}) / M_{\text{amostra}}] \times 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Onde M: massa em gramas

4.2.10.3 Determinação dos ácidos graxos por cromatografia gasosa.

Após extração lipídica os ésteres metílicos dos ácidos graxos provenientes das distintas formulações de biscoitos de polvilho foram preparados com base em Hartman; Lago (1973) e IAL, (2008). Os ésteres foram analisados por cromatografia gasosa (Cromatógrafo Agilent, EUA) detectados em ionizador de chama (DIC) e separados em coluna capilar de sílica fundida (DB-Wax – Agilent) (30 m x 0,25 mm X 0,15 µm). A temperatura inicial do forno foi de 50 °C (2 min.) e o sistema cromatográfico foi programado com uma rampa de aquecimento de 3 °C.min⁻¹ até atingir 250 °C. A temperatura de injeção da amostra foi de 250 °C e a do detector programada para 300 °C, sendo o tempo de análise de 68,67 min., sob 6,51 psi de pressão na coluna. O hidrogênio foi usado como gás de arraste sob fluxo de 40 cm.s⁻¹. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL (modo split-50:1) e através de injeção automática. A identificação dos ácidos graxos foi realizada comparando-se o

tempo de retenção dos ésteres metílicos de ácidos graxos das amostras em relação a mistura de padrões certificados de ésteres metílicos de ácidos graxos com cadeia carbônica de 4 a 24 carbonos (Sigma-Aldrich, cód. 18919 - F.A.M.E. Mix, C4-C24). Os ácidos graxos foram quantificados pelo método de normalização com área corrigida, os resultados em gramas de ácido graxos para cada 100 gramas de amostra de biscoito resultam do produto do percentual em massa de cada éster metílico (método da normalização), do teor de lipídios da amostra (%) e do fator correspondente a contribuição majoritária de triacilgliceróis na composição dos ácidos graxos em amostras de óleo vegetal (VISENTAINER;FRANCO, 2006; VISENTAINER, 2012; AUED-PIMENTEL; ZENEBON, 2009; AUED-PIMENTEL et al., 2010).

Massa Ác. Graxo (g) / 100 g biscoito = FCT x % em massa E.M.A.G x LT (decimal)
Equação (3)

Onde:

FCT: fator de conversão para óleos vegetais (0,956);
LT: valor decimal do teor de lipídios da amostra.

4.2.11 Análise estatística

O software STATISTICA 8.0 foi utilizado para aplicação dos testes estatísticos. Os dados obtidos foram avaliados quanto a verificação dos pressupostos, e então foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). A normalidade e homogeneidade das variâncias foram avaliadas, sendo os resultados submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação entre as médias (comparação entre formulações para cada dia e comparação entre dias para cada formulação).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Eficiência do processo de microencapsulação

O extrato do coproduto da própolis microencapsulado foi submetido a análise de eficiência da encapsulação calculado em função do teor de compostos fenólicos totais presente na superfície das microcápsulas e totalmente encapsulados, que foram de $25,65 \pm 0,27$ e $69,28 \pm 0,33$ mg EAG g⁻¹, respectivamente, resultando numa eficiência de 62,97%. Esse valor de eficiência do processo de microencapsulação foi inferior ao resultado obtido por Reis et al. (2017) em extratos microencapsulados por spray dryer em coprodutos de vinho, estudo no qual também foi empregado o Capsul[®] como agente encapsulante, porém com eficiência de 76,86%.

Em processo de secagem realizado por Andrade et al. (2018) verifica-se que eficiência da encapsulação de amostras de própolis, revestidas com maltodextrina e goma arábica, variaram entre 70,38 e 79,84 %, valores mais próximos aos obtidos por Reis et al. (2017), e também superior ao processo de obtenção do MECP.

Jansen-Alves et al. (2019) em processo de encapsulação de extratos de própolis nas concentrações de 1; 2,5 e 5,0%, tendo com material de revestimento proteína de ervilha nas concentrações de 2; 4 e 6%, constatou para as nove formulações elaboradas, eficiência de encapsulação entre 49,4 e 97,0%, sendo o comportamento de aumento da eficiência sempre no sentido do aumento da concentração de própolis e de encapsulante.

Silva et al. (2014) em estudos no qual realizou a combinação de amido modificado (Capsul[™]) com maltodextrina, valendo-se de dois modos de homogeneização da emulsão, sendo um somente com Ultra-Turrax e outro com Ultra Turrax com pressurizador, obteve na encapsulação de óleo de café em spray dryer, eficiências de 87,6 e 98,9%, respectivamente. Estes valores são superiores aos verificados em Reis et al. (2017), Andrade et al. (2018) bem como no presente estudo.

As características químicas do material podem influenciar as interações deste com material de núcleo, favorecendo a encapsulação resultando em processos mais eficientes (JANSEN-ALVES et al., 2018). Referente a temperatura, o emprego de

temperaturas muito elevadas de desidratação torna os compostos suscetíveis a degradação, uma vez que o material microencapsulado obtido é menos denso e com maior superfície de contato com as paredes do equipamento (ANDRADE et al., 2018).

Através dos trabalhos realizados por Rocha et al. (2012), Silva et al. (2014), Andrade et al. (2018), Jansen-Alves et al. (2018) e Jansen-Alves et al. (2019) é possível suscitar que teor de material a ser revestido, as propriedades químicas do material envoltório, combinação de um ou mais agentes de revestimento, modo preparo e dispersão da emulsão (núcleo/encapsulante) e temperatura de secagem são alguns dos fatores que interferem na eficiência da encapsulação de processos de secagem em revestimento por atomização em *spray dryer*.

Considerando os percentuais referente aos estudos comparativos, considera-se a eficiência na obtenção do MECP relevante e satisfatória. Os estudos referenciados não estabelecem critério específico acerca das eficiências obtidas, tampouco estabelecem percentuais mínimos que definem níveis de eficiência.

Considera-se que a eficiência é um fator importante na avaliação das propriedades dos materiais encapsulados, uma vez que o processo de revestimento e manutenção dos compostos de fenólicos do coproduto da própolis pode favorecer seu propósito como antioxidante.

5.2 Morfologia e atividade antioxidante do (MECP)

As microcápsulas de coproduto de própolis obtidas do processo de microencapsulação foram analisadas quanto seu aspecto morfológico através da microscopia eletrônica de varredura. A análise demonstrou que as microcápsulas apresentaram formato cilíndrico com poucas depressões em sua estrutura, como pode ser observado nas Figuras 12 e 13. Análise de atividade de água das amostras foi semelhante as observadas por Reis et al. (2017), com valor médio de A_w de 0,402. Esse resultado se aproxima dos valores citados em estudos de análise de material microencapsulado (ANDRADE et al., 2018, JANSEN-ALVES et al., 2019, ROCHA et al., 2012) e representa produto com menor suscetibilidade a degradação.

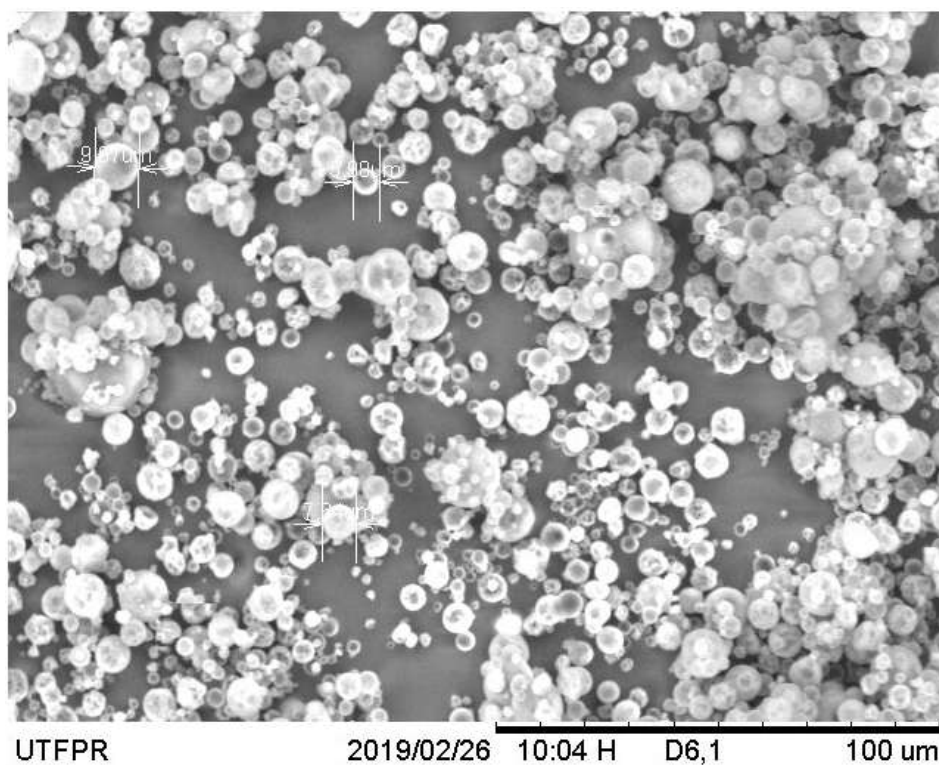


Figura 8 - Microestrutura MECP (Ampliação: 800X)
Fonte: Autoria própria (2021)

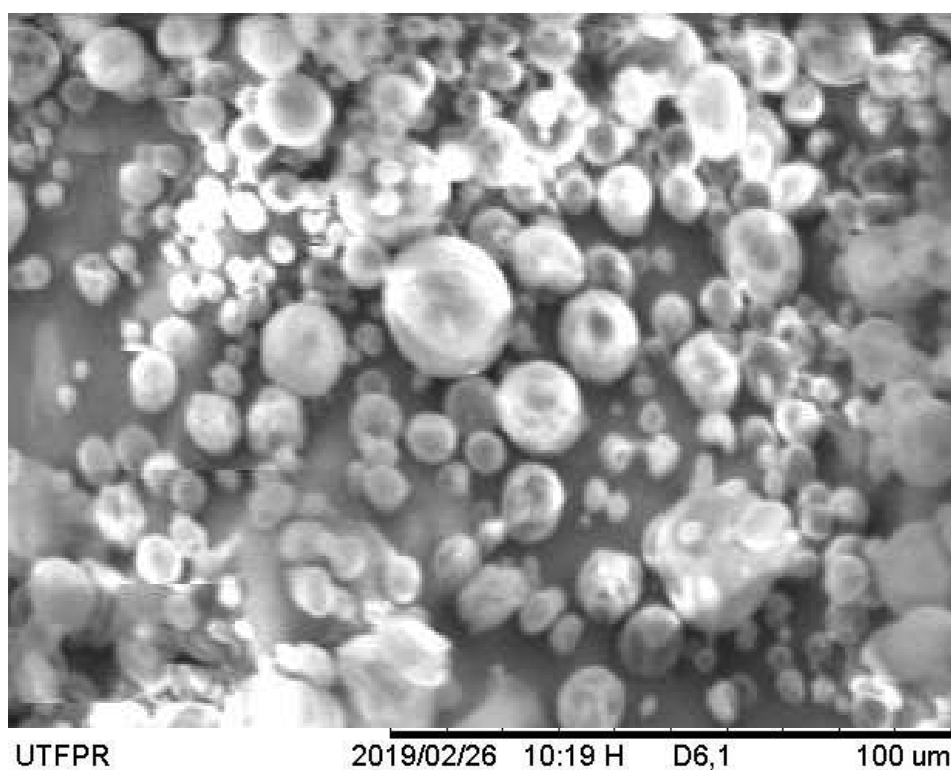


Figura 9 - Recorte Microestrutura MECP (Ampliação: 1000X)
Fonte: Autoria própria (2021)

Assim como observado nos trabalhos realizados por Reis et al. (2017), nota-se que a microcápsulas do MECP apresentam aspecto liso uniforme nas superfícies das microcápsulas. De acordo com Silva et al. (2013), o aspecto esférico das microcápsulas contribui para fluidez de materiais microencapsulados. A ausência de fissuras, depressões e rugosidades nas superfícies de materiais microencapsulados contribui para que o material revestido esteja protegido evitando exposição e degradação do material encapsulado (JANSEN-ALVES et al., 2019; ROCHA et al., 2012).

Micrografias dos extratos de própolis microencapsulado com maltodextrina e goma arábica desenvolvidas por Andrade et al. (2018) em *spray dryer* demonstram aspecto semelhante às observadas neste trabalho, sendo notado aglomerações de partículas menores ao redor de micropartículas de maior tamanho. Andrade et al., (2018), menciona que essa conformação de aglomeração é característica de processos de atomização por *spray drying*.

Análise da morfologia das micropartículas do MECP demonstram que processo de microencapsulação e os parâmetros empregados foram bem-sucedidos, estando o material de interesse revestido e protegido de modo conservar suas propriedades.

5.3. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos LFCP e MECP

Amostras de extratos liofilizados (LFCP) e microencapsulado (MECP) do coproduto da própolis foram submetidas as análises dos teores de compostos fenólicos totais (Folin-Ciocalteu) e atividade antioxidante pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP, os resultados das análises são apresentados na Tabela 10 a seguir.

Tabela 10 - Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante dos extratos LFCP e MECP.

		LFCP	MECP
Fenólicos Totais	(mg EAG/g)	199,78 ±0,28	69,28 ±0,33
ABTS	(µmol Trolox/g)	5041,81 ±25,79	485,92 ±3,01
DPPH		496,28 ±3,83	47,02 ±0,42
FRAP	(µmol Fe ²⁺ /g)	3796,28 ±13,59	386,69 ±2,31

Fonte: Autoria própria (2021).

Onde: LFCP: Extrato liofilizado do coproduto de própolis; MECP: Extrato microencapsulado do coproduto de própolis; EAG: Equivalente em ácido gálico.

O teor de fenólicos totais dos extratos LFCP e MECP foram de $199,78 \pm 0,28$ e $69,28 \pm 0,33$ mg EAG g^{-1} de amostra, respectivamente. O extrato LFCP apresentou atividade antioxidante pelo sequestro de radical ABTS de $5041,81 \pm 0,28$ μ mol de Trolox g^{-1} de amostra, enquanto que para o extrato MECP foi de $485,92 \pm 0,33$ μ mol de Trolox g^{-1} de amostra.

Os valores de atividade antioxidante pelo método DPPH para MECP foram consideravelmente menores que os registrados para LFCP, sendo, respectivamente, $47,02 \pm 0,42$ e $496,28 \pm 3,83$ μ mol de Trolox g^{-1} de amostra. O mesmo comportamento foi verificado na atividade antioxidante pelo método FRAP, com valores de $386,69 \pm 2,31$ μ mol de Fe^{2+} g^{-1} de amostra para o MECP e $3796,28 \pm 13,59$ μ mol de Fe^{2+} g^{-1} de amostra para LFCP.

É válido salientar que o objetivo do processo de microencapsulação se refere a proteção dos compostos fenólicos pelo revestimento, diminuindo sua suscetibilidade, não se trata de concentrar ou aumentar os teores de compostos fenólicos do extrato submetido ao processo de encapsulação, já o coproduto da própolis liofilizado resulta de processo que concentra compostos fenólicos fazendo que seu conteúdo fenólico seja maior e, naturalmente, apresente valores superiores de atividade antioxidante.

De Francisco et al. (2018) comparou a atividade biológica da própolis bruta ao material residual remanescente do processo da extração laboratorial dessa própolis. Nesse estudo, o teor de compostos fenólicos totais das amostras foram de 100,7 e 97,83 mg EAG/g em base seca, respectivamente, valores um pouco superiores ao extrato MECP, no entanto, inferiores ao extrato LFCP.

Cottica et al. (2011) menciona que seus extratos de própolis, com teor de compostos fenólicos variando de 48 a 87 mg GAE g^{-1} , preparados nas concentrações mássicas (5 a 30 % - m/m) e concentração de solvente variável (etanol, 60 a 96% v/v), posteriormente secas em spray dryer, estavam dentro da faixa de teor de compostos fenólicos estabelecido por Kumazawa et al. (2004).

Kumazawa et al. (2004) cita que amostras de própolis em geral apresentam teor de compostos fenólicos entre 31 e 299 mg EAG g^{-1} de amostra, esse entendimento que pode ser estendido aos extratos LFCP e MECP, que se enquadram na faixa de valores definidas por Kumazawa et al. (2004).

Amostras de própolis analisadas por Andrade et al. (2017) apresentaram conteúdo fenólico total de 90,55 (verde) 55,74 (marrom) e 91,32 (vermelha) mg EAG g⁻¹ de amostra, essas mesmas amostras encapsuladas (Andrade et al, 2018) não superaram 48,38 mg EAG g⁻¹ de amostra, teores de compostos fenólicos próximos aos obtidos com os extratos LFCP e MECP.

Nota-se que o resultado da atividade antioxidante para análise por DPPH é menor em relação ao método ABTS (Tabela 10), comportamento semelhante aos resultados obtidos por Tiveron et al. (2016) para ABTS e DPPH (Tabela 3).

Tiveron et al. (2016) considera que o maior potencial antioxidante observado para o método ABTS pode estar associado à solubilidade do ABTS, uma vez que esse radical tem por característica apresentar solubilidade em solventes orgânicos e em água, desta forma, o radical estaria suscetível a ação dos compostos antioxidantes com características lipofílicas e hidrofílicas. Ainda, Cottica et al. (2011), com base no teor de própolis e do solvente, infere que a concentração de própolis do extrato e teor de água do solvente etanólico interferem nos resultados do teor de compostos fenólicos e da atividade antioxidante.

Os resultados obtidos por Calegari et al. (2017) e os demais estudos apresentados no referencial bibliográfico (Tabela 3) permitem inferir como o resultado da análise da atividade antioxidante de própolis podem variar devido à fatores como a localidade, espécies vegetais e de abelhas, período do ano, podendo acrescentar aspectos ligados aos processos químicos analíticos de obtenção dos extratos e metodologias de análise e, em tempo, pela aplicação de processos de revestimento e conservação.

5.4 Identificação de compostos fenólicos (HPLC-ESI-MS)

Além do potencial antioxidante e quantificação total dos compostos fenólicos, avaliamos também a identificação e quantificação do perfil fenólico presente nos extratos MECP e LFCP por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas. A metodologia empregada permitiu identificação de dois compostos fenólicos no extrato LFCP, ácido siríngico e o ácido p-cumárico, nas concentrações de 427,03 µg g⁻¹ e 454,98 µg g⁻¹ de amostra, respectivamente. Enquanto que no MECP foi possível identificar a presença de pirocatecol na concentração de 32,5 µg

g⁻¹ de amostra (Tabela 11). Cabe ressaltar que o coproduto de extração comercial de própolis ainda é pouco estudado, o que dificulta uma comparação com estudos prévios.

Tabela 11 - Compostos fenólicos identificados por HPLC-MS em amostras de LFCP e MECP

Compostos	Tempo de retenção (min.)		Concentração [$\mu\text{g g}^{-1}$ amostra]	
	LFCP	MECP	LFCP	MECP
Pirocatecol	---	5,009	< LD	32,5
Ácido cafeico	---	---	< LD	< LD
Ácido siríngico	6,498	---	427,03	< LD
Mangiferina	---	6,668	< LD	< LD
Ácido p-cumárico	6,667	---	454,98	< LD
Kaempferol	8,472	8,487	< LD	< LD
Flavona	---	---	< LD	< LD

Fonte: Autoria própria (2021).

Onde: LD: limite de detecção.

Dentre os estudos com coproduto da própolis, Reis et al. (2017), avaliaram o extrato etanólico microencapsulado de coproduto de própolis da região Sul do Brasil e verificaram a presença de seis compostos fenólicos, dentre os quais, o ácido p-cumárico, presente também no extrato LFCP na concentração de 635,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ de amostra. Amostras de própolis orgânicas provenientes da região sul do Brasil, analisadas por Tiveron et al. (2016), foram identificados três ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico e ácido p-cumárico), sendo que o ácido p-cumárico estava presente em concentrações que variavam de 11635 a 883 $\mu\text{g mL}^{-1}$, concentrações superiores as detectadas no extrato LFCP.

Oldoni et al. (2015) encontraram 370,5 μg de p-cumárico por g de amostra em extratos de própolis bruta coletada na mesma região de origem do coproduto da própolis empregado neste trabalho. Amostras de coproduto de própolis analisadas neste trabalho e na pesquisa de Reis et al. (2017), assim como amostras de própolis estudadas por Oldoni et al. (2015) em própolis bruta são provenientes de própolis coletadas em regiões muito próximas no estado do Paraná, região sul do Brasil, que permite suscitar semelhanças na composição química destas.

Além dos compostos já mencionados, Tiveron et al. (2016) também identificaram nas amostras a presença de ácido cafeico, pinocembrina e o Artepelin C. O Artepelin C, composto associado a elevada atividade antioxidante foi

encontrado em altas concentrações (22303 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para Tiveron et al. (2016) as grandes variedades de espécies vegetais da região sul do Brasil contribuem para uma maior variedade de resinas produzidas, conseqüentemente resultando numa composição fenólica diversa.

Embora extratos de própolis analisados por Oldoni et al., (2015) tenham demonstrado baixos teores de flavonoides, considera-se que a atividade antioxidante resulta de compostos fenólicos não identificados, neste sentido, Reis et al. (2017), considera positivo o uso da própolis revestida em alimentos.

Andrade et al. (2017) e Andrade et al. (2018), inferem que há uma relação entre os compostos fenólicos identificados e mensurados em amostras de extratos própolis e extratos de própolis microencapsulados, dentre os quais, ácidos fenólicos (ácido cumárico, Artepilin C, ácido protocatecúico, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido clorogênico, vanilina, ácido trans-isoferúlico, ácido gálico e éster fenílico do ácido cafeico) e flavonóides (pinocembrina, kaempferol, rutina, biocanina A, acacetina, isorhamnetina, quercetina-3-glucosídeo, crisina, naringenina, epicatequina, luteolina e (+) - catequina).

O avanço na identificação dos compostos fenólicos presentes na própolis tem sido associada a estudos das espécies vegetais responsáveis por suas características químicas, uma vez que inúmeras são as fontes vegetais de exsudados resinosos que compõem a própolis, aspecto que dificulta estabelecer uma identidade química (composto) específica, além dos efeitos associados aos diferentes métodos de extração e determinação dos compostos presentes na própolis e em suas fontes vegetais (BANKOVA et al., 2018).

Considera-se que resultados de estudos já realizados para identificação de compostos fenólicos permitem inferir que o resultado para coproduto da própolis analisada neste trabalho é positivo, que outros compostos fenólicos não identificados podem estar presentes, ensejando aperfeiçoamento da metodologia de preparo dos extratos e da técnica cromatográfica no intuito de melhorar a identificação e quantificação dos compostos fenólicos.

5.5 Avaliação da oxidação lipídica dos biscoitos de polvilho

5.5.1 Análise da substância reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Alimentos elaborados com óleos e gorduras estão sujeitos ao processo de oxidação lipídica, com a finalidade de verificar e acompanhar ocorrência deste processo, um dos métodos adotados neste trabalho considerou a análise das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBRAS) com base na concentração de malonaldeído (MDA).

O período de observação das amostras de biscoito foi de 45 dias, as análises foram realizadas nos tempos 0, 15, 30 e 45 dias, em amostras mantidas sob temperatura ambiente, entre 20 e 25 °C. Os resultados das análises de TBARS para F1, F2, F3 e F4 são apresentados na Tabela 12 e Figura 10.

Tabela 12 – Valores médios de TBARS em biscoitos de polvilho armazenados em temperatura ambiente (23 ± 3°C) por 45 dias

Tratamento	TBARS – mg de malonaldeído Kg ⁻¹ de biscoito			
	Período de Armazenamento (dias)			
	0	15	30	45
F1	11,20 ±1,65 ^{aA}	8,95±0,34 ^{a,B}	7,28±0,26 ^{b,BC}	6,11±0,20 ^{a,BC}
F2	12,32±0,31 ^{a,A}	8,89±0,91 ^{a,B}	9,01±1,31 ^{ab,B}	6,01±1,04 ^{a,C}
F3	12,87±0,08 ^{a,A}	8,68±0,89 ^{a,B}	9,30±0,73 ^{ab,B}	6,58±0,84 ^{a,C}
F4	11,89±0,52 ^{a,A}	7,53±1,91 ^{a,AB}	9,61±0,80 ^{a,B}	6,64±0,99 ^{a,B}

Fonte: Autoria própria (2021)

F1: controle (isenta de antioxidante); F2: biscoitos com antioxidante artificial (BHT); F3: biscoitos com extrato microencapsulado de coproduto da própolis (MECP) e F4: biscoitos com extrato liofilizado do coproduto da própolis (LFCP). Letras minúsculas diferente na mesma coluna representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey para as diferentes formulações no mesmo tempo de análise. Letras maiúsculas diferentes na mesma linha representam diferenças significativas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey para a mesma formulação nos diferentes períodos tempos de análise.

Os valores médios de TBARS observados nos biscoitos de polvilho durante período de análise variaram de 6,01 mg a 12,87 mg de malonaldeído Kg⁻¹ de biscoito, sendo que valores superiores a 11 mg de malonaldeído Kg⁻¹ de biscoito foram percebidos apenas em T=0. Mesmo não havendo diferenças estatísticas significativas entre as diferentes formulações, nota-se uma pequena diminuição no teor de malonaldeído em todas as formulações, sugerindo a redução do processo de oxidação lipídica com o decorrer do tempo.

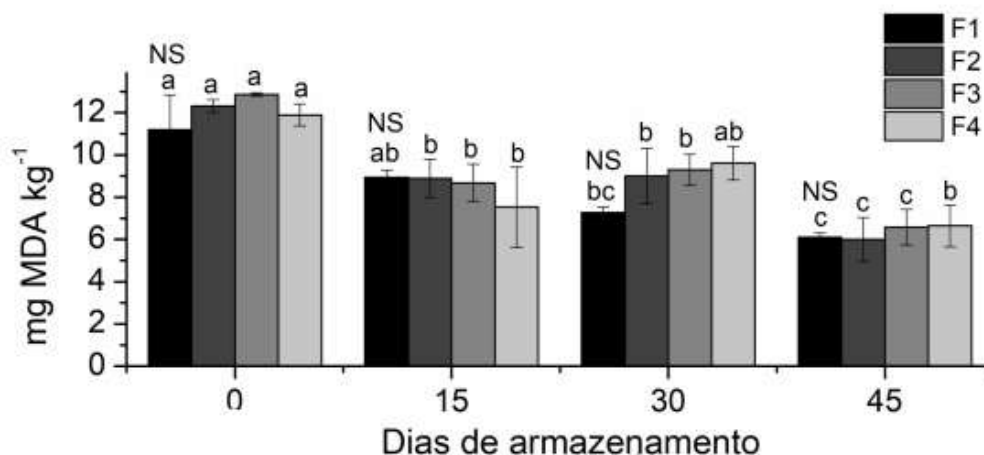


Figura 10 - Teor de malonaldeído (MDA) em diferentes formulações de biscoitos de polvilho durante armazenamento a temperatura ambiente.

Fonte: Autoria própria (2021).

Onde: F1: amostra de biscoitos controle (isenta de antioxidante); F2: amostra de biscoitos com antioxidante artificial (BHT); F3: amostra de biscoitos com extrato microencapsulado de coproduto da própolis (MECP); F4: amostra de biscoitos com extrato liofilizado do coproduto da própolis (LFCEP); NS: não há diferenças estatísticas ($p > 0,05$) pelo teste Tukey entre as formulações (F1, F2, F3 e F4) nos respectivo tempo de armazenamento; Letras minúsculas diferentes sob a coluna da formulação representa diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey para a formulação no decorrer do tempo de armazenamento.

A formulação de biscoito contendo o extrato MECP (F3) teve redução significativa no teor de MDA ao final de 45 dias de armazenamento com uma redução de 48,88% no teor de MDA. Decorrido os 45 dias de armazenamento, os biscoitos contendo o extrato LFCEP (F4) apresentaram 44,15% de redução do teor de MDA em relação ao valor inicial de MDA. Entretanto, no período de 15 dias de observação as variações de MDA não foram significativas.

Os percentuais de redução do teor de MDA inferem que amostras de biscoitos contendo o BHT (F2) e o extrato MECP (F3) atuaram com maior significância e foram as formulações mais efetivas na redução dos teores de MDA, desempenhando melhor efeito na inibição da oxidação lipídica. Apesar da presença de antioxidante natural o extrato LFCEP, a amostra F4 demonstrou uma redução no teor de MDA abaixo do observado em F1 (isenta).

Nota-se que MECP (F3) demonstrou ser mais eficiente que LFCEP (F4) na inibição da oxidação lipídica, também, era esperado que na análise dos efeitos da aplicação de antioxidante nos biscoitos de polvilho demonstrasse diferenças significativas quanto ao teor de MDA entre amostras controle e àquelas nas quais

foram aplicados os antioxidantes. Vargas et al. (2019) em estudos de oxidação lipídica acelerado de óleo de canola tratado com extratos de folha pitanga, também constatou que efeito da aplicação de seus extratos resultou em valores de TBARS próximos aos observados em amostras com BHT.

Embora valores de MDA para amostras com BHT (F2) e MECP (F3) sejam similares, os efeitos adversos à saúde associados ao emprego de BHT em alimentos e o fato deste ter sido banido em alguns países, tais aspectos justificam o emprego dos antioxidantes naturais do coproduto da própolis LFCP e MECP.

Suscetibilidade dos compostos antioxidantes em F4, suscita que as ações dos compostos antioxidantes podem ter sido parcialmente comprometidas em face da cocção. Neste sentido, a redução percentual dos teores de MDA observada para F3 sugere que o revestimento por microencapsulação contribui na manutenção de compostos com ação antioxidante sendo seu efeito na redução do teor de MDA superior ao observado em F2 e F1, e próximo aos observado em F2.

De modo geral, trabalhos de revisão que versam acerca da aplicação da análise de TBARS em diferentes amostras de alimentos contendo lipídeos (PAPASTERGIADIS et al., 2012), tratam em sua grande maioria de estudos em produtos cárneos (REIS et al., 2017; ALMEIDA et al., 2017; BIANCHIN et al., 2017). Em menor evidência, é possível encontrar estudos de oxidação lipídica em *cookies* e biscoitos (BIALEK et al., 2015; BAJAJ et al., 2016). Bajaj et al. (2016) menciona que não há parâmetros que definam o grau de oxidação pelo método de TBARS para produtos assados e, até o presente estudo não foi encontrado nenhum trabalho que remeta a resultados de análise de oxidação lipídica por TBARS para biscoitos de polvilho.

Osuna et al. (2018) analisaram formulações de pães que diferiam quanto ao tipo de óleo vegetal (canola e oliva) e quanto aos antioxidantes empregados (α -tocoferol, ácido ascórbico e BHT). Neste estudo os autores constataram que independentemente do antioxidante empregado, as formulações feitas com óleo de canola apresentaram comportamento de diminuição nos valores de MDA, efeito similar foi observado nos biscoitos de polvilho. Os autores verificaram que após 6 dias de armazenamento houve uma diminuição de 8,5 para 5,1 mg de MDA kg^{-1} de amostra no pão adicionado de BHT. Além disso, após 6 dias de armazenamento, o pão formulado com óleo de oliva sem adição de antioxidante apresentou índice de 11,75 mg de MDA kg^{-1} de amostra. Ainda que não se refira ao mesmo óleo

empregado nas formulações de biscoito de polvilho do presente estudo, valores registrados por Osuna et al. (2018) são próximos e até superiores aos teores de malonaldeído observados nos biscoitos de polvilho.

Por outro lado, os valores obtidos no estudo dos biscoitos de polvilho foram superiores quando comparados a valores de análise de TBARS para produtos cárneos constatados nos trabalhos realizados por Reis et al. (2017) e Carpes et al. (2020).

Considerando observações feitas por Papastergiadis et al. (2012), também no caso do estudo com biscoitos de polvilho, é possível que o valor elevado para espécies reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico para método empregado na análise das amostras sejam resultantes não apenas do MDA produzido, mas de outros produtos (aldeídos) provenientes da oxidação de ácidos graxos polinsaturados e que estes estejam associados a matriz alimentar e ao óleo de canola empregado nos biscoitos de polvilho.

Exceto pela hipótese de estudos já realizados, mas ainda não publicizados, os valores observados de malonaldeído pelo métodos TBARS para biscoitos de polvilho neste estudo são considerados inéditos e podem ser interpretados como referência para um método simples e barato empregado na análise da oxidação lipídica de biscoitos de polvilho formulados com óleo de canola.

5.5.2 Análise dos ácidos graxos por GC-FID

Amostras de biscoito de polvilho também foram submetidas a análise da oxidação lipídica por meio da determinação dos ácidos graxos por GC-FID. Para determinação dos ácidos graxos os lipídios totais das amostras foram extraídos e os seus valores percentuais são apresentados na Tabela 13 e Figura 11.

Tabela 13 - Teor de lipídios totais extraídos dos biscoitos durante armazenamento

Formulação de Biscoito	Período de Armazenamento (dias)			
	T1: 0	T2: 15	T3: 30	T4: 45
F1	12,60 ±0,43	13,98 ±0,63	14,55 ±0,94	14,18 ±1,56
F2	12,73 ±0,21	14,32 ±1,14	14,15 ±0,50	14,68 ±0,81
F3	12,43 ±0,43	14,77 ±0,40	15,60 ±0,38	14,82 ±0,37
F4	11,99 ±0,62	14,08 ±0,55	14,67 ±0,62	14,08 ±0,56

Fonte: Autoria própria (2021).

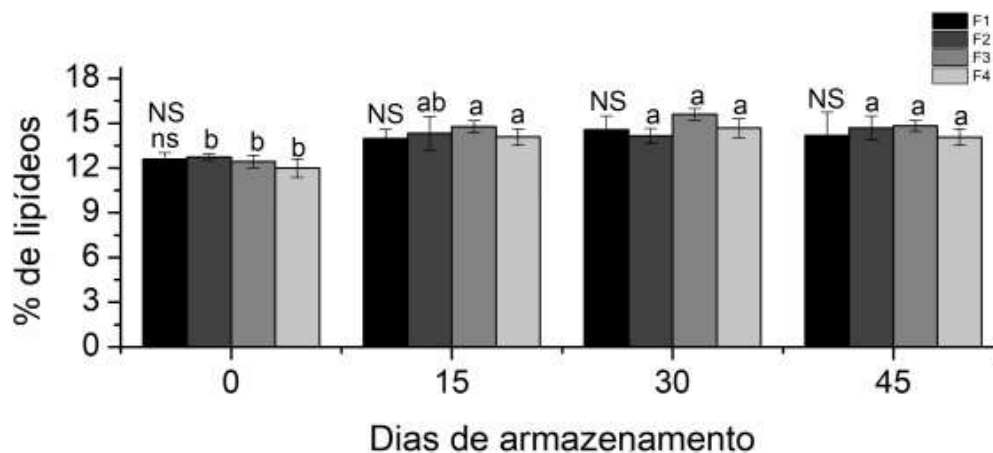


Figura 11 – Variação do % de lipídios para F1, F2, F3 e F4 durante o armazenamento.

Fonte: Autoria própria (2021).

Onde: NS: não há diferenças estatísticas ($p > 0,05$) pelo teste Tukey entre as formulações (F1, F2, F3 e F4) nos respectivo tempo de armazenamento; Letras minúsculas diferentes sob a coluna da formulação representa diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey para a formulação no decorrer do tempo de armazenamento.

Na Figura 11, é possível constatar que não há diferenças significativas no percentual de lipídios extraídos das diferentes formulações com o decorrer do tempo.

Os ácidos graxos presentes nos lipídios extraídos das amostras de biscoitos de polvilho (F1, F2, F3 e F4), foram submetidos ao processo de esterificação e, posteriormente, determinados por GC-FID. Análise por cromatografia gasosa permitiu identificar e quantificar os seguintes ácidos graxos: ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1n-9), ácido linolelaídico (C18:2), ácido linoleico (C18:2n-6) e ácido α -linolênico (C18:3n-3). Os cromatogramas para as diferentes formulações em 0, 15, 30 e 45 dias são apresentados no Apêndice B.

De acordo com Instrução Normativa Nº 49, de 22 de dezembro de 2006, regulamento que estabelece as características de identidade e qualidade dos óleos vegetais refinados (BRASIL, 2006), para o óleo de canola os teores dos ácidos graxos C16:0; C18:0; C18:1n-9; C18:2n-6; e C18:3n-3, pode variar respectivamente de acordo com os seguintes percentuais 2,5 a 7,0 %; 0,8 a 3,0 %; 51 a 70 %; 15 a 30 %, e 5 a 14 %.

Óleo de canola foi analisado por Santos et al. (2020), o estudo analisou amostras de canola que foram submetidas a processos de extração por prensagem

(5 variações de tempo e pressão) e pelo método Bligh & Dyer (1959), sendo identificados por GC-FID os seguintes ácidos graxos: palmítico, palmitoleico (C16:1n-7), esteárico, oleico, vacênico (C18:1n-7), linoleico, alfa-linolênico e araquidônico (C20:0). Os teores aproximados de ácidos graxos foi de 6,02 à 12,07% para ácidos graxos saturados, já os ácidos graxos monoinsaturados registraram teores na faixa de 66,92 a 70,45% e, os ácidos graxos poli-insaturados tiveram concentração entre 20,57 e 24,09%.

Porto et al. (2016), analisou o comportamento dos ácidos graxos por GC-FID de óleos vegetais, dentre eles o óleo de canola, quando submetidos ao aquecimento e reuso nas temperaturas de 180 e 240 °C, respectivamente. Em seus estudos foram identificados na amostra de óleo de canola os ácidos graxos saturados: palmítico (C:16) e esteárico (C:18), e os ácidos graxos insaturados: ácidos oleico (C:18-1), linoleico (C18:2) e o linolênico (C18:3). Os percentuais aproximados de ácidos graxos saturados e de ácidos graxos insaturados da amostra de óleo de canola foram de 6,8% e 83,6%, respectivamente, não apresentando variação significativa que caracteriza-se a degradação do óleo (PORTO et al., 2016).

Na figura 12 é apresentada a variação das concentrações (g/100g de amostra) dos ácidos graxos quantificados em cada amostra no decorrer do tempo.

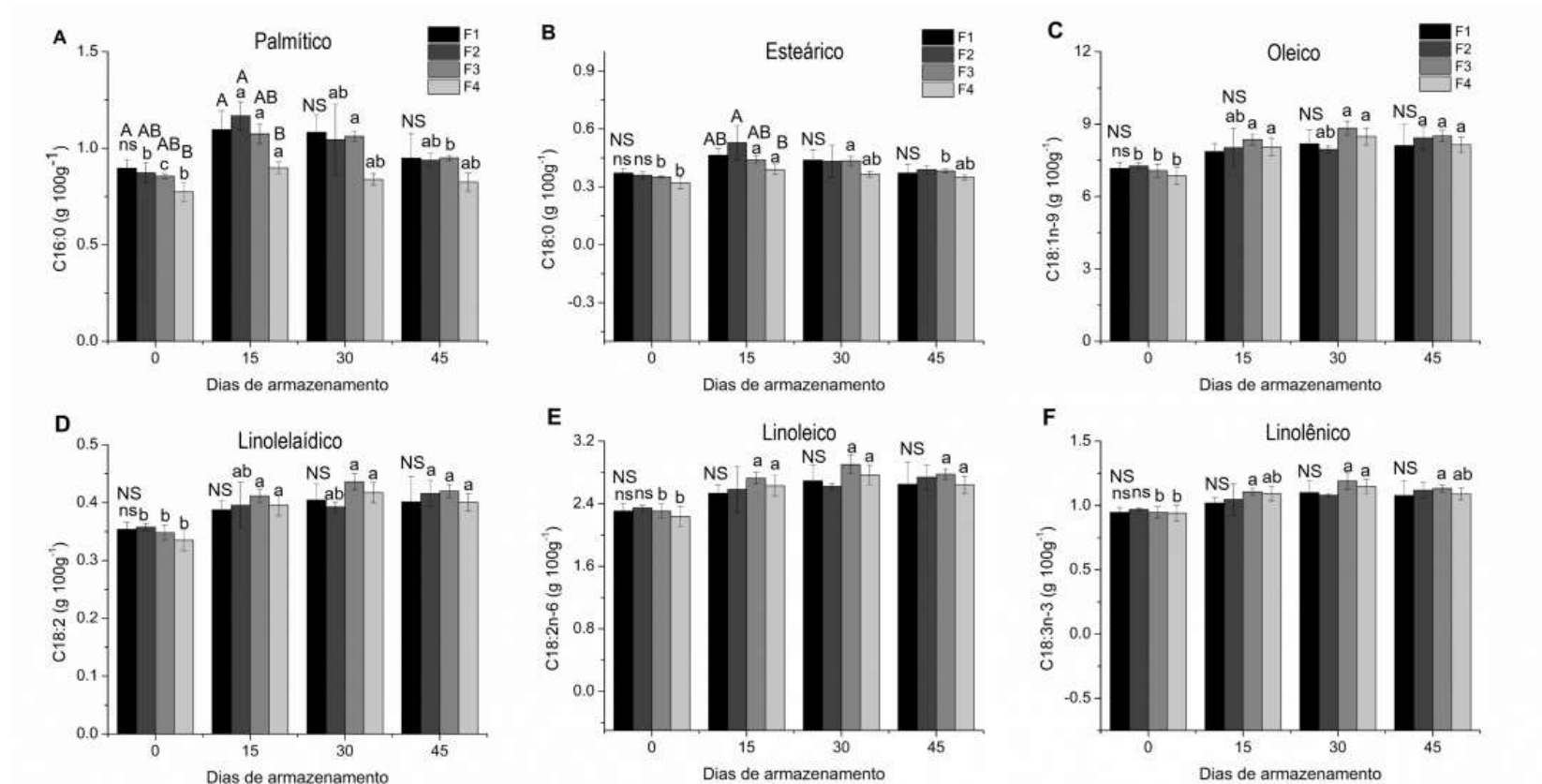


Figura 12 - Ácidos Graxos identificados em F1, F2, F3 e F4 durante armazenamento

Fonte: Autoria Própria (2021).

Onde: NS: não há diferenças estatísticas ($p > 0,05$) pelo teste Tukey entre as formulações (F1, F2, F3 e F4) nos respectivos tempos de armazenamento; Letras maiúsculas diferentes sob a coluna da formulação representa diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey entre as formulações (F1, F2, F3 e F4) nos respectivo tempo de armazenamento; Letras minúsculas diferentes sob a coluna da formulação representa diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey para a formulação no decorrer do tempo de armazenamento.

De acordo com a Figura 12, durante o período de armazenamento, os teores dos ácidos oleico, linolelaídico, linoleico e linolênico não apresentaram variações significativas entre as diferentes formulações. Os ácidos graxos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0) demonstram uma variação mais pronunciada em T:0 e T:1, com destaque para variação observada para C16:0 em F2. Em T:3 e T:4 as formulações demonstram constância no teor dos ácidos graxos saturados C16:0 e C18:0.

Entre 0 e 30 dias de armazenamento, observa-se que todas as formulações apresentam um ligeiro acréscimo nas concentrações dos ácidos oleico, linolelaídico, linoleico e linolênico, decorridos 45 dias esses teores não apresentam mais o sutil aumento observado entre 0 e 30 dias. No período de 0 a 30 dias de armazenamento, a variação nos teores destes ácidos graxos é mais proeminente para amostra F3 (MECP) que, após 15 dias de armazenamento, passa a apresentar os maiores teores dos ácidos oleico, linolelaídico, linoleico e linolênico entre as quatro formulações.

Além da composição dos ácidos graxos, estudos com lipídios costumam expressar as relações entre os teores de ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI). A relação entres esses grupos de ácidos graxos contribui para observação da variação da composição lipídica (VARGAS et al., 2019; FLAKELAR et al., 2015; BOROSKI et al., 2018; SANTOS et al. 2020; PORTO et al., 2016).

Na Figura 13, é apresentado o comportamento das frações dos ácidos graxos totais (Total), saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) e poli-insaturados (AGPI), bem como a relação entre AGPI/AGS.

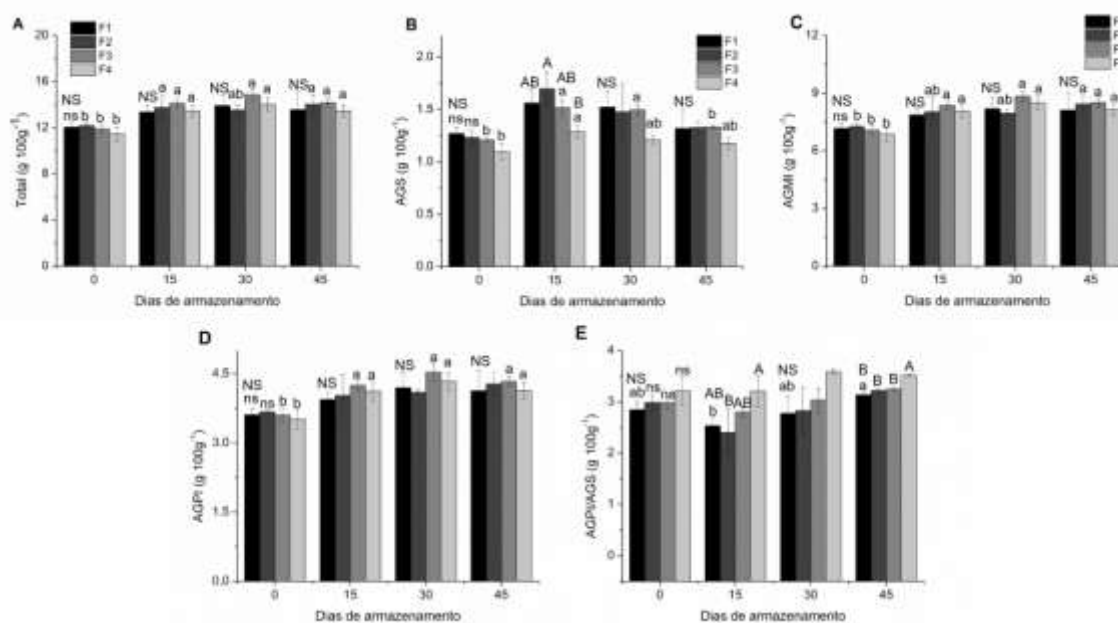


Figura 13 - Ácidos Graxos Totais, AGS, AGMI, AGPI e AGPI/AGS em F1, F2, F3 e F4 durante armazenamento

Fonte: Autoria Própria (2021).

Onde: NS: não há diferenças estatísticas ($p > 0,05$) pelo teste Tukey entre as formulações (F1, F2, F3 e F4) nos respectivo tempo de armazenamento; Letras maiúsculas diferentes sob a coluna da formulação representa diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey entre as formulações (F1, F2, F3 e F4) nos respectivo tempo de armazenamento; Letras minúsculas diferentes sob a coluna da formulação representa diferenças estatísticas ($p < 0,05$) pelo teste Tukey para a formulação para os diferentes tempos de armazenamento.

Nota-se que o teor de ácidos graxos totais apresentam ligeiro acréscimo nos tempos T=0 para T=15 dias para todas as formulações, entretanto, as variações nos teores de ácidos graxos totais entre as formulações não são significativas em nenhum dos tempos analisados.

Os dados referentes ao teor de AGS apresentados em B na Figura 13 corroboram com o comportamento observado em A e B da Figura 16 que remete aos ácidos graxos palmítico e esteárico, ou seja, em 15 dias de armazenamento o teor de C16:0 e C18:0 são maiores para a amostra F2.

Exceto aos 15 dias armazenamento, onde F2 apresenta a menor relação AGPI/AGS, essa relação (AGPI/AGS) é sempre maior para as amostras conforme quantidade de antioxidante empregados (mg / g de gordura), ou seja, em 0, 30 e 45 dias de armazenamento a relação AGPI/AGS segue o seguinte comportamento $F4 > F3 > F2 > F1$.

As observações tomadas em relação a composição e comportamento das frações dos ácidos graxos dos biscoitos de polvilho suscita que o efeito esperado da

aplicação dos antioxidantes naturais MECP e LFCP foi alcançada haja visto a manutenção dos ácidos graxos do óleo empregado.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos liofilizado (LFCP) e microencapsulado (MECP) demonstraram altos teores de compostos fenólicos com atividade antioxidante interessante para ser utilizados como aditivo em biscoitos de polvilho.

A análise dos compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao espectro de massas, permitiu identificar 3 compostos fenólicos presentes nas amostras de LFCP e MECP.

O processo de microencapsulação por *spray drying* demonstrou ser efetivo, uma vez que a eficiência do processo esteve próxima aos percentuais observados na literatura. Além disso, o material empregado no revestimento do coproduto da própolis mostrou ser um bom agente de revestimento, tendo as microcápsulas apresentado características morfológicas semelhantes as alcançadas em encapsulação de outros extratos vegetais.

Ainda que resultado obtidos para amostra controle (F1) sejam similares as demais formulações (F2, F3 e F4), considera-se que as análises da substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram realizadas com êxito, podendo os resultados obtidos para análise servir de referência para alimentos com as mesmas características de composição dos biscoitos de polvilho.

A redução dos valores de MDA observados, infere efeito da ação dos antioxidantes empregados, LFCP e MECP, sendo que o avanço deste estudo pode se dar com a incorporação de análises que permitam correlacionar os valores de MDA a ausência ou presença de outros compostos resultantes da oxidação lipídica.

A metodologia de análise da composição dos ácidos graxos realizada em cromatógrafo gasoso com detector de ionização em chama permitiu identificar os principais ácidos graxos provenientes do óleo de canola empregado na elaboração dos biscoitos. A análise dos ácidos graxos durante período de armazenamento não demonstrou alterações que pudessem caracterizar processo de oxidação lipídica, neste sentido, considera se positivo o efeito da aplicação de antioxidante na inibição da oxidação lipídica.

Os extratos LFCP e MECP demonstraram potencial de aplicação como antioxidantes naturais em biscoito de polvilho devido aos efeitos benéficos na inibição da oxidação lipídica. Entretanto, outros estudos como a biodisponibilidade e

manutenção dos compostos fenólicos e a aceitação sensorial faz se necessário para a viabilidade econômica do produto alimentício.

8 REFERÊNCIAS

- ADEGOKE, G. O.; KUMAR, M. V.; GOPALA KRISHNA, A. G.; VARADARAJ, M. C.; SAMBAIAH, K.; LOKESH, B.R. Antioxidants and lipid oxidation in foods - A critical appraisal. **Journal of Food Science and Technology**, v. 35, n. 4, p. 283-298, 1998.
- ALMEIDA, E. T. C.; DA SILVA, M. C. D.; OLIVEIRA, J. M. DOS S.; et al. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 7, n. 5, p. 280–287, 2017. Elsevier.
- ALMEIDA, J. DE F.; REIS, A. S. DOS; HELDT, L. F. S. Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 299–305, 2017.
- ALMEIDA, J. F.; CARPES, S. T.; OVIEDO, M. S. V. P.; SERAFINI, L. F.; PEREIRA, D. Atividade antioxidante in vitro e microencapsulação por spray drying de extrato hidroalcoólico de Sálvia (*Salvia officinalis* L.). **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 5, n. 2, p. 41–49, 2014.
- ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; ANDRADE, G. R. S.; et al. Development and characterization of microcapsules containing spray dried powder obtained from Brazilian brown, green and red propolis. **Food Research International**, v. 109, p. 278–287, 2018. Elsevier Ltd.
- ANDRADE, J. K. S.; DENADAI, M.; DE OLIVEIRA, C. S.; NUNES, M. L.; NARAIN, N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**, v. 101, p. 129–138, 2017.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, n. 1, p. 183–198, 2002.
- APAK, R.; GORINSTEIN, S.; BÖHM, V.; et al. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report)*. **Pure Appl. Chem**, v. 85, n. 5, p. 957–998, 2013.
- APLEVICZ, K. S.; DEMIATE, I. M. Caracterização de amidos de mandioca nativos e modificados e utilização em produtos panificados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 3, p. 478–484, 2007. SBCTA.
- ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; DE MORAIS, D. R.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. M. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 245, p. 738–749, 2018.

AUED-PIMENTEL, S.; KUS, M. M. M.; KUMAGAI, E. E.; RUVIERI, V.; ZENEBON, O. Comparison of gas chromatographic and gravimetric methods for quantization of total fat and fatty acids in foodstuffs. **Quimica Nova**, v. 33, n. 1, p. 76–84, 2010..

AUED-PIMENTEL, S.; ZENEBON, O. Lipídios totais e ácidos graxos na informação nutricional do rótulo dos alimentos embalados: aspectos sobre legislação e quantificação. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, p. 167–181, 2009.

BAJAJ, S.; UROOJ, A.; PRABHASANKAR, P. Antioxidative properties of mint (*Mentha spicata* L.) and its application in biscuits. **Current Research in Nutrition and Food Science**, v. 4, n. 3, p. 209–216, 2016.

BAKRY, A. M.; ABBAS, S.; ALI, B.; et al. Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 143–182, 2016.

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

BANKOVA, V.; POPOVA, M.; TRUSHEVA, B. The phytochemistry of the honeybee. **Phytochemistry**, v. 155, p. 1–11, 2018.

BANSODE, S. S.; BANARJEE, S. K.; GAIKWAD, D. D.; JADHAV, S. L.; THORAT, R. M. Microencapsulation : a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 1, n. 2, p. 38-43, 2010 .

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

BATAGLION, G. A.; DA SILVA, F. M. A.; EBERLIN, M. N.; KOOLEN, H. H. F. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 180, p. 280–287, 2015.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant Power”: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.

BIALEK, M.; RUTKOWSKA, J.; BIALEK, A.; ADAMSKA, A. Oxidative stability of lipid fraction of cookies enriched with chokeberry polyphenols extract nutritional programming and the risk of cardiovascular diseases. Preliminary research using conjugated linoleic acid (CLA) on a rat model. View project. **PoI. J. Food Nutr. Sci**, v. 66, n. 2, p. 0–0, 2015.

BIANCHIN, M.; PEREIRA, D.; DOS REIS, A. S.; et al. Rosemary essential oil and lyophilized extract as natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in pork sausage. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 13, n. 5, p. 210–217, 2017.

- BITTENCOURT, M. L. F.; RIBEIRO, P. R.; FRANCO, R. L. P.; et al. Metabolite profiling, antioxidant and antibacterial activities of Brazilian propolis: Use of correlation and multivariate analyses to identify potential bioactive compounds. **Food Research International**, v. 76, p. 449–457, 2015.
- BLIGH, E. .; DYER, W.. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology** , v. 37, n. 2, 1959.
- BOROSKI, M.; AGUIAR, A. C.; ROTTA, E. M.; et al. Antioxidant activity of herbs and extracted phenolics from oregano in canola oil. **International Food Research Journal**, v. 25, n. 6, p. 244-2452, 2018.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BRASIL. ANVISA. Resolução nº 383, de 5 de agosto de 1999. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 7 – produtos de panificação e biscoitos. 1999.
- BRASIL. ANVISA. Resolução nº 23, de 15 de março de 2000. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Regulamento Técnico sobre o Manual de Procedimentos Básicos para Registro e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos. 2000.
- BRASIL. ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 263, de 22 de setembro de 2005. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária Brasil**. Regulamento técnico para produtos de cereais, amidos, farinhas e farelos.
- BRASIL, MAPA. Instrução Normativa Nº 49, de 22 de dezembro de 2006. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Óleos Vegetais Refinados; a Amostragem; os Procedimentos Complementares; e o Roteiro de Classificação de Óleos Vegetais Refinados. **MINISTRO DE ESTADO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO**, 2006
- BÚFALO, M. C.; BORDON-GRACIANI, A. P.; CONTI, B. J.; DE ASSIS GOLIM, M.; SFORCIN, J. M. The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 10, p. 1497–1504, 2014.
- BÚFALO, M. C.; FERREIRA, I.; COSTA, G.; et al. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 149, n. 1, p. 84–92, 2013.
- BUSCH, V. M.; PEREYRA-GONZALEZ, A.; ŠEGATIN, N.; et al. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 227–235, 2017.

CABRAL, I. S. R.; OLDONI, T. L. C.; PRADO, A.; et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1523–1527, 2009.

CALEGARI, M. A.; PRASNIEWSKI, A.; DA SILVA, C.; et al. Propolis from southwest of parana produced by selected bees: Influence of seasonality and food supplementation on antioxidant activity and phenolic profile. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1, p. 45–55, 2017.

CAPONIO, F.; GOMES, T.; PASQUALONE, A.; SUMMO, C. Use of the high performance size exclusion chromatography analysis for the measurement of the degree of hydrolytic and oxidative degradation of the lipid fraction of biscuits. **Food Chemistry**, v. 102, n. 1, p. 232–236, 2007.

CARPES, S. T.; BEGNINI, R.; ALENCAR, S. M. DE; MASSON, M. L. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1818–1825, 2007.

CARPES, S. T.; PEREIRA, D.; MOURA, C. DE; et al. Lyophilized and microencapsulated extracts of grape pomace from winemaking industry to prevent lipid oxidation in chicken pâté. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, p. 2019112, 2020.

COTTICA, S. M.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N.; et al. Antioxidant activity and composition of propolis obtained by different methods of extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 929–935, 2011.

EMBUSCADO, M. E. Spices and herbs: Natural sources of antioxidants – a mini review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 811–819, 2015. Elsevier. 7>. Acesso em: 18/6/2019.

ESCARPA, A.; GONZALEZ, M. C. An Overview of Analytical Chemistry of Phenolic Compounds in Foods. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 57–139, 2001.

ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F.; SANTOS, L.; ALVES, A. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, n. 2, p. 138–155, 2013.

FLAKELAR, C. L.; LUCKETT, D. J.; HOWITT, J. A.; DORAN, G.; PRENZLER, P. D. Canola (*Brassica napus*) oil from Australian cultivars shows promising levels of tocopherols and carotenoids, along with good oxidative stability. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 42, p. 179–186, 2015.

DE FRANCISCO, L.; PINTO, D.; ROSSETO, H.; et al. Evaluation of radical scavenging activity, intestinal cell viability and antifungal activity of Brazilian propolis by-product. **Food Research International**, v. 105, p. 537–547, 2018.

GARCIA-SALAS, P.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; et al. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 8813–8826, 2010.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007.

GIADA, M. DE L. R. UMA ABORDAGEM SOBRE A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DE ALIMENTOS VEGETAIS E BEBIDAS. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**, v. 9, n. 1, 2014.

GIOIELLI, L. A. Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, n. 2, p. 211–232, 1996.

GÓMEZ, B.; BARBA, F. J.; DOMÍNGUEZ, R.; et al. Microencapsulation of antioxidant compounds through innovative technologies and its specific application in meat processing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 82, p. 135–147, 2018.

GONZÁLEZ-CENTENO, M. R.; COMAS-SERRA, F.; FEMENIA, A.; ROSSELLÓ, C.; SIMAL, S. Effect of power ultrasound application on aqueous extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity from grape pomace (*Vitis vinifera* L.): Experimental kinetics and modeling. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 506–514, 2015.

GOUJOT, D.; CUVELIER, M.-E.; SOTO, P.; COURTOIS, F. A stoichio-kinetic model for a DPPH·-ferulic acid reaction. **Talanta**, v. 196, p. 284–292, 2019.

GRIMALDI, R.; TOMM, G. O. Ampliando conhecimento em óleos & gorduras desvendando falácias sobre a canola. **Revista Óleos & Gorduras**, v. 3, p. 60-62, 63, nov./dez. 2017., 2018.

GUNSTONE, F. D. **Vegetables Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses**. Wiley–Blackwell. 1ª ed., p. 98-127, 2002.

GUTTERIDGE, J. M. C. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. **Chemico-Biological Interactions**, v. 91, n. 2–3, p. 133–140, 1994.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. 1973. Rapid preparation of fatty acid methyl esters. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 6, p. 475-494, 1973

HEIMBACH, N. S.; ÍTAVO, C. C. B. F.; ÍTAVO, L. C. V.; et al. Resíduo da extração de própolis marrom na dieta de ruminantes: Digestibilidade e produção de gás in vitro. **Archivos de Zootecnia**, v. 63, n. 242, p. 259–267, 2014.

HELENO, S. A.; MARTINS, A.; QUEIROZ, M. J. R. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, v. 173, p. 501–513, 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (São Paulo). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008, p. 1020

IZZREEN, I.; NORIHAM, A. Evaluation of the antioxidant potential of some Malaysian herbal aqueous extracts as compared with synthetic antioxidants and ascorbic acid in cakes. **International Food Research Journal**, v. 18, n. 2, 2011.

JACOB, A.; PAROLIA, A.; PAU, A.; AMALRAJ, F. D. The effects of Malaysian propolis and Brazilian red propolis on connective tissue fibroblasts in the wound healing process. p. 1–10, 2015.

JANSEN-ALVES, C.; FERNANDES, K. F.; CRIZEL-CARDOZO, M. M.; et al. Microencapsulation of Propolis in Protein Matrix Using Spray Drying for Application in Food Systems. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 7, 2018.

JANSEN-ALVES, C.; MAIA, D. S. V.; KRUMREICH, F. D.; et al. Propolis microparticles produced with pea protein: Characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 703–711, 2019.

JONES, A.; PRAVADALI-CEKIC, S.; DENNIS, G. R.; et al. Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) of antioxidants using reaction flow chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v. 967, p. 93–101, 2017.

KOCZOŃ, P.; LIPIŃSKA, E.; CZERNIAWSKA-PIĄTKOWSKA, E.; MIKUŁA, M.; BARTYZEL, B. J. The change of fatty acids composition of Polish biscuits during storage. **Food Chemistry**, v. 202, p. 341–348, 2016.

KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. **Food Chemistry**, v. 84, n. 3, p. 329–339, 2004.

KUNRATH, C. A.; SAVOLDI, D. C.; MILESKI, J. P. F.; et al. Application and evaluation of propolis, the natural antioxidant in Italian-type salami. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 20, 2017.

LABUSCHAGNE, P. Impact of wall material physicochemical characteristics on the stability of encapsulated phytochemicals: A review. **Food Research International**, v. 107, p. 227–247, 2018.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 288–306, 2011.

LI, L.; ZHONG, N.; LIU, G.; et al. Lipid Peroxidation Inhibition Activity of Maillard Reaction Products Derived from Sugar-amino Acid Model Systems. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 9, n. 5, p. 393–397, 2015.

MADHAVI, D. L.; DESHPANDE, S. S.; SALUNKHE, D. K. **Food antioxidants : technological, toxicological, and health perspectives**. Marcel Dekker, 1996.

MAEDA, K. C.; CEREDA, M. P. AVALIAÇÃO DE DUAS METODOLOGIAS DE EXPANSÃO AO FORNO DO POLVILHO AZEDO. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, n. 2, p. 139–143, 2001.

MARTIN, C. A.; DE ALMEIDA, V. V.; RUIZ, M. R.; et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: Importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutricao**, v. 19, n. 6, p. 761–770, 2006.

MERÇON, F. O que é uma gordura trans. **Revista Química Nova na Escola**, v. 32, n. 2 p. 78-83, 2010.

MIŠAN, A.; MIMICA-DUKIĆ, N.; SAKAČ, M.; et al. Antioxidant Activity of Medicinal Plant Extracts in Cookies. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 9, 2011.

MONTENEGRO, F. M.; RODRIGUES GOMES-RUFFI, C.; APARECIDA VICENTE, C.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; STEEL, C. J. Biscoitos de polvilho azedo enriquecidos com fibras solúveis e insolúveis Fermented cassava starch biscuits enriched with soluble and insoluble fibers. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 184-191, 2008.

NANDITHA, B.; PRABHASANKAR, P. Antioxidants in Bakery Products: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, n. 1, p. 1–27, 2008.

NOOSHKAM, M.; VARIDI, M.; BASHASH, M. The Maillard reaction products as food-born antioxidant and antibrowning agents in model and real food systems. **Food Chemistry**, v. 275, p. 644–660, 2019.

NORI, M. P.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; MATIAS DE ALENCAR, S.; et al. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 429–435, 2011.

OLDONI, T. L. C.; OLIVEIRA, S. C.; ANDOLFATTO, S.; et al. Chemical Characterization and Optimization of the Extraction Process of Bioactive Compounds from Propolis Produced by Selected Bees *Apis mellifera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2054–2062, 2015.

ORSAVOVA, J.; MISURCOVA, L.; VAVRA AMBROZOVA, J.; VICHA, R.; MLCEK, J. Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 12871–12890, 2015.

ORŠOLIĆ, N.; KNEŽEVIĆ, A. H.; ŠVER, L.; TERZIĆ, S.; BAŠIĆ, I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 2–3, p. 307–315, 2004.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E. DE; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655–663, 2005.

OSUNA, M. B.; ROMERO, C. A.; ROMERO, A. M.; JUDIS, M. A.; BERTOLA, N. C. Proximal composition, sensorial properties and effect of ascorbic acid and α - tocopherol on oxidative stability of bread made with whole flours and vegetable oils. **LWT**, v. 98, p. 54–61, 2018.

OZKAN, G.; FRANCO, P.; DE MARCO, I.; XIAO, J.; CAPANOGLU, E. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles, advantages, drawbacks and applications. **Food Chemistry**, v. 272, p. 494–506, 2019.

PAPASTERGIADIS, A.; MUBIRU, E.; VAN LANGENHOVE, H.; DE MEULENAER, B. Malondialdehyde measurement in oxidized foods: Evaluation of the spectrophotometric thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) Test in various foods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 38, p. 9589–9594, 2012.

PATRIGNANI, M.; CONFORTI, P. A.; LUPANO, C. E. The role of lipid oxidation on biscuit texture during storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 8, p. 1925–1931, 2014.

PEREIRA, D.; PINHEIRO, R. S.; HELDT, L. F. S.; et al. Rosemary as natural antioxidant to prevent oxidation in chicken burgers. **Food Science and Technology**, v. 37, n. suppl 1, p. 17–23, 2017.

PEREIRA, G. A.; ARRUDA, H. S.; DE MORAIS, D. R.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. M. Carbohydrates, volatile and phenolic compounds composition, and antioxidant activity of calabura (*Muntingia calabura* L.) fruit. **Food Research International**, v. 108, p. 264–273, 2018.

PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G. P. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 01, n. 01, 2012.

POBIEGA, K.; KRAŚNIEWSKA, K.; GNIEWOSZ, M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 83, p. 53–62, 2019.

PORTO, B. L. S.; MENDES, T. DE O.; FRANCO, D. F.; et al. Chemical monitoring of canola, corn, olive, soybean and sunflower oils after thermal treatments at conventional temperatures in domestic stoves. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, p. 1/11-11/11, 2016.

RAJABI, H.; GHORBANI, M.; JAFARI, S. M.; SADEGHI MAHOONAK, A.; RAJABZADEH, G. Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 327–337, 2015.

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

RAMALHO, H. F. ;; SUAREZ, P. A. Z. A Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino The Chemistry of Oils and Fats and their Extraction and Refining Processes. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 2–15, 2013.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

REIS, A. S. DOS; DIEDRICH, C.; MOURA, C. DE; et al. 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**, v. 76, p. 306–313, 2017.

RIBEIRO, K. M. Efeito da composição nas isotermas de sorção e características do biscoito de polvilho. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Lavras, 2006.

ROCHA, G. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 1, p. 37–42, 2012.

RODRIGUES, J. P. DE M.; CALIARI, M.; ASQUIERI, E. R. Caracterização e análise sensorial de biscoitos de polvilho elaborados com diferentes níveis de farelo de mandioca. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12, p. 2196–2202, 2011.

ROSSETO, H. C.; TOLEDO, L. DE A. S. DE; FRANCISCO, L. M. B. DE; et al. Nanostructured lipid systems modified with waste material of propolis for wound healing: Design, in vitro and in vivo evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 158, p. 441–452, 2017.

RUFINO, M. DO S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. DE; et al. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método da redução de ferro (FRAP). **Comunicado Técnico Embrapa**, v. 125, p. 3–6, 2006.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Fortaleza: **Comunicado Técnico Embrapa**, 2007.

SANTOS, V. J.; BIONDO, P. B. F.; VISENTAINER, J. V. Avaliação dos componentes lipídicos e antioxidantes do óleo de canola extraído à frio sob difentes condições. **Brazilian Applied Science Review**, v. 4, n. 3, p. 942–955, 2020.

SASAKI, Y. F.; KAWAGUCHI, S.; KAMAYA, A.; et al. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 519, n. 1–2, p. 103–119, 2002.

SCHOUBBEN, A.; BLASI, P.; GIOVAGNOLI, S.; ROSSI, C.; RICCI, M. Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, n. 1, p. 363–369, 2010.

SEPAROVIC, L.; AUED-PIMENTEL, S. Biscoitos de polvilho do comércio do estado de São Paulo, Brasil: composição da gordura com destaque para os ácidos graxos trans. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 4, n. 2, p. 70–78, 2016.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 9, p. 930–940, 2010a.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 11, p. 4067, 2010b. Royal Society of Chemistry.

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

DA SILVA, F. C.; DA FONSECA, C. R.; DE ALENCAR, S. M.; et al. 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 and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 1, p. 28–36, 2013.

SILVA, V. M.; VIEIRA, G. S.; HUBINGER, M. D. Influence of different combinations of wall materials and homogenisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying. **Food Research International**, v. 61, p. 132–143, 2014.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

DE SOUZA, B. A.; PIAS, K. K. S.; BRAZ, N. G.; BEZERRA, A. S. ADITIVOS ALIMENTARES: ASPECTOS TECNOLÓGICOS E IMPACTOS NA SAÚDE HUMANA. **Revista Contexto & Saúde**, v. 19, n. 36, p. 5–13, 2019.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 18, p. 3268–3295, 2007.

TIVERON, A. P.; ROSALEN, P. L.; FRANCHIN, M.; et al. Chemical characterization and antioxidant, antimicrobial, and anti-inflammatory activities of South Brazilian organic propolis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, 2016.

TOLEDO, L. DE A. S. DE; BAVATO, M. I.; ROSSETO, H. C.; et al. Pharmaceutical films made from the waste material from the preparation of propolis extracts: development and characterization. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 51, n. 4, p. 847–859, 2015. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

TSALI, A.; GOULA, A. M. Valorization of grape pomace: Encapsulation and storage stability of its phenolic extract. **Powder Technology**, v. 340, p. 194–207, 2018.

URREA-VICTORIA, V.; SANTOS, J.; TORRES, P. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. Instituto de Biociência da Universidade de São Paulo, p. 1-6, 2018.

VARGAS, F. C.; GÓMEZ, B.; MOUSAVI KHANEGHAH, A.; et al. 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**, v. 121, n. 5, p. 1800447, 2019.

VEIGA, R. S.; DE MENDONÇA, S.; MENDES, P. B.; et al. Artepillin C and phenolic compounds responsible for antimicrobial and antioxidant activity of green propolis and *Baccharis dracunculifolia* DC. **Journal of Applied Microbiology**, v. 122, n. 4, p. 911–920, 2017.

VISCIDI, K. A.; DOUGHERTY, M. P.; BRIGGS, J.; CAMIRE, M. E. Complex phenolic compounds reduce lipid oxidation in extruded oat cereals. **LWT - Food Science and Technology**, v. 37, n. 7, p. 789–796, 2004.

VISENTAINER, J. V.; FRANCO, M. R. B.; Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação, 1ª ed, Varela: São Paulo, 2006

VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 274–279, 2012.

VYNCKE, W. Direct Determination of the Thiobarbituric Acid Value in Trichloroacetic Acid Extracts of Fish as a Measure of Oxidative Rancidity. **Fette, Seifen, Anstrichmittel**, v. 72, n. 12, p. 1084–1087, 1970.

WEIHRAUCH, J. L.; POSATI, L. P.; ANDERSON, B. A.; EXLER, J. Lipid conversion factors for calculating fatty acid contents of foods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 54, n. 1, p. 36–40, 1977.

WILLIAMS, G. .; IATROPOULOS, M. .; WHYSNER, J. Safety Assessment of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene as Antioxidant Food Additives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9–10, p. 1027–1038, 1999.

YANG, L.; YAN, Q.-H.; MA, J.-Y.; et al. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Phenolic Compounds in Propolis. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 5, p. 771–776, 2013.

YE, Q.; GEORGES, N.; SELOMULYA, C. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 167–179, 2018.

ZHENG, Y.-Z.; DENG, G.; LIANG, Q.; et al. Antioxidant Activity of Quercetin and Its Glucosides from Propolis: A Theoretical Study. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7543, 2017. /2019.

9 APÊNDICES

APÊNDICE A - Dados referente as curvas de calibração e equações de reta para cálculo do MDA.

Dados referente as curvas de calibração e equações de reta para cálculo do MDA.

Tempo de Análise (dias)	Eq de reta	Coefficiente de Correlação (R ²)	Equação de cálculo MDA
0	$y = 97,528x + 0,0064$	0,9932	$x = (y - 0,0064) / 97,528$
15	$y = 91,831x + 0,0088$	0,9997	$x = (y - 0,0088) / 91,831$
30	$y = 86,491x + 0,0165$	0,9957	$x = (y - 0,0165) / 86,491$
45	$y = 86,347x + 0,0055$	0,9999	$x = (y - 0,0055) / 86,347$

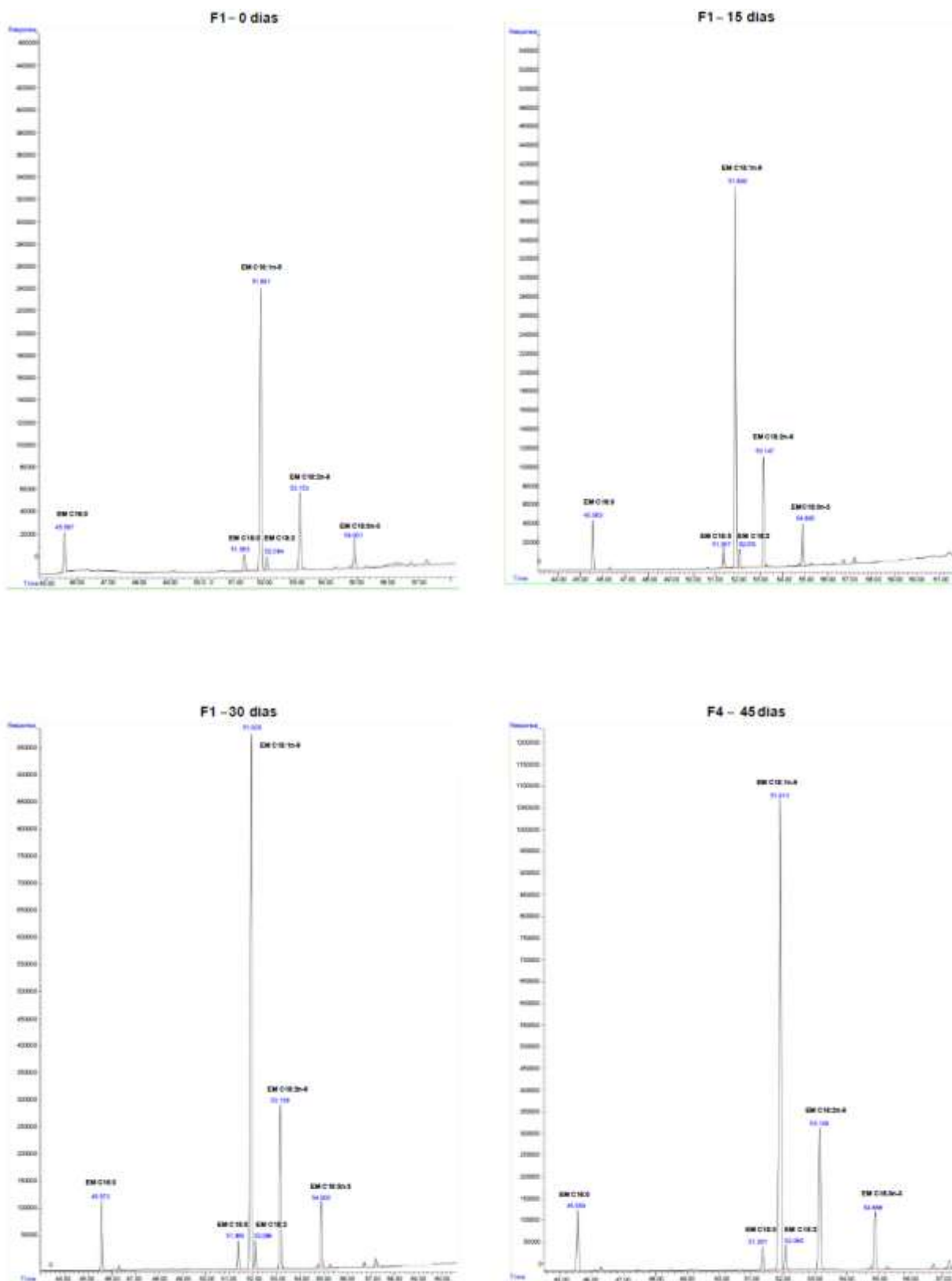
Fonte: Autoria própria (2021).

Y: absorbância

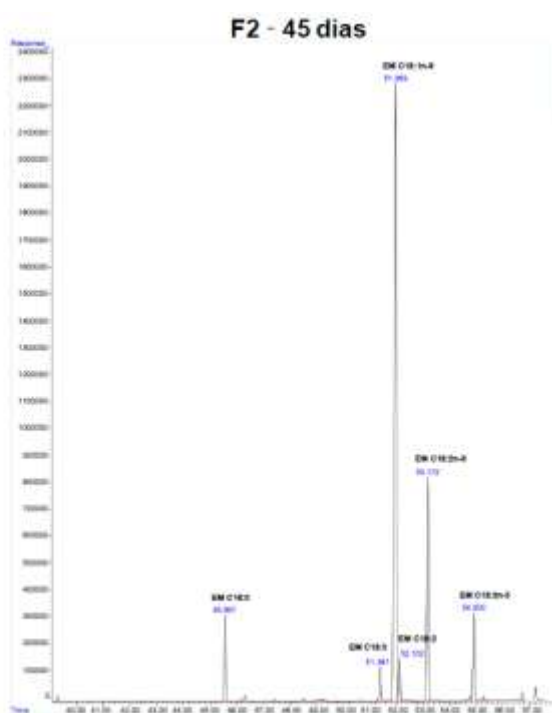
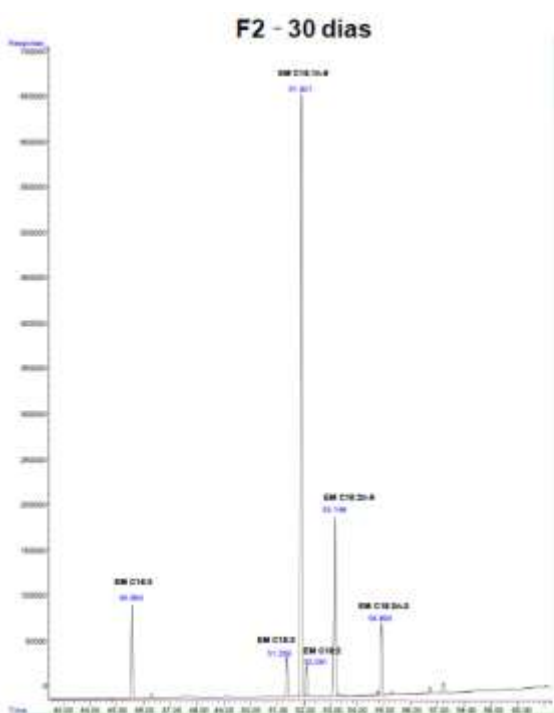
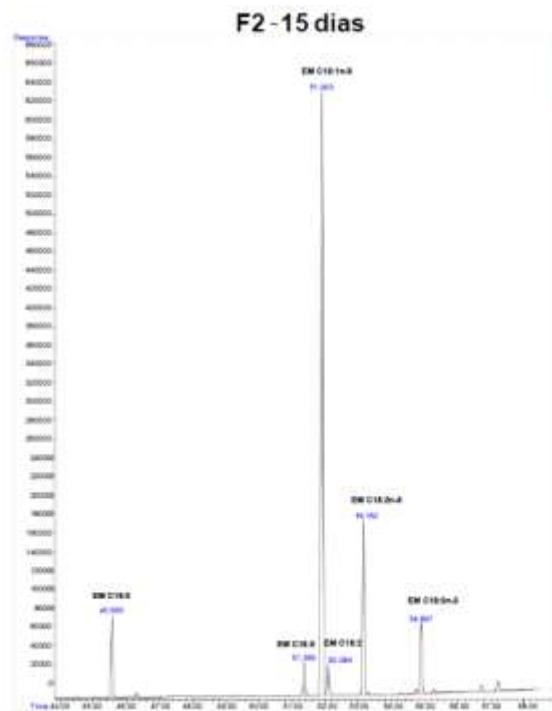
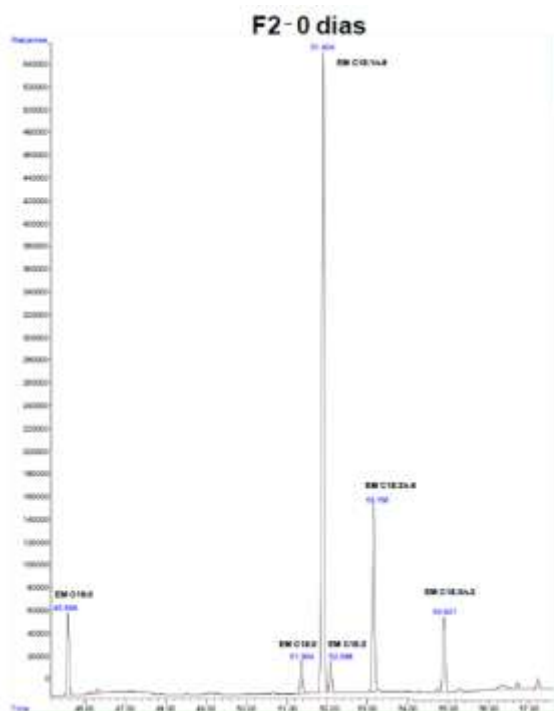
X: mg de TMP

Apêndice B – Cromatogramas GC-FID – F1, F2, F3 e F4

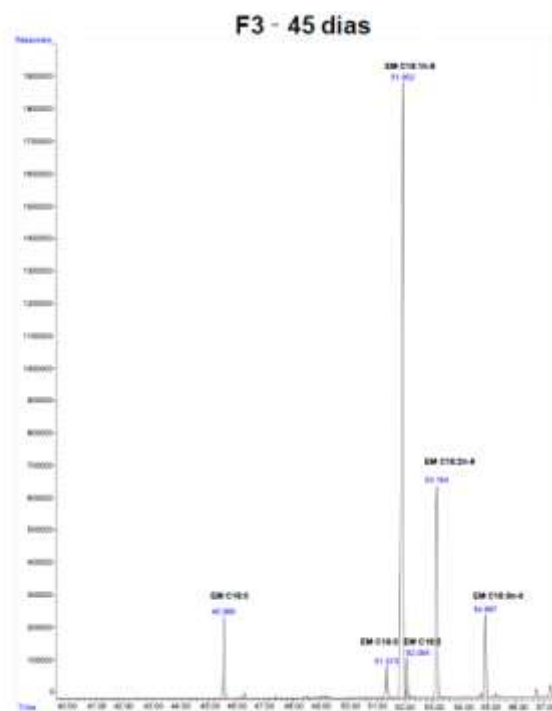
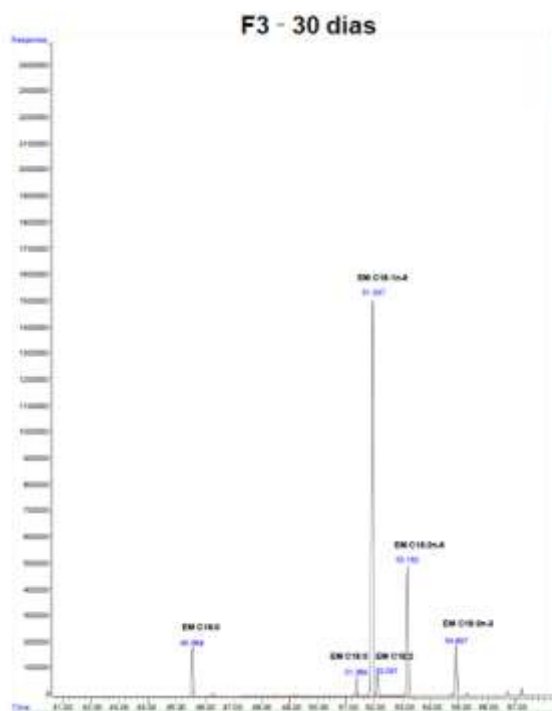
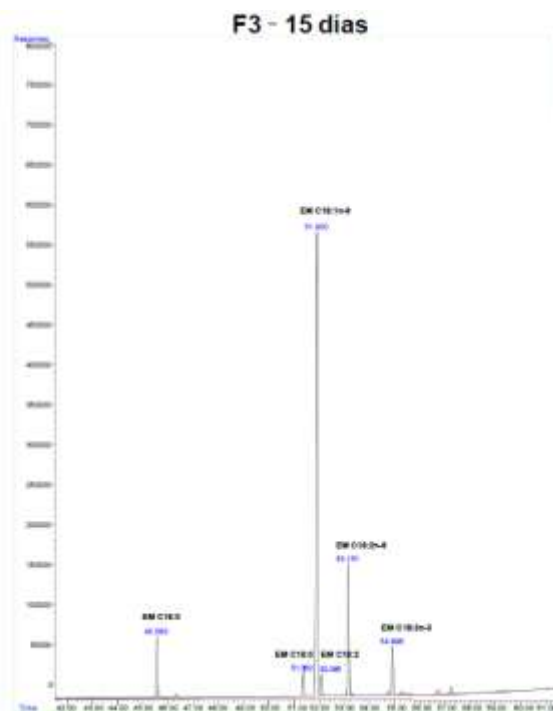
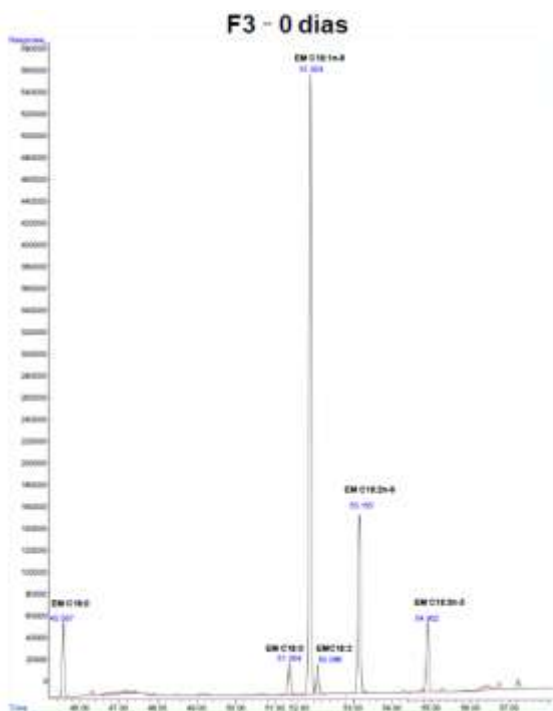
F1 – Isento de Antioxidante



F2 – BHT



F3 – MECP



F4 – LFCP

