



Carolina Francisco Dias

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Determinação da eficácia de Conservantes e
Antioxidantes de origem natural em Molhos
Emulsionados e Não Emulsionados**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Química e Bioquímica

Orientadora: Mestre Ana Tasso de Figueiredo Mendes Rosa
Gestora de Projetos IDI, Mendes Gonçalves S.A

Co-orientador: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio
Professor Auxiliar, FCT NOVA

Júri:

Presidente: Professora Doutora Isabel Maria Rôla Coelho
Professora Associada
Departamento de Química, FCT NOVA

Arguente: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte
Professora Auxiliar
Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa, FCT NOVA

Vogal: Mestre Ana Tasso de Figueiredo Mendes Rosa
Gestora de Projetos IDI
IDI, Mendes Gonçalves S.A



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Abril 2021

Carolina Francisco Dias

Licenciada em Ciências da Engenharia Química e Bioquímica

**Determinação da eficácia de Conservantes e
Antioxidantes de origem natural em Molhos
Emulsionados e Não Emulsionados**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia

Química e Bioquímica

Orientadora: Mestre Ana Tasso de Figueiredo Mendes Rosa
Gestora de Projetos IDI, Mendes Gonçalves S.A

Co-orientador: Professor Doutor Mário Fernando José Eusébio
Professor Auxiliar, FCT NOVA

Júri:

Presidente: Professora Doutora Isabel Maria Rôla Coelho

Professora Associada

Departamento de Química, FCT NOVA

Arguente: Professora Doutora Maria Paula Amaro de Castilho Duarte

Professora Auxiliar

Departamento de Ciências e Tecnologia da Biomassa, FCT NOVA

Vogal: Mestre Ana Tasso de Figueiredo Mendes Rosa

Gestora de Projetos IDI

IDI, Mendes Gonçalves S.A

Abril 2021

Determinação da eficácia de Conservantes e Antioxidantes de origem natural em Molhos Emulsionados e Não Emulsionados

Copyright © Carolina Francisco Dias, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Chega ao fim a etapa mais desafiante do meu percurso acadêmico. Foram 5 anos repletos de desafios, alegrias, tristezas, dúvidas e inseguranças, mas acima de tudo 5 anos de construção pessoal. Não podia deixar de agradecer a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para esta caminhada.

Em primeiro lugar, quero agradecer à Mendes Gonçalves S.A pela oportunidade que me proporcionou na realização da tese em âmbito industrial, e pelo investimento feito para o desenvolvimento do trabalho com sucesso. À equipa do IDI, pela forma carinhosa e amigável como me acolheram. Uma palavra especial à minha orientadora, Ana Tasso, por todo o tempo dispensado e ensinamentos partilhados, e pelas palavras de motivação nos momentos mais difíceis. Não podia deixar de agradecer à Andreia, pela ajuda, paciência e por tudo aquilo que me ensinou. À Cristiana e à Beatriz, por todos os conhecimentos transmitidos, mas principalmente, pelo esforço que fizeram para que eu conseguisse ter tudo o que precisava, nesta altura de pandemia. A vocês, o meu sincero obrigada!

Em segundo lugar, gostaria de agradecer ao Professor Mário Eusébio pelas ideias, pelo acompanhamento e por todo o esforço prestado. Foram ferramentas que possibilitaram a realização de um trabalho mais completo, apesar das adversidades enfrentadas pelo caminho.

Quero agradecer também às minhas amigas “da terra”, e a todos aqueles mais próximos com quem tive a sorte de partilhar o meu percurso acadêmico, por todo o apoio que me deram, por estarem sempre lá e pelas palavras de motivação e força. Um agradecimento especial ao João, Diogo e Nélia, que nesta última fase foram incansáveis comigo, sempre com uma palavra de apoio, uma gargalhada, bons momentos de desabafo e descontração.

Por fim, um especial agradecimento às melhores pessoas que tenho nesta vida, os meus pais. Obrigada pelo amor e apoio incondicional, por me permitirem esta e outras oportunidades, pela confiança depositada em mim e nas minhas capacidades, e por nunca me deixarem falhar ou desistir de algo. Obrigada por serem a base do meu ser. Só é possível graças a vocês.

A todos, o meu obrigada!

Resumo

O consumidor tem-se tornado cada vez mais exigente face às suas escolhas alimentares, procurando cada vez mais produtos naturais, com apresentação de rótulos “limpos” (*clean label*), ou seja, sem presença de aditivos sintéticos e sem que seja comprometida a qualidade e a segurança alimentar dos produtos. Assim, indústrias alimentares como a Mendes Gonçalves S.A, procuram corresponder a estas exigências com o desenvolvimento de produtos mais naturais, nutricionalmente apelativos e economicamente acessíveis para o consumidor. Desta forma, o principal objetivo desta dissertação é o estudo da eficácia de conservantes e antioxidantes naturais em molhos emulsionados e não emulsionados.

Foram produzidas Maioneses 65% gordura com diferentes combinações de conservante e antioxidante, e Ketchup e Molho 0% com diferentes conservantes. As amostras foram acompanhadas ao longo do tempo, sendo que algumas foram colocadas em câmara climática para simular os resultados ao fim de 9 meses. Foram avaliados parâmetros físico químicos, sensoriais e microbiológicos. No caso das maioneses, para o estudo da eficácia dos antioxidantes, recorreu-se à análise do índice de peróxidos e índice de p-anisidina, e ainda uma análise aos compostos de oxidação secundários por HS SPME GC/MS.

Das análises realizadas, ao nível dos parâmetros físico químicos, verificou-se uma influência significativa no pH das combinações com o conservante vinagre em pó tamponado, onde todas as amostras apresentaram pH superior ao limite médio aceitável de uma maionese ($3.0 < \text{pH} < 4.2$). Quanto ao estudo da eficácia dos antioxidantes, concluiu-se que a mistura de extrato alecrim + extrato de espinafre é um potencial substituto do EDTA de cálcio dissódico. Na análise aos compostos de oxidação secundários, foram identificados 32 compostos, sendo os aldeídos a classe predominante. Por apresentarem perfis aromáticos idênticos, não foi possível eleger o melhor antioxidante entre o EDTA e a mistura de extrato de alecrim + extrato de espinafre. Relativamente ao acompanhamento sensorial, as alterações organolépticas estão de acordo com o estado oxidativo das maioneses. No que diz respeito aos conservantes de origem natural, foi a mistura com extrato de laranja e ácido láctico que apresentou alterações sensoriais nos Molhos não emulsionados (Ketchup e Molho 0%). Ao nível microbiológico, as Maioneses e Molho 0% suplementados com vinagre em pó tamponado apresentaram crescimento de microrganismos ao fim de 3 meses em prateleira. Não foi possível apurar qual o conservante natural com melhor eficácia, visto que ambas as referências testadas promoveram modificações nas matrizes.

Palavras-Chave: Antioxidantes Naturais; Conservantes Naturais; Eficácia; Molhos emulsionados; Molhos não emulsionados;

Abstract

The consumer has become increasingly demanding in his food choices, looking for more natural products, with the presentation of “clean labels”, that is, without the presence of synthetic additives and without compromising quality and food safety of the products. Thus, food industries such as Mendes Gonçalves S.A, seek to meet these requirements with the development of more natural products, nutritionally appealing and economically accessible for the consumers. Thus, the main goal of this dissertation was the study of the effectiveness of preservatives and natural antioxidants in emulsified and non-emulsified sauces.

It was produced a 65% fat-mayonnaise with different preservatives and antioxidants, and Ketchup and Molho 0% with different preservatives. The samples were monitored over time, some of which were placed in a climatic chamber to simulate the results after 9 months. Chemical, sensory, and microbiological physical parameters were evaluated. In the case of mayonnaise, for the study of the effectiveness of antioxidants, the peroxide value and p-anisidine value were evaluated, as well as an analysis of the secondary oxidation compounds by HS SPME GC/MS.

From the analysis performed, at the level of the physical chemical parameters, there was a significant influence on the pH of the combinations with the buffered powdered vinegar preservative, where all samples showed pH above the maximum acceptable limit ($3.0 < \text{pH} < 4.2$). Regarding the study of the effectiveness of antioxidants, it was concluded that the mixture of rosemary extract and spinach extract is a potential substitute for disodium calcium EDTA. In the analysis of secondary oxidation compounds, 32 compounds were identified, with aldehydes being the predominant class. As they present identical aromatic profiles, it was not possible to choose the best antioxidant between EDTA and the mixture of rosemary extract + spinach extract. Regarding sensory accompaniment, organoleptic changes are in accordance with the oxidative state of mayonnaise. About preservatives of natural origin, it was the mixture with orange extract that sensorial changes in the non-emulsified Sauces (Ketchup and Molho 0%). At the microbiological level, the Mayonnaise and Molho 0% supplemented with buffered vinegar powder showed growth of microorganisms after three months on the shelf. It was not possible to define the natural preservative with the better efficiency, since both tested references promoted changes in the matrices.

Keywords: Natural Antioxidant; Natural Preservative; Effectiveness; Emulsified sauces; Non-emulsified sauces

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Enquadramento e Objetivos | 1 |
| 2. Revisão Bibliográfica | 3 |
| 2.1 Molhos Emulsionados - Maionese | 3 |
| 2.2 Molhos Não Emulsionados – Ketchup | 6 |
| 2.3 Aditivos Alimentares..... | 7 |
| 2.4 Conservantes | 8 |
| 2.4.1 Fatores que influenciam a deterioração microbiana | 8 |
| 2.4.2 Conservantes Sintéticos..... | 13 |
| 2.4.3 Conservantes Naturais | 14 |
| 2.5 Antioxidantes | 16 |
| 2.5.1 Oxidação Lipídica | 16 |
| 2.5.2 Fatores que influenciam a cinética da oxidação lipídica | 18 |
| 2.5.3 Antioxidantes Primários e Secundários..... | 21 |
| 2.5.4 Antioxidantes Sintéticos..... | 21 |
| 2.5.5 Antioxidantes Naturais | 22 |
| 2.5.6 Sinergismo..... | 25 |
| 3. Materiais e Métodos | 27 |
| 3.1 Preparação e armazenamento das matrizes alimentares | 27 |
| 3.2 Análises Físico-Químicas..... | 29 |
| 3.2.1 pH..... | 29 |
| 3.2.2 Acidez..... | 30 |
| 3.2.3 Cloretos | 30 |
| 3.2.4 Viscosidade | 30 |
| 3.2.5 Consistência..... | 31 |
| 3.2.6 °Brix | 31 |
| 3.2.7 Índice de Peróxidos | 31 |
| 3.2.8 Índice de p-Anisidina | 34 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 3.2.9 | Valor total de oxidação (TOTOX) | 34 |
| 3.3 | Análise dos compostos de oxidação secundários | 35 |
| 3.3.1 | Procedimento HS-SPME..... | 35 |
| 3.3.2 | Condições GC/MS..... | 35 |
| 3.4 | Análises microbiológicas | 36 |
| 3.4.1 | Preparação da Suspensão inicial..... | 36 |
| 3.4.2 | Contagem de Microrganismos a 30°C | 36 |
| 3.4.3 | Contagem de Bolores e Leveduras | 36 |
| 3.4.4 | Contagem de Bactérias Ácido Lácticas | 37 |
| 3.4.5 | Contagem de <i>Enterobacteriaceae</i> | 37 |
| 3.5 | Acompanhamento Sensorial..... | 37 |
| 4. | Apresentação e discussão de resultados | 39 |
| 4.1 | Análises Físico-Químicas..... | 39 |
| 4.1.1 | Maionese 65% | 40 |
| 4.1.2 | Ketchup e Molho 0% | 46 |
| 4.2 | Estudo da eficácia dos antioxidantes..... | 49 |
| 4.2.1 | Combinações Maionese 65% sem conservante | 52 |
| 4.2.2 | Combinações Maionese 65% Sorbato de potássio | 55 |
| 4.2.3 | Combinações Maionese 65% VinTamp | 57 |
| 4.2.4 | Combinações Maionese 65% ELAL | 60 |
| 4.3 | Análise dos compostos de oxidação secundários | 63 |
| 4.4 | Acompanhamento Sensorial..... | 72 |
| 4.5 | Análises Microbiológicas | 79 |
| 4.5.1 | Maionese 65% | 79 |
| 4.5.2 | Ketchup e Molho 0% | 83 |
| 5. | Conclusões e Propostas de Trabalho futuro | 87 |
| | Referências Bibliográficas | 91 |
| | Anexos..... | 111 |
| | Anexo I – Análises Físico-Químicas..... | 111 |

| | |
|---|-----|
| Anexo II – Análise dos compostos de oxidação secundários..... | 120 |
| Anexo III – Acompanhamento sensorial..... | 126 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 2.1 - Taxa de crescimento de diversos grupos de microrganismos de acordo com a temperatura..... | 12 |
| Figura 2.2 - Reações do mecanismo de autoxidação lipídica..... | 17 |
| Figura 3.1 - Sequência de processos para extração do óleo. | 32 |
| Figura 3.2 – Registo fotográfico da prova sensorial de maioneses (A), Molho 0% (B) e Ketchup (C). | 38 |
| Figura 3.3 - Escala de classificação usada nas provas sensoriais das Maioneses 65% ao longo do tempo de acompanhamento..... | 38 |
| Figura 4.1 - Valores de pH para combinações de Maionese 65% VinTamp ao longo do tempo de acompanhamento..... | 42 |
| Figura 4.2 - Valores de pH para combinações de Maionese 65% ELAL ao longo do tempo de acompanhamento..... | 43 |
| Figura 4.3 - Valores da viscosidade para combinações de Maionese 65% sem conservante ao longo do tempo de acompanhamento..... | 44 |
| Figura 4.4 - Valores da viscosidade para combinações de Maionese 65% Sorbato ao longo do tempo de acompanhamento..... | 45 |
| Figura 4.5 - Valores de pH para combinações Ketchup ao longo do tempo de acompanhamento | 47 |
| Figura 4.6 - Valores de pH para combinações Molho 0% ao longo do tempo de acompanhamento. | 47 |
| Figura 4.7 - Valores de consistência para combinações Ketchup ao longo do tempo de acompanhamento..... | 48 |
| Figura 4.8 - Valores de consistência para combinações Molho 0% ao longo do tempo de acompanhamento..... | 49 |
| Figura 4.9 - Resultados do ensaio nº1 para validação do método de extração da fase lipídica... 50 | |
| Figura 4.10 - Resultados do ensaio nº2 para validação do método de extração da fase lipídica. 50 | |
| Figura 4.11 - Resultados do ensaio nº3 para validação do método de extração da fase lipídica. 51 | |
| Figura 4.12 - Representação gráfica dos valores de Índice de Peróxidos obtidos para o estudo dos antioxidantes nas Maioneses 65% sem conservante. | 52 |
| Figura 4.13 - Representação gráfica dos valores de Índice de p-Anisidina obtidos para o estudo dos antioxidantes nas Maioneses 65% sem conservante..... | 53 |
| Figura 4.14 - Representação gráficas dos valores de TOTOX obtidos para o estudo dos antioxidantes nas Maioneses 65% sem conservante | 54 |
| Figura 4.15 Representação gráfica dos valores de Índice de Peróxidos obtidos no estudo dos antioxidantes nas Maioneses 65% Sorbato de potássio..... | 55 |

| | |
|--|-----|
| Figura 4.16 - Representação gráfica dos valores de Índice de p-Anisidina no estudo dos antioxidantes nas Maionese 65% Sorbato de potássio..... | 56 |
| Figura 4.17 - Representação gráficas dos valores de TOTOX obtidos para o estudo dos antioxidantes nas Maionese 65% Sorbato de potássio..... | 57 |
| Figura 4.18 - Representação gráfica dos valores de Índice de Peróxidos no estudo dos antioxidantes nas Maionese 65% VinTamp..... | 57 |
| Figura 4.19 - Representação gráfica dos valores de Índice de p-Anisidina no estudo dos antioxidantes nas Maionese 65% VinTamp..... | 58 |
| Figura 4.20 - Representação gráfica dos valores de TOTOX obtidos para o estudo dos antioxidantes nas Maionese 65% VinTamp..... | 60 |
| Figura 4.21 - Representação gráfica dos valores de Índice de Peróxidos no estudo dos antioxidantes nas Maionese 65% ELAL..... | 60 |
| Figura 4.22 - Representação gráfica dos valores de Índice de p-Anisidina no estudo dos antioxidantes nas Maionese 65% ELAL..... | 61 |
| Figura 4.23 - Representação gráfica dos valores de TOTOX obtidos para o estudo dos antioxidantes nas Maionese 65% ELAL..... | 62 |
| Figura 4.24 - Cromatograma da série homóloga dos hidrocarbonetos..... | 68 |
| Figura 4.25 – Perfil cromatográfico da COMB_1 ao fim de 9 meses em prateleira (A) e monitorização dos derivados de furano (B) através da extração do ião (m/z=81,82 e 53). | 71 |
| Figura 4.26 - Retrato fotográfico da amostra padrão no mês de produção (A) e das Maionese 65% VinTamp ao fim de 2 meses em prateleira (B). | 77 |
| Figura I.1 - Valores da acidez para combinações de Maionese 65% Sorbato ao longo do tempo de acompanhamento..... | 111 |
| Figura I.2 - Valores da acidez para combinações de Maionese 65% ELAL ao longo do tempo de acompanhamento..... | 111 |
| Figura I.3 - Valores da acidez para combinações de Maionese 65% VinTamp ao longo do tempo de acompanhamento..... | 112 |
| Figura I.4 - Valores de acidez para combinações de Maionese 65% sem conservante ao longo do tempo de acompanhamento..... | 112 |
| Figura I.5 - Valores de acidez para combinações de Ketchup ao longo do tempo de acompanhamento..... | 113 |
| Figura I.6 - Valores de acidez para combinações Molho 0% ao longo do tempo de acompanhamento..... | 113 |
| Figura I.7 - Valores de cloretos para combinações de Maionese 65% S/conservante ao longo do tempo de acompanhamento..... | 114 |
| Figura I.8 - Valores de cloretos para combinações de Maionese 65% Sorbato ao longo do tempo de acompanhamento..... | 114 |

| | |
|--|-----|
| Figura I.9 - Valores de cloretos para combinações de Maionese 65% VinTamp ao longo do tempo de acompanhamento..... | 115 |
| Figura I.10 - Valores de cloretos para combinações Maionese 65% ELAL ao longo do tempo de acompanhamento..... | 115 |
| Figura I.11 - Valores de cloretos para combinações Ketchup ao longo do tempo de acompanhamento..... | 116 |
| Figura I.12 - Valores de cloretos para combinações Molho 0% ao longo do tempo de acompanhamento..... | 116 |
| Figura I.13 - Valores de pH para combinações de Maionese 65% sem conservante ao longo do tempo de acompanhamento..... | 117 |
| Figura I.14 - Valores de pH para combinações de Maionese 65% Sorbato ao longo do tempo de acompanhamento..... | 117 |
| Figura I.15 - Valores da viscosidade para combinações de Maionese 65% VinTamp ao longo do tempo de acompanhamento..... | 118 |
| Figura I.16 - Valores da viscosidade para combinações de Maionese 65% ELAL ao longo do tempo de acompanhamento..... | 118 |
| Figura I.17 - Valores de °Brix para combinações Ketchup ao longo do tempo de acompanhamento | 119 |
| Figura I.18 - Valores de °Brix para combinações Molho 0% ao longo do tempo de acompanhamento..... | 119 |

Índice de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 2.1 – Quantidade, em percentagem, dos ingredientes básicos utilizados para produção de maionese comercial..... | 4 |
| Tabela 2.2 – Quantidade, em percentagem, dos ingredientes básicos utilizados na produção de Ketchup..... | 6 |
| Tabela 2.3 - Atividade mínima da água para crescimento de microrganismos específicos..... | 9 |
| Tabela 2.4 - Condições ótimas de crescimento (temperatura, pH e atividade da água) de agentes patogénicos..... | 11 |
| Tabela 2.5 - Principais características dos microrganismos tolerantes à acidez..... | 11 |
| Tabela 2.6 - Influência da temperatura (alta e baixa) no crescimento e desenvolvimento de microrganismos..... | 12 |
| Tabela 2.7 - Comparação dos valores standard de composição de ácidos gordos no óleo de girassol e soja..... | 20 |
| Tabela 2.8 - Vantagens e desvantagens da aplicação de antioxidantes naturais..... | 23 |
| Tabela 3.1 - Designação das combinações de conservante com Ketchup e Molho 0%..... | 28 |
| Tabela 3.2 - Designação das combinações de antioxidante/conservante das Maioneses 65%..... | 28 |
| Tabela 3.3 - Teores máximos de conservante e antioxidante permitidos para as matrizes em estudo..... | 29 |
| Tabela 3.4 - Variação do tipo de sonda e velocidade de rotação segundo a viscosidade esperada..... | 30 |
| Tabela 3.5 - Parâmetros manipulados durante os ensaios preliminares da extração da fase lipídica..... | 32 |
| Tabela 3.6 - Massa da toma de ensaio de óleo (g) consoante o valor de peróxidos esperado..... | 33 |
| Tabela 4.1 - Definição dos limites de variação aceitáveis associado a cada parâmetro com base nos valores da amostra padrão..... | 40 |
| Tabela 4.2 - Intervalo de valores de pH para as combinações de Maionese 65% ao longo do tempo..... | 41 |
| Tabela 4.3 - Intervalo de valores de Viscosidade para as combinações de Maionese 65% ao longo do tempo..... | 44 |
| Tabela 4.4 - Intervalo de valores de Acidez , Cloretos e Brix para as combinações de Ketchup e Molho 0% ao longo do tempo..... | 46 |
| Tabela 4.5 - Concentração (%) dos compostos voláteis identificados no início e no fim do acompanhamento para as amostras COMB_1, COMB_2 e COMB_3..... | 65 |
| Tabela 4.6 - Perceção olfativa associada a cada aldeído..... | 67 |
| Tabela 4.7 - Coordenadas (L*, a*, b*) das amostras padrão de Maionese 65%, Ketchup e Molho 0%..... | 72 |

| | |
|--|----|
| Tabela 4.8 - Avaliação organolética das Maionese 65% sem conservante de acordo com a escala de classificação definida..... | 73 |
| Tabela 4.9 - Variação Total de cor (ΔE) das amostras de Maionese 65% sem conservante ao longo do tempo..... | 74 |
| Tabela 4.10 - Avaliação organolética das Maionese 65% Sorbato de potássio de acordo com a escala de classificação definida..... | 74 |
| Tabela 4.11 - Variação total da cor (ΔE) para as amostras Maionese 65% sorbato de potássio ao longo do tempo..... | 75 |
| Tabela 4.12 - Avaliação organolética das Maionese 65% VinTamp de acordo com a escala de classificação definida. | 76 |
| Tabela 4.13 - Variação total da cor (ΔE) para as amostras Maionese 65% VinTamp ao longo do tempo..... | 76 |
| Tabela 4.14 - Avaliação organolética das Maionese 65% ELAL de acordo com a escala de classificação definida. | 77 |
| Tabela 4.15 -Variação total da cor (ΔE) para as amostras Maionese 65% ELAL ao longo do tempo..... | 78 |
| Tabela 4.16 - Variação total da cor (ΔE) para as amostras de Ketchup e Molho 0% ao longo do tempo..... | 78 |
| Tabela 4.17 - Análise microbiológica das combinações de Maionese 65% sem conservante no mês de produção, no terceiro e nono mês de prateleira..... | 80 |
| Tabela 4.18 - Análise microbiológica das combinações de Maionese 65% Sorbato de Potássio no mês de produção, no terceiro e nono mês de prateleira..... | 80 |
| Tabela 4.19 – Resultados dos valores de Microrganismos a 30°C das Maionese 65% VinTamp ao longo do tempo..... | 81 |
| Tabela 4.20 - Análise microbiológica das combinações de Maionese 65% VinTamp no mês de produção, no primeiro, terceiro e nono mês de prateleira para os restantes microrganismos. | 82 |
| Tabela 4.21 - Resultados dos valores de Microrganismos a 30°C das Maionese 65% ELAL ao longo do tempo..... | 83 |
| Tabela 4.22 - Análise microbiológica das combinações de Maionese 65% ELAL no mês de produção, no terceiro e nono mês de prateleira para os restantes microrganismos..... | 83 |
| Tabela 4.23 - Análise microbiológica das combinações Ketchup no mês de produção, no terceiro e nono mês de prateleira..... | 84 |
| Tabela 4.24 - Resultados dos valores de Microrganismos a 30°C para o Molho 0% ao longo do tempo..... | 84 |
| Tabela 4.25 - Análise microbiológica das combinações Molho 0% no mês de produção, no terceiro e nono mês de prateleira para os restantes microrganismos..... | 84 |

| | |
|---|------|
| Tabela II.1 - Monitorização dos compostos de oxidação secundários identificados, tempo de retenção e índices de retenção linear para a COMB_3 ao fim de 2 meses em prateleira..... | 120 |
| Tabela II.2 - Monitorização dos compostos de oxidação secundários identificados, tempo de retenção e índices de retenção linear para a COMB_3 ao fim de 3 meses em câmara climática. | 121 |
| Tabela II.3 - Monitorização dos compostos de oxidação secundários identificados, tempo de retenção e índices de retenção linear para a COMB_1 ao fim de 2 meses em prateleira..... | 122 |
| Tabela II.4 - Monitorização dos compostos de oxidação secundários identificados, tempo de retenção e índices de retenção linear para a COMB_1 ao fim de 3 meses em câmara climática. | 123 |
| Tabela II.5 - Monitorização dos compostos de oxidação secundários identificados, tempo de retenção e índices de retenção linear para a COMB_2 ao fim de 2 meses em prateleira..... | 124 |
| Tabela II.6 - Monitorização dos compostos de oxidação secundários identificados, tempo de retenção e índices de retenção linear para a COMB_2 ao fim de 3 meses em câmara climática. | 125 |
| Tabela III.1 - Valores das coordenadas CIELab (L^*,a^*,b^*) para as amostras de Maionese 65% s/conservante ao longo do tempo de acompanhamento. | 1286 |
| Tabela III.2 - Valores das coordenadas CIELab (L^*,a^*,b^*) para as amostras de Maionese 65% Sorbato de potássio ao longo do tempo de acompanhamento..... | 1286 |
| Tabela III.3 - Valores das coordenadas CIELab (L^*,a^*,b^*) para as amostras de Maionese 65% VinTamp ao longo do tempo de acompanhamento..... | 1287 |
| Tabela III.4 - Valores das coordenadas CIELab (L^*,a^*,b^*) para as amostras de Maionese 65% ELAL ao longo do tempo de acompanhamento..... | 1287 |
| Tabela III.5 - Valores das coordenadas CIELab (L^*,a^*,b^*) para as amostras de Ketchup ao longo do tempo de acompanhamento..... | 128 |
| Tabela III.6 - Valores das coordenadas CIELab (L^*,a^*,b^*) para as amostras de Molho 0% ao longo do tempo de acompanhamento..... | 128 |

Lista de Abreviaturas, siglas e acrónimos

| | |
|----------------------------|--|
| a* | Tonalidade (eixo vermelho-verde) pelo sistema CIELab |
| a_w | Atividade da água |
| b* | Cromaticidade (eixo amarelo-azul) pelo sistema CIELab |
| BAL | Bactérias Ácido Lácticas |
| BHA | Butil-hidroxianisol |
| BHT | Butil-hidroxitolueno |
| DB-Wax | Coluna capilar polar de polietilenoglicol |
| DVB/Carb/PDMS | Revestimento de Divinilbenzeno/Carboxeno/Polidimetilsiloxano |
| EDTA | Etilenodiaminatetracetato de cálcio dissódico (EDTA de cálcio dissódico) |
| eV | Eletrão volt |
| GC | Cromatografia gás-líquido |
| GC/MS | Cromatografia gás-líquido acoplado a Espectrometria de massa |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| HS-SPME | Microextração em fase sólida |
| IP | Índice de peróxidos |
| IpA | Índice de p-anisidina |
| L* | Luminosidade pelo sistema CIELab |
| LRI | <i>Linear Retention time</i> – Índice de Retenção Linear |
| M.O. 30°C | Microrganismos a 30°C |
| meqO₂/kg | Miliequivalentes de oxigénios por quilograma de óleo |
| MG | Mendes Gonçalves S.A |
| m/z | Razão massa/carga |
| NIST | <i>National Institute of Standards and Technology</i> |
| PG | Propilo galato |
| rpm | Rotações por minuto |
| TBHQ | Terc-butil-hidroquinona |
| TOTOX | Valor total de oxidação |
| UFC/g | Unidades Formadoras de Colónias por grama de amostra |
| ΔE | Variação Total da cor |

1. Enquadramento e Objetivos

No setor alimentar, um dos aspetos fundamentais a assegurar é a qualidade do produto. Sabe-se que os alimentos podem ser contaminados por uma vasta gama de microrganismos que promovem a sua deterioração, área com grande impacto para a indústria alimentar. Além da contaminação microbiana, muitos alimentos que na sua constituição apresentem óleo/gordura tendem a sofrer oxidação lipídica. Este processo dá lugar ao aparecimento de odores e sabores característicos do ranço, o que representa tanto para a indústria como para o consumidor, uma forte causa de depreciação e rejeição do produto.

Com intuito de diminuir ou impedir os mecanismos de deterioração, surgiu a necessidade de adicionar aditivos aos alimentos, substâncias estas que não alteram as características organolépticas, mas permitem uma maior longevidade e qualidade do produto. Na legislação europeia encontram-se descritos todos os tipos de conservantes e antioxidantes passíveis de serem aplicados no alimentos e respetivas concentrações. Porém, a maioria destes conservantes e antioxidantes são de origem sintética, o que atualmente se torna um problema, tendo em conta a crescente preocupação do consumidor na aquisição de produtos alimentares o mais naturais possível, que garantam a mesma qualidade e que sejam economicamente acessíveis.

Neste âmbito, a Mendes Gonçalves S.A, uma empresa vanguardista e sempre atenta às exigências do mercado, tem como objetivo procurar corresponder aos desafios impostos pelos tempos atuais, que apontam para a comercialização de produtos *clean label*, isto é, produtos que no seu rótulo não apresentem quaisquer componentes com designação “número E”. Esta designação permite identificar os aditivos por classes, como por exemplo os conservantes (E-200 a E-299). Assim sendo, os objetivos desta dissertação rematam para:

- Estudo das alternativas de conservante e antioxidante de origem natural e do respetivo comportamento nas matrizes alimentares a analisar – Maionese 65% de gordura, Molho 0% e Ketchup;
- Determinação da eficácia de conservantes naturais através de um *Challenge test* e acompanhamento microbiológico;
- Determinação da eficácia de antioxidantes naturais através do acompanhamento do tempo de vida útil do produto pelo estudo de parâmetros físico-químicos e sensoriais.

A Mendes Gonçalves, S.A.

A Mendes Gonçalves, S.A, empresa do ramo alimentar fundada em 1982 e sediada na Golegã, tem como principal atividade a produção de vinagres, molhos e temperos. Caraterizada por ser uma empresa de cariz familiar e que honra as culturas locais, iniciou o seu percurso com a produção inovadora de vinagre de figo.

Convicta de que a evolução se rege pela inovação, diferenciação e qualidade do produto, a Mendes Gonçalves expandiu o seu negócio para os vinagres de vinho e sidra, ganhando forte posição e reconhecimento em Portugal no mercado dos vinagres, sector onde é líder, apresentando marcas como *Peninsular* e *Creative*. Devido à forte concorrência, a MG sentiu a necessidade de se expandir em termos de áreas de negócio de modo a tornar-se mais competitiva, e por isso em 2002 inseriu-se no mercado dos molhos e temperos. Em 2013, expandiu o seu volume de vendas com a aposta na renovação da sua marca própria, Paladin. É com base no lema “Se é impossível, é para nós” que a Mendes Gonçalves operacionaliza a cultura vivida na organização, através do lançamento frequente de novos produtos, no investimento em I&D, no posicionamento das suas marcas e na forma como a empresa comunica com os seus clientes.

Atualmente, a empresa é reconhecida como fornecedora certificada e umas das mais procuradas pelas principais marcas de distribuição nacional, empregando mais de 200 trabalhadores. Encontra-se destacada em 28 países e continua a apostar na presença em feiras alimentares internacionais “*por forma a fazer chegar o Gosto Português às 5 partes do mundo*”^[1]. Uma empresa com destaque internacional, porém 100% portuguesa, tendo sido a primeira marca certificada com o selo “Portugal Sou Eu” por incorporar 88% de matérias-primas nacionais. Detém diversas certificações no setor qualidade ISO 9001, no campo dos vinagres com a ISO 22000, duas importantes certificações - Kosher para a comunidade judaica e HALAL pela comunidade islâmica de Lisboa – e o Certificado de Conformidade com a NP 4457 pela IPAC^{[1], [2]}.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Molhos Emulsionados - Maionese

A maionese é uma emulsão óleo-em-água (O/A) contendo, tradicionalmente, entre 60-80% de gordura, que resulta da incorporação lenta de óleo numa pré-mistura de gema de ovo, vinagre e outros ingrediente solúveis em água (sal, açúcar, amidos)^[3]. Define-se por emulsão óleo-em-água (O/A), um sistema no qual as gotículas de óleo se encontram dispersas numa fase aquosa, formando uma mistura estável ^[4, 5].

A estabilidade física deste produto alimentar está dependente de vários fatores, como a quantidade de óleo e de gema de ovo, a viscosidade, o método de mistura, a qualidade e quantidade da água e a temperatura ^[6, 7]. Assim, para impedir a destabilização da emulsão e consequente separação de fases deve evitar-se congelar, aquecer e agitar excessivamente a maionese ^[3, 8].

As emulsões são termodinamicamente instáveis, o que leva a uma rápida separação entre as camadas óleo e água, ação que ocorre devido à diferença de densidades entre as fases aquosa e oleosa e ao contacto desfavorável entre as moléculas de óleo e água. Os principais processos de instabilidade são a floculação, coalescência, cremosidade (sedimentação), rutura de Ostwald e inversão de fases, processos estes que, podem ou não, acontecer de forma simultânea ou sequencial ^[4, 9-12].

Para manter a estabilidade da emulsão ao longo do tempo, ingredientes anfifílicos – agentes emulsionantes – como proteínas, ácidos gordos e fosfolípidos são adicionados ao sistema ^[10]. Na maionese é aplicado como agente emulsionante a gema do ovo tendo em conta a sua constituição – fosfolípidos, lipoproteínas e proteína. No entanto, a estabilidade das proteínas depende fortemente do pH e da força iónica do meio. Caso não se verifiquem condições favoráveis, as proteínas tendem a desnaturar, o que provoca a diminuição das forças de repulsão entre gotículas ^[9, 10].

Os estabilizantes são os principais responsáveis por conferir a estabilidade da maionese, uma vez que promovem o aumento da viscosidade da fase contínua retardando o movimento das gotículas e reduzindo a taxa de formação de cremosidade ^[9].

Uma maionese comercial tem de garantir, durante todo o prazo de validade, a integridade das suas propriedades organoléticas e físico-químicas. Assim, surge a necessidade de utilizar aditivos que mantenham a estabilidade da emulsão, impeçam o crescimento de microrganismos, mantenham a cor, o sabor e o pH, e que se encontrem autorizados pelo Regulamento (CE) nº1333/2008 relativo aos aditivos alimentares^[36].

A **Tabela 2.1** apresenta os ingredientes básicos necessários para a produção de uma maionese comercial típica.

Tabela 2.1 – Quantidade, em percentagem, dos ingredientes básicos utilizados para produção de maionese comercial. Adaptado de ^[13, 27].

| Ingredientes | Percentagem (%) |
|---------------------|------------------------|
| Óleo vegetal | 65 – 80 |
| Gema de ovo | 7,0 – 9,0 |
| Água | Perfazer os 100% |
| Vinagre | 9,4 – 10,8 |
| Açúcar | 1,0 – 2,5 |
| Sal | 1,2 – 1,8 |
| Farinha de mostarda | 0,2 – 0,8 |

Óleo

O óleo vegetal é, geralmente, o ingrediente que existe em maior quantidade na maionese, afetando positivamente a reologia e as características sensoriais do produto, e contribuindo para o sabor, textura, cremosidade, palato, aparência e prazo de validade ^[5]. Contrariamente aos Estados Unidos da América, em que a *Food and Drug Administration* (FDA) estabeleceu um mínimo de 65% de óleo para maioneses, na União Europeia não existe nenhuma restrição relativamente à quantidade de óleo vegetal a aplicar ^[8, 14–18].

Apesar de existirem vários tipos de óleos, deve ter-se em conta a sua composição relativamente aos ácidos gordos. Associado a questões de saúde, é aconselhado a ingestão de ácidos gordos insaturados – ómeegas-3,6 e 9 – em vez dos habituais ácidos gordos saturados. Porém, as ligações insaturadas dos ácidos gordos são mais propícias ao processo de oxidação lipídica e consequente rancificação. Assim sendo, devem ser escolhidos óleos com maior concentração de ácidos gordos mono- ou di-insaturados e baixa concentração de ácidos gordos saturados ^[19–22].

Além da sua composição ao nível dos ácidos gordos, os óleos vegetais também contêm componentes minoritários como tocoferóis, carotenóides e compostos fenólicos, que funcionam como antioxidantes naturais no retardar da oxidação lipídica ^[23, 24].

Gema do Ovo

Na maionese, a gema de ovo é usada como um agente emulsionante natural. Para além da sua função como emulsionante, a gema de ovo também contribui para o sabor e cor da maionese, conferindo-lhe uma tonalidade amarelada. As propriedades que permitem à gema do ovo a formação de uma emulsão devem-se principalmente à sua estrutura - lecitina fosfolipídica, proteínas e lipoproteínas (lipovitelina, lipovitelinina e livetina)^[3, 25, 26].

Além da lecitina, o pH da emulsão tem um efeito essencial sobre a estabilidade da emulsão. A viscoelasticidade e estabilidade da maionese devem atingir o seu ponto mais alto quando o pH está próximo do ponto isoelétrico médio das proteínas da gema de ovo ^[3, 27]. A concentração da gema de ovo pode causar efeito tanto na distribuição do tamanho das partículas como no comportamento viscoelástico da maionese. Bengoechea *et al* (2009) descobriram que aumentar a quantidade de gema de ovo líquida de 2% para 5% em peso levou a uma diminuição no tamanho das gotículas e consequente aumento da viscosidade. Concluíram que, um número maior de gotículas leva a mais interações e, portanto, propriedades viscoelásticas mais pronunciadas ^[28].

Vinagre

O vinagre, solução de 5 a 10% de ácido acético em água, é a fonte mais comum de ácido utilizada no fabrico de maionese. O vinagre apresenta propriedades antibacterianas, sendo por isso utilizado como conservante em vários produtos, ajudando na prevenção contra a contaminação microbiológica. Este ingrediente, presente na fase aquosa, confere um sabor amargo à maionese. Para além disso, o vinagre previne a rancificação do óleo e melhora a estabilidade da emulsão. A adição de ácidos diminui o pH da emulsão, afetando a sua estrutura. Quando o pH está próximo do ponto isoelétrico das proteínas da gema de ovo, a carga nas proteínas é minimizada, permitindo uma proximidade entre gotículas à superfície ^[3, 10, 13, 29].

Sal

O sal, além de intensificar o sabor da maionese, e atuar como conservante, também melhora as suas características. Primeiramente, o sal ajuda a dispersar os grânulos de gema de ovo, aumentando a superfície-ativa disponível. Em segundo lugar, ajuda a neutralizar quaisquer cargas sobre as proteínas, permitindo, assim, que a lipovitelina absorva a água e que fortaleça a camada na superfície das gotículas de óleo. Desta forma, o sal pode compensar até certo ponto valores de pH diferentes do ponto isoelétrico. Não obstante, o excesso de sal pode fazer com que as proteínas da gema de ovo se agreguem na fase aquosa da emulsão em vez de formarem um revestimento em volta das gotículas de óleo^[3, 13].

Açúcar

O açúcar, introduzido na fase aquosa da maionese, tem como objetivo suavizar o sabor e diminuir a acidez proveniente do vinagre. De acordo com Kiosseoglou & Sherman (1983), o açúcar tende a enfraquecer as interações, protegendo os grupos reativos. Considera-se que o açúcar é um ingrediente que pouco influencia a estabilidade da emulsão, dando maior contributo para propriedades sensoriais, como o sabor [3, 13, 27].

Farinha de mostarda

A farinha de mostarda ou mostarda em pó é utilizada na maionese pelas suas propriedades organolépticas, nomeadamente sabor e cor. Além disso, este ingrediente apresenta propriedades emulsionantes e antimicrobianas, tornando-se um fator vantajoso para a longevidade do produto na prateleira. Embora a adição de níveis mais baixos de farinha de mostarda confira uma maior estabilidade à emulsão, a adição de níveis mais elevados pode conduzir a um efeito contrário^[10, 13].

2.2 Molhos Não Emulsionados – Ketchup

O Ketchup é um produto heterogéneo produzido a partir da mistura de concentrado de tomate com outros ingredientes como açúcar, sal, vinagre e diferentes especiarias (**Tabela 2.2**). Atendendo à acidez do produto, apenas microrganismos tolerantes a ambientes ácidos são comuns de se desenvolverem (bolores, leveduras e bactérias ácido lácticas). Foi demonstrado que o crescimento e desenvolvimento de lactobacilos heterofermentativos causam a formação de gás no Ketchup, sendo a deterioração identificada através do rebentamento de algumas garrafas plásticas [30, 31].

Tabela 2.2 – Quantidade, em percentagem, dos ingredientes básicos utilizados na produção de Ketchup. Adaptado de [34].

| Ingredientes | Percentagem (%) |
|---------------------|------------------------|
| Água | 50,0 |
| Açúcar | 6,5 |
| Concentrado tomate | 37,0 |
| Vinagre | 2,0 |
| Sal | 1,5 |
| Xarope de glucose | 3,0 |

Durante a produção do Ketchup recorre-se à pasteurização, um processo que assume um papel fundamental na estabilização microbiológica do produto, consistindo no aquecimento de um produto, de forma a inativar as células viáveis de microrganismos contaminantes que possam provocar alterações no produto final. A redução da carga microbiológica é necessária para garantir a segurança alimentar do produto assim como o aumento do tempo de vida útil. As temperaturas de pasteurização variam de 60 a 99°C [30, 32 – 34].

Reologicamente, o Ketchup está dependente não só do concentrado de tomate, mas também do tipo e quantidade de agentes espessantes adicionados, como o amido e goma xantana/guar, para garantir a consistência e textura desejada. O Ketchup é um produto popular, usado com diversos alimentos porque melhora o sabor. Além disso, é fácil de usar e um produto de baixo teor calórico. O Ketchup também é uma fonte de carotenóides valiosos, dos quais o mais abundante é o licopeno [34, 35].

2.3 Aditivos Alimentares

Os aditivos são utilizados para vários fins durante a preparação dos géneros alimentícios, assumindo um papel importante na manutenção da qualidade e características organoléticas dos alimentos. Podem ser de origem natural ou sintética, e têm como principal objetivo garantir a segurança e qualidade do produto desde o fabrico à comercialização [36–38].

Apesar destas substâncias representarem uma grande utilidade no desenvolvimento de produtos alimentares, utilizações indevidas das mesmas (aplicação de teor excessivo ou inclusão de aditivo não declarado) tanto compreendem riscos para a saúde do consumidor como para a empresa responsável pela sua comercialização. Assim sendo, e de modo a garantir a segurança e confiança do consumidor, a legislação europeia exige uma inspeção e avaliação periódica aos aditivos tendo em conta as variações das condições de utilização e quaisquer novos dados científicos [36, 39]. Em Portugal, e segundo o Decreto-Lei n° 237/2005 de 30 de dezembro, esta inspeção e avaliação periódica é realizada pela ASAE, entidade responsável pelo plano nacional de fiscalização na área alimentar. Além disso, a Comissão Europeia apresenta listas onde constam os aditivos alimentares autorizados, catalogados por grupo de alimento, com especificação dos limites máximos permitidos para cada aditivo. Os conservantes e antioxidantes fazem parte do grupo E 200- 299[40].

2.4 Conservantes

Os conservantes são substâncias naturais ou sintéticas adicionadas a produtos alimentares, cosméticos e farmacêuticos, a fim de prolongar a sua vida útil e manter a qualidade e segurança, inibindo, retardando ou interrompendo ações como fermentação, acidificação, contaminação e decomposição microbiana [41, 42]. De acordo com o Regulamento (CE) nº 1333/2008^[36], o termo “conservante” diz respeito a “*todas as substâncias que prolongam o prazo de conservação dos géneros alimentícios protegendo-os contra a deterioração causada por microrganismos e/ou contra o desenvolvimento de microrganismos patogénicos*”.

A maionese é microbiologicamente estável devido ao seu alto teor de gordura e adição de ingredientes ácidos. Estes ingredientes contribuem para o sabor desejável, diminuem o pH final do produto e impossibilitam o desenvolvimento de agentes patogénicos, como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* [43]. A estabilidade microbiana do Ketchup e Molho 0% é assegurada pelo tratamento térmico que sofrem durante a sua produção, no baixo pH e na adição de ingredientes ácidos e conservantes. A melhor forma de prevenir ou retardar a deterioração de produtos alimentares é a aplicação de uma combinação de parâmetros, que podem agir sinergicamente para inibir ou retardar o crescimento de microrganismos indesejados. A atividade da água, o controlo da temperatura e pH e a adição de conservantes são as técnicas mais utilizadas.

2.4.1 Fatores que influenciam a deterioração microbiana

A flora microbiana existente num género alimentício resulta de interações complexas e contínuas entre determinados fatores, os microrganismos e a matriz. Esses fatores, que afetam o desenvolvimento microbiano, podem dividir-se em fatores intrínsecos e extrínsecos. Os primeiros estão relacionados com os próprios alimentos, ou seja, o pH, a atividade da água (a_w), o potencial de oxidação-redução (Eh), os nutrientes disponíveis, e as estruturas biológicas; os fatores extrínsecos são essencialmente as características do ambiente envolvente e de armazenamento, incluem a temperatura, a presença e concentração de gases, como o CO₂ e o O₂, a humidade relativa e o manuseamento [44-49].

Atividade da água (a_w)

A atividade da água (a_w) é a quantidade de água disponível para crescimento microbiano e outras funções biológicas como reações enzimáticas e químicas. É um parâmetro que mede a quantidade de água livre nos alimentos, sendo definida como a razão entre a pressão de vapor da água no substrato (p) e a da água “pura” (p_o) na mesma temperatura (Equação 1) [26, 50].

$$a_w = \frac{p}{p_o} \quad (1)$$

A menor atividade da água favorece as perturbações do crescimento e do metabolismo, reduzindo a cinética das reações de deterioração. Uma vez atingido um valor mínimo de atividade da água, o crescimento microbiano não é mais possível e a reação de deterioração é interrompida [50]. Assim, alimentos com elevados valores de a_w , como os produtos frescos, tendem a deteriorar-se mais rapidamente que aqueles que apresentam baixo teor de água disponível, devido à rápida multiplicação dos agentes deteriorantes. A **Tabela 2.3** apresenta os valores mínimos de a_w para o desenvolvimento de diferentes microrganismos [45, 47].

Chirife *et al* (1989) avaliaram a influência da composição química na atividade da água em maioneses *fat* ($\approx 80\%$) e *low-fat* ($\approx 40\%$). Verificaram que para maioneses *fat* o valor de a_w foi em torno de 0,93, enquanto para maionese *low-fat* foi próximo de 0,95. Concluíram que a diferença de valores de a_w era fortemente influenciada pela natureza e concentração de compostos solúveis na fase aquosa (por exemplo, NaCl, açúcares, ácido acético) [51].

Tabela 2.3 - Atividade mínima da água para crescimento de microrganismos específicos. Adaptado de [45, 47]

| | Microrganismos | a_w mínima |
|--------------------|---|--------------------------------|
| Grupo | Bactérias deteriorantes | 0,91 |
| | Leveduras deteriorantes | 0,88 |
| | Bolores deteriorantes | 0,80 |
| Específicos | <i>Staphylococcus aureus</i> (Gram (+)) | 0,86 |
| | <i>Escherichia coli</i> (Gram (-)) | 0,96 |
| | <i>Zygosaccharomyces rouxii</i> | 0,62 |

O tipo de reações dos alimentos, bem como a cinética da maioria das reações nas cadeias alimentares são dependentes da atividade da água. A estabilidade dos alimentos, velocidade das reações de deterioração e o crescimento microbiano dependem da atividade e da quantidade de

água e do seu estado físico. Perturbações na atividade da água podem afetar negativamente a reologia dos alimentos, promovendo alterações no seu tempo de prateleira. No entanto, ações como, remoção de água por adição de solutos ou diminuição da temperatura favorecem a redução da velocidade de deterioração (microbiana e enzimática) [45, 46, 50, 52].

pH

Os organismos são, em geral, mais sensíveis às mudanças no pH intracelular do que às mudanças no pH externo, embora alterações significativas em qualquer um deles promova a perda de viabilidade [45, 53, 54]. O pH da maionese desempenha um papel essencial na sua estrutura e estabilidade, sendo o seu máximo atingido quando o pH está próximo do ponto isoelétrico médio das proteínas da gema de ovo^[3].

Jacobsen *et al* (2001) investigaram o efeito de diferentes concentrações de ácido ascórbico e pH na oxidação e níveis de ferro e cobre em frações de maionese enriquecida com óleo de peixe. Concluíram que na presença de ácido ascórbico os íons ferro (Fe^{2+}) libertam-se da gema de ovo, promovendo o aumento da velocidade de oxidação na maionese. Além disso, esta atividade catalítica dos íons (Fe^{2+}) aumenta quando o pH diminui de 6,0 para 3,8, isto porque as pontes de ferro entre a fosvitina, lipovitelina e LDL se rompem, tornando os íons Fe^{2+} mais acessíveis como catalisadores da oxidação^[55].

Para crescimento e sobrevivência, as bactérias requerem valores de pH entre 6 e 8, enquanto as leveduras e bolores são capazes de crescer e sobreviver a uma faixa mais baixa e ampla de valores de pH; em algumas situações, a faixa de pH pode estar entre 2 e 11^[54, 56]. Quando os microrganismos são submetidos a um pH inferior ao seu pH ótimo de crescimento, o crescimento microbiano é inibido, podendo estar metabolicamente ativos. Como o pH externo e interno da célula não estão estabilizados, a célula não consegue dividir-se e desenvolver-se, sendo assim possível controlar a carga microbiológica.

Tendo em conta as condições ótimas de crescimento descritas na **Tabela 2.4**, agentes patogênicos como *Salmonella spp.*, *E.coli*, e *Staphylococcus aureus* morrem quando inoculados em maioneses ou outros produtos acidificados^[43, 57]. Os investigadores Li & Torog (2006) estudaram a resistência de *Staphylococcus aureus* ao pH ácido em diferentes produtos comerciais, incluindo a maionese. Concluíram que a população de *Staphylococcus aureus* diminuiu rapidamente quando mantida a 4 ou 25°C e nenhuma célula viável de *Staphylococcus aureus* adaptado e não adaptado ao ácido foi recuperada da maionese após 48h de armazenamento^[58].

Tabela 2.4 - Condições ótimas de crescimento (temperatura, pH e atividade da água) de agentes patogénicos Adaptado de [57].

| Crescimento de Microrganismos Patogénicos | | | |
|--|-------------------------|-----------|--|
| Microrganismos | Temperatura (°C) | pH | Atividade da água (a_w) |
| <i>Salmonella</i> spp. | 35-37 | 7,0-7,5 | 0,99 |
| <i>E. coli</i> | 35-40 | 6,0-7,0 | 0,99 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 40-45 | 6,0-7,0 | 0,98 |

A deterioração microbiana de produtos acidificados resulta da ação de três grupos de microrganismos: as leveduras, bolores e bactérias ácido lácticas (**Tabela 2.5**). O crescimento destes microrganismos pode conduzir à separação das fases da maionese (fase oleosa/aquosa), à formação de bolhas de gases e de odores e sabores desagradáveis^[43, 45, 59].

Tabela 2.5 - Principais características dos microrganismos tolerantes à acidez.

| Microrganismos | Características |
|---|---|
| Leveduras ^[45, 59-64] (<i>Zygosaccharomyces bailii</i>) | Altamente resistente a ambientes ácidos (1,8 < pH < 2,9); Osmotolerante; Fermentação da glucose e frutose mesmo na presença de conservante; Alterações organoléticas → perdas económicas. |
| Bolores ^[56, 65] (<i>Moniliella acetoabutans</i> , <i>Monascus ruber</i> e <i>Penicillium glaucum</i>) | Dependentes da quantidade de O ₂ disponível; Baixa viabilidade em ambientes com mais de 0,5% ácido acético. |
| Bactérias ácido lácticas ^[43, 45, 65] (<i>Lactobacillus plantarum</i> ; <i>Lactobacillus fructivorans</i>) | Tolerantes à acidez; Não prejudicial à saúde humana; Concentração máxima aceitável de <i>Lactobacillus</i> em maioneses - 10 ³ UFC/g ; Carga microbiana superior → alterações sensoriais → perdas económicas. |

Temperatura

A temperatura é um dos fatores extrínsecos com maior impacto sobre a taxa de crescimento microbiano^[53, 66]. A compreensão da interação entre tempo, temperatura e outros fatores intrínsecos e extrínsecos é crucial para a seleção das condições de armazenamento adequadas para um produto alimentar^[46]. Sabe-se que a relação entre temperatura e taxa de crescimento constante varia significativamente entre grupos de microrganismos - termófilos, mesófilos, psicrófilos e psicrotróficos (**Figura 2.1**). A **Tabela 2.6** apresenta a influência da diferença de temperatura no crescimento e desenvolvimento de microrganismos^[45, 46].

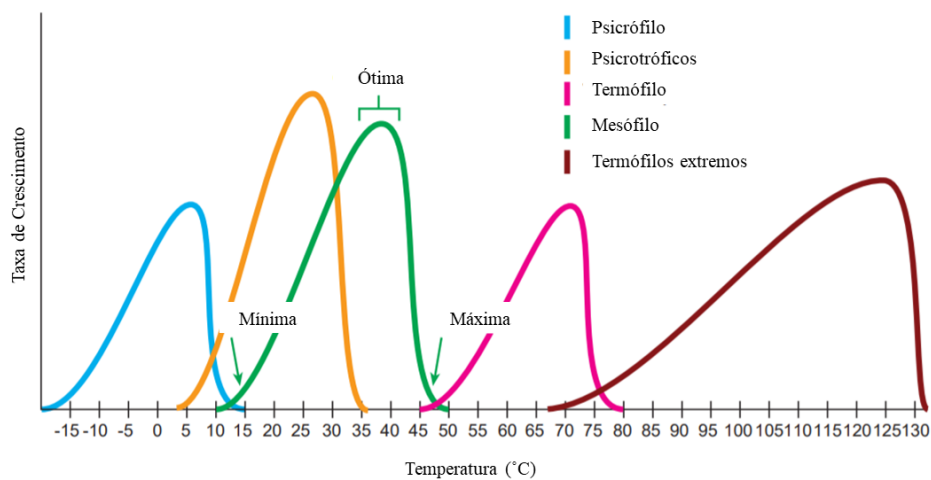


Figura 2.1 - Taxa de crescimento de diversos grupos de microrganismos de acordo com a temperatura. Adaptado de^[214].

Tabela 2.6 - Influência da temperatura (alta e baixa) no crescimento e desenvolvimento de microrganismos.

| Temperatura | |
|---|--|
| Baixa | Alta |
| Redução da fluidez da membrana | Desnaturação das proteínas celulares |
| Perturbações nos mecanismos de transporte | Inativação de enzimas sensíveis ao calor |
| Taxas de reação enzimática lentas | Perturbações na membrana celular, DNA |

2.4.2 Conservantes Sintéticos

Os conservantes sintéticos são os mais utilizados pela indústria alimentar no controlo do crescimento de microrganismos. Em Portugal, o tipo de conservante, o seu teor máximo e as respetivas aplicações encontram-se regulamentadas segundo regulamento (CE) nº1333/2008 de 16 de dezembro relativo a aditivos alimentares [36].

Ácido sórbico e Sorbato de potássio

Os ácidos orgânicos constituem um grupo de compostos naturais, conhecidos por ácidos fracos, e são utilizados como aditivos alimentares. Dos ácidos fracos existentes, os que apresentam maior eficácia são: ácido acético, ácido láctico, ácido sórbico e ácido benzoico. Estas substâncias são eficazes como conservantes de alimentos, pois para além das suas atividades antimicrobianas inibitórias, atuam também como reguladores de acidez, inibindo assim o crescimento microbiano através da redução do pH dos alimentos [67, 68].

A atividade dos ácidos orgânicos relaciona-se com o pH e a forma não dissociada do ácido [69]. Quanto mais baixo for o valor de pH maior será a concentração de ácido não dissociado em solução [67, 70]. Outro fator relevante na atividade destas substâncias é a polaridade, que está associada tanto à ionização da molécula como à contribuição de quaisquer grupos laterais alquilo ou hidrofóbicos. Devido a esta característica, os antimicrobianos devem ser lipofílicos de modo a fixar e penetrar a membrana celular [53, 68].

As ações responsáveis pela atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos incluem: (i) rutura/perturbação da membrana, (ii) *stress* no pH intracelular e (iii) esgotamento de energia e inibição reações metabólicas essenciais [53, 68, 69, 71].

O ácido sórbico é um ácido monocarboxílico insaturado constituído por uma cadeia linear de ácidos gordos com ligações duplas conjugadas. O ácido sórbico e seus sais solúveis, principalmente sorbato de potássio, são amplamente utilizados como conservantes em alimentos [45, 72]. O ácido sórbico funciona melhor abaixo de um pH de 6,0 e é, geralmente, ineficaz acima de pH 6,5. O pKa do ácido sórbico é de 4,76 e a um pH de 4,0, 86% do composto não é dissociado, enquanto a um pH de 6,0, apenas 6% é não dissociado. A absorção e difusão do ácido sórbico nos alimentos é influenciada pelos compostos, estrutura, pH e teor de humidade dos alimentos. Como a solubilidade do ácido sórbico na gordura é três vezes maior do que na água, o sal de potássio – sorbato de potássio – é o mais utilizado nos produtos alimentares [45, 73, 74].

Wind & Lawrence (1995) estudaram a eficácia antimicrobiana do benzoato de sódio e do sorbato de potássio em diferentes concentrações (0,05, 0,10, 0,20 e 0,30%, peso/peso), separadamente e em combinações iguais, relativamente ao crescimento de *Zygosaccharomyces bailii* em maionese armazenada à temperatura ambiente (23 a 25 ° C). Verificaram que a eficácia da ação

conservante é atribuída à quantidade de ácido não dissociado formado, fator que explica o porquê de o sorbato de potássio ser mais eficaz do que o benzoato de sódio quando adicionados em concentrações idênticas. Apuraram que a um pH 3,74, 87,5% de ácido sórbico existe na forma não dissociada, em comparação com 66,7% do ácido benzoico [75].

A menor toxicidade e um menor efeito nas propriedades organolépticas dos alimentos, são características que tornaram possível a aplicação do ácido sórbico e respectivos sais em praticamente todas as indústrias (alimentar, farmacêutica, cosmética) [76, 77]. Porém, e segundo o Regulamento (CE) nº1333/2008[36] a quantidade de ácido sórbico varia consoante a matriz onde é inserido. Para molhos emulsionados com menos de 60% de gordura o teor máximo permitido é de 2000 mg/kg enquanto para produtos com mais de 60% gordura e molhos não emulsionados o teor máximo permitido é de 1000 mg/kg.

2.4.3 Conservantes Naturais

Atendendo às necessidades dos consumidores, que procuram cada vez mais alimentos naturais, nutricionalmente apelativos e com designação de *clean label*, os fabricantes de produtos alimentares encontram-se numa constante busca de novas alternativas, de preferência naturais e que garantam o mesmo efeito não só a nível de eficácia como a nível de segurança e qualidade [78-80]. Este ideal vai ao encontro do objetivo da MG, que pretende tornar os seus produtos *clean label*, eliminando a designação “número E” dos seus rótulos através da substituição dos aditivos alimentares (neste caso, conservantes e antioxidantes) por alternativas naturais que garantam o mesmo nível de segurança e qualidade ao produto.

Os mecanismos de ação dos conservantes naturais incluem: (i) rutura da membrana celular, (ii) alterações na permeabilidade da membrana, (iii) perturbação dos mecanismos de ácidos nucleicos, (iv) destruição da força motriz de prótons e (v) esgotamento de energia (ATP). Os componentes antimicrobianos provenientes de plantas (polifenóis, óleos essenciais), animais (lisozima, lactoperoxidase, lactoferrina), e microrganismos seguem esses mecanismos para combater os agentes patogénicos de origem alimentar [79-82].

Entre os vários óleos essenciais que apresentam potencial antimicrobiano, o óleo essencial de orégão e tomilho têm mostrado resultados de destaque na inibição de diferentes microrganismos. Estes óleos essenciais são ricos em compostos fenólicos com intensa atividade antimicrobiana – timol e carvacrol. Acredita-se que o potencial antimicrobiano destes compostos fenólicos está intrinsecamente relacionado com a presença dos grupos (-OH) no anel fenólico, conferindo-lhe alto poder reativo [83-85].

Juven *et al* (1994) avaliaram a eficácia antimicrobiana do timol contra *S. typhimurium* e *S. aureus*. Criaram a hipótese do timol se ligar hidrofobicamente às proteínas da membrana por meio de ligações de hidrogénio, alterando as características de permeabilidade da membrana. Evidenciaram ainda que o timol é mais inibidor a pH 5,5 do que 6,5. Em pH baixo, a molécula de timol seria não-dissociada e, portanto, mais hidrofóbica, podendo assim ligar-se às áreas hidrofóbicas das proteínas e dissolver-se melhor na fase lipídica [86].

Quitosana

A quitosana, produzida comercialmente a partir da quitina, um subproduto obtido a partir de exoesqueletos de crustáceos e artrópodes, tem a capacidade de inibir o crescimento de bolores e leveduras e bactérias em alimentos. Roller & Covill (2000) investigaram a eficácia de glutamato quitosana como conservante contra bactérias e leveduras na maionese. A maionese contendo 3g/L de quitosana combinada com ácido acético (0,16%) ou sumo de limão (1,2% e 2,6%) foi inoculada com 10^5 ou 10^6 UFC/g de *Salmonella Enteritidis*, *Zygosaccharomyces bailii* ou *Lactobacillus fructivorans* e armazenada a 5 e 25°C durante 8 dias. Os resultados mostraram que na maionese com quitosana e 0,16% de ácido acético, 10^5 UFC/g de *L. fructivorans* foi completamente inativado. Concluíram que a quitosana pode ser útil como conservante quando combinada com ácido acético e armazenamento a baixas temperaturas (5°C) [87].

Oh *et al* (2001) estudaram a atividade antimicrobiana da quitosana em maioneses (100,500 e 1000 ppm) contra três espécies de microrganismos tolerantes à acidez, com intuito de descobrir o potencial da quitosana como conservante natural. Adicionaram uma carga microbiana de 10^7 UFC/g de *Lactobacillus fructovirans* e *Zygosaccharomyces bailii* em maionese contendo diferentes concentrações de quitosana e as amostras foram armazenadas a 25°C. No caso de *L. fructovirans* a adição de quitosana acelerou a morte celular. A eficácia da quitosana contra estes microrganismos aumentou com o aumento da concentração. Concluíram que a quitosana pode ser usada como conservante natural para o controlo do crescimento de microrganismos [88].

Mostarda

Milani *et al* (2014) compararam os efeitos de diferentes concentrações de pó e de pasta de mostarda no pH e no crescimento microbiano, com objetivo de substituir o sorbato de potássio e o benzoato de sódio para produção de uma maionese sem conservantes sintéticos. Primeiro, concentrações de 0% a 0,50% de pó de mostarda amarela foram aplicadas na fórmula da maionese. Verificaram que, quanto maior a concentração de pó de mostarda amarela, menor a população microbiana e maior o tempo de vida útil. No entanto, foram registadas algumas alterações a

nível sensorial (cor e sabor). Para amostras de maioneses com 1% de pasta de mostarda, os resultados mostraram uma redução da população microbiana, e sem alterações organolépticas devido à aplicação de tratamento térmico [89].

2.5 Antioxidantes

2.5.1 Oxidação Lipídica

Os lípidos fornecem uma das maiores fontes de energia nos alimentos e também desempenham papéis na determinação das características físicas gerais de alimentos, incluindo sabor, textura, sensação na boca e aparência. A oxidação lipídica é um dos maiores problemas que a indústria alimentar enfrenta, visto ser uma das principais causas de deterioração da qualidade alimentar [90, 91]. É um fenómeno que consiste numa sequência de interações químicas entre os grupos acilo dos ácidos gordos insaturados dos lípidos na presença de oxigénio [92]. Pode ser influenciado por diversos fatores como a temperatura, a exposição à luz, a composição do ácido gordo e a presença de metais de transição [93, 94].

A oxidação afeta, particularmente, ácidos gordos insaturados uma vez que as ligações duplas apresentam maior reatividade comparativamente às ligações simples [21, 95]. Do processo de oxidação lipídica destaca-se o mecanismo de autooxidação, caracterizado pela deterioração oxidativa de ácidos gordos insaturados, por meio de reações radicalares em cadeia que envolve 3 fases: iniciação, propagação e terminação [96].

A etapa de iniciação gera radicais livres na presença de precursores capazes de desencadear a reação, sendo os principais a luz, a temperatura e metais de transição. A formação do radical livre de alquilo ($R\bullet$) ocorre devido à libertação de um átomo de hidrogénio do carbono alílico na molécula de ácido gordo insaturado [90, 93].

A etapa de propagação é a que concentra o maior número de reações em cadeia, e por isso é considerada a fase principal da oxidação lipídica. Durante esta etapa, o radical livre de alquilo ($R\bullet$) reage rapidamente com a molécula de oxigénio (O_2) dando origem a radicais peróxido ($ROO\bullet$) altamente reativos que, consecutivamente, impulsionam as reações em cadeia [97]. Por sua vez, os radicais peróxido ($ROO\bullet$) reagem com outras moléculas de lípidos insaturados, removendo um hidrogénio da posição alílica a fim de formar hidroperóxidos ($ROOH$) e um novo radical lipídico instável [22, 98].

É de salientar que a propagação é um processo cíclico e, portanto, haverá sempre formação de novos radicais até ao momento em que se esgota o hidrogénio disponível ou até que a reação seja interrompida por fatores extrínsecos ^[22, 93]. Nesta fase, os radicais peróxido (ROO^\bullet) e hidroperóxidos ($ROOH$) caracterizam-se como produtos de oxidação primários e não apresentam qualquer tipo de odor ou sabor ^[21].

Para além da influência que os R^\bullet têm nas reações em cadeia, os hidroperóxidos formados são também suscetíveis à decomposição pela ação de fatores como metais de transição (catalisam a ação de decomposição), temperatura e radiação, promovendo a formação de outros radicais resultantes do processo autocatalítico ^[21, 95].

Aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos e compostos orgânicos voláteis são alguns dos exemplos dos produtos formados por decomposição dos hidroperóxidos. A estes compostos dá-se a designação de produtos de oxidação secundários, e contrariamente aos produtos primários, estes são os responsáveis por conceber o sabor e odor desagradáveis característicos de um alimento rançoso ^[90, 93]. O método mais comum para identificação e quantificação dos compostos de oxidação secundários é o GC-MS, visto ser um método específico e sensível que fornece um espetro de todos os possíveis compostos existentes originados pela oxidação.

Por fim, na etapa de terminação, os radicais reagem entre si a fim de formar compostos não radicalares mais estáveis. Estes compostos já não participam no ciclo reacional, o que promove a interrupção das reações em cadeia ^[22, 90, 93]. Na **Figura 2.2** encontram-se representadas as reações do mecanismo de autooxidação anteriormente descritas.

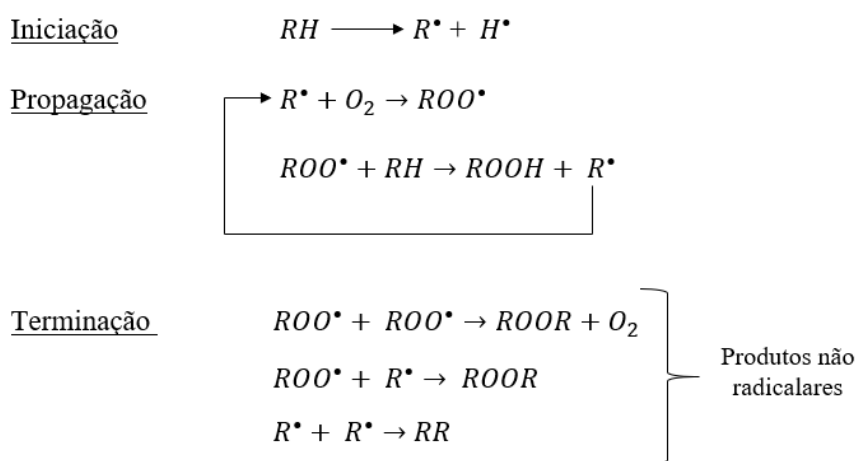


Figura 2.2 - Reações do mecanismo de autooxidação lipídica. Adaptado de ^[215].

2.5.2 Fatores que influenciam a cinética da oxidação lipídica

Como referido anteriormente, a oxidação lipídica depende de mecanismos reacionais diversos e complexos, os quais se encontram diretamente relacionados com o tipo de estrutura e meio onde a ação decorre. A influência de fatores como, a temperatura, exposição à luz, metais de transição e composição do óleo, representa um papel determinante para a estabilidade oxidativa.

A cinética de oxidação varia com a temperatura, cujo aumento afeta negativamente a estabilidade oxidativa uma vez que fornece energia e catalisa as reações de oxidação. Frankel (1980) defende a teoria da oxidação lipídica, onde evidencia que temperaturas elevadas promovem a oxidação dos lípidos ^[99]. Um dos princípios que sustenta essa teoria baseia-se no comportamento do oxigénio quando sujeito a altas temperaturas. O aumento da pressão parcial de oxigénio, provocado pelas temperaturas elevadas, leva à diminuição da sua solubilidade tornando-se num fator limitante durante a formação de hidroperóxidos. Do mesmo modo, o aumento da temperatura não só acelera o processo de oxidação como também potencia um aumento da contaminação por metais, destruindo possíveis compostos antioxidantes existentes na gordura ^[93, 100, 101].

Morales & Tenuta (2005) estudaram a influência da temperatura e do tempo de armazenamento na estabilidade oxidativa do colesterol na maionese comercial. Observou-se que a formação de óxidos de colesterol ao fim de 165 dias a 4°C se mostrou mais promissora do que a 25°C, o que permitiu concluir que a diminuição da temperatura de armazenamento seria a alternativa ideal para reduzir os efeitos da oxidação ^[102]. Li Hsieh & Regenstein (1991) através do estudo do efeito da temperatura na oxidação de maionese com óleo de peixe, concluíram que o produto apresentava maior estabilidade quando armazenado a temperaturas de refrigeração (2°C) ^[103].

A oxidação lipídica causada pela exposição à luz deve-se ao processo de fotoxidação. Este tipo de oxidação ocorre na presença de luz (ultravioleta ou visível) e fotossensibilizadores, que promovem a transformação de oxigénio tripleto ($^3\text{O}_2$) em oxigénio singlete (O_2), a sua forma mais reativa, cujas degradações posteriores originam aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos ^[100, 104]. A luz visível, ao atuar em simultâneo com outros catalisadores sobre as ligações duplas dos ácidos gordos insaturados, promove a oxidação e conseqüente formação de radicais livres. Estes catalisadores são, por norma, pigmentos naturais, como clorofila e riboflavina, conhecidos por serem moléculas fotossensíveis ^[22, 93, 97, 105].

Porém, nem todos os comprimentos de onda da radiação visível apresentam o mesmo efeito na oxidação lipídica, sendo especialmente problemáticos aqueles que se encontram na gama entre os 325 nm e os 470 nm. A luz azul, inserida nesta gama do espectro visível, é muito utilizada

nas superfícies comerciais, o que representa uma desvantagem visto que acelera o processo de oxidação. Posto isto, é aconselhado a que produtos suscetíveis à deterioração oxidativa, como é o caso da maionese, sejam resguardados da exposição direta à luz por forma a assegurar a sua integridade [3, 13, 21, 90, 93, 105].

Outro parâmetro relevante para a estabilidade oxidativa são os metais de transição, conhecidos pela sua capacidade de desencadear reações e catalisar a decomposição dos hidroperóxidos, proporcionando a formação de novos radicais livres [21, 93].

O óleo tem uma grande influência na qualidade da maionese. Tanto a quantidade de óleo disperso na maionese como a estrutura química dos lípidos que o constituem, contribui para o comportamento viscoelástico do produto [93, 106].

A suscetibilidade da molécula lipídica à oxidação depende do número e localização das ligações duplas. Os lípidos saturados, por não conterem ligações duplas são mais estáveis à oxidação lipídica comparativamente aos lípidos insaturados, que contêm uma ou mais ligações duplas. Os óleos vegetais podem ser classificados de diversas formas, sendo uma delas a classificação por composição de ácidos gordos. Os principais ácidos gordos insaturados presentes nos óleos vegetais são o ácido oleico, linoleico e linolénico [22, 107, 108].

Quanto à composição do óleo de girassol, sabe-se que é essencialmente constituído por quatro ácidos gordos sendo o mais abundante o ácido linoleico, seguido do ácido oleico. O ácido palmítico e o esteárico estão presentes, contudo em menores frações. Quanto ao óleo de soja, apresenta alto teor de ácido linoleico, seguido de ácido oleico e ácido linolénico. A **Tabela 2.7** apresenta os valores típicos das composições dos respetivos óleos.

Observa-se na **Tabela 2.7**, que o óleo de girassol contém aproximadamente 70% de ácido linoleico, o que o torna propício à oxidação lipídica. A posição e o número de ligações duplas em ácidos gordos levam a que a decomposição dos mesmos origine diferentes compostos aldeídos. As **Figuras 2.3 e 2.4** apresentam os principais componentes formados pela decomposição dos ácidos oleico e linoleico, respetivamente.

Tabela 2.7 - Comparação dos valores standard de composição de ácidos gordos no óleo de girassol e soja. Adaptado de ^[109].

| Tipo de óleo | Ácido Palmítico | Ácido Oleico | Ácido Linoleico | Ácido Estearico | Ácido Linolénico |
|----------------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|------------------|
| Óleo de girassol (%) | 7,0 | 18,7 | 67,5 | 4,5 | 0,8 |
| Óleo de Soja (%) | 10,6 | 23,3 | 53,7 | 4,0 | 7,6 |

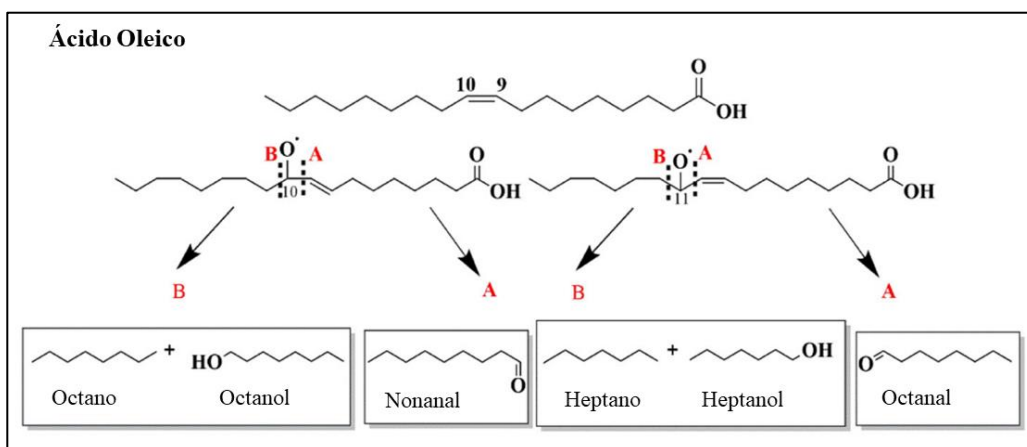


Figura 2.3 - Produtos de degradação do radical alcoxi nas posições 10/11 do ácido oleico. Adaptado de ^[19].

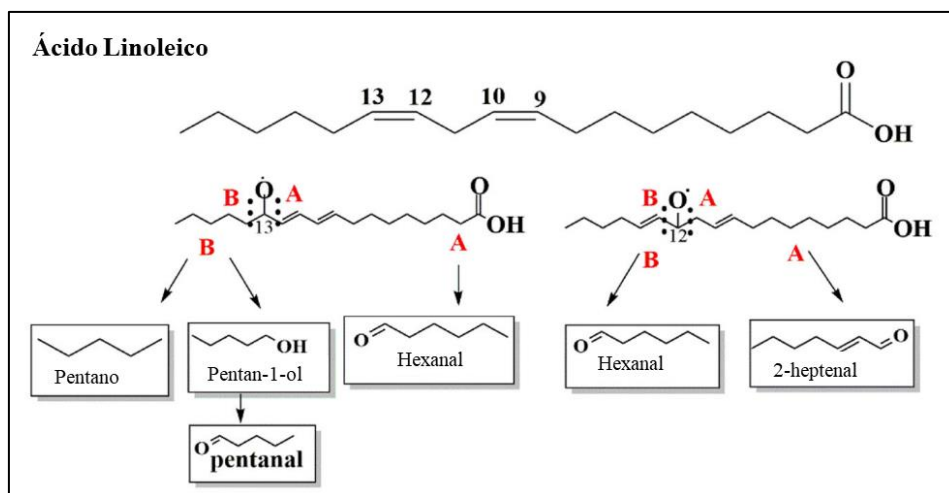


Figura 2.4 - Produtos de degradação do radical alcoxi nas posições 13/12 do ácido linoleico. Adaptado de ^[19].

2.5.3 Antioxidantes Primários e Secundários

A redução da concentração e pressão parcial de oxigênio, a diminuição da temperatura e o recurso à inativação das enzimas que catalisam a oxidação são alguns dos exemplos dos métodos aplicados para retardar ou mesmo inibir a oxidação lipídica. Dos métodos de proteção existentes, o mais eficaz e simples contra a oxidação lipídica é, sem dúvida, o uso de antioxidantes [93, 110].

Por definição, antioxidante é a substância que, quando introduzida em pequenas quantidades num sistema lipídico, inibe ou retarda significativamente a oxidação. Este tipo de substância pode surgir como constituinte natural de um alimento (tocoferol, por exemplo), ou pode ser intencionalmente adicionado ao produto durante a fase de processamento [98, 110].

Os antioxidantes podem ser classificados segundo o seu mecanismo de ação: antioxidantes primários (BHT, BHA, TBHQ e tocoferol) e secundários (EDTA, Ácido cítrico e outros ácidos orgânicos) [93, 111].

- **Antioxidantes primários ou “*chain-breaking*”:** substâncias capazes de aceitar radicais livres. Ao atuarem como doadores de hidrogênio, apresentam a capacidade de inibir a etapa de iniciação ou interferir na etapa de propagação, interrompendo as reações em cadeia. Este tipo de antioxidantes reagem com lípidos e radicais peróxido, convertendo-os em produtos não radicalares mais estáveis [111, 112].
- **Antioxidantes secundários:** não reagem diretamente com os radicais livres, mas sim com as substâncias que interagem com eles. A capacidade dos antioxidantes em retardar a oxidação deve-se à variedade de mecanismos existentes, incluindo a quelação de metais de transição, reposição de hidrogênio em antioxidantes primários, eliminação de oxigênio e absorção de radiação ultravioleta. Do ponto de vista das emulsões, os antioxidantes secundários mais importantes são os que apresentam capacidade de quelar íons metálicos, uma vez que a presença destes na fase aquosa da emulsão demonstra ser um fator determinante para a estabilidade oxidativa [111–113].

2.5.4 Antioxidantes Sintéticos

Os antioxidantes mais utilizados na indústria são o butil-hidroxianisol (BHA), o butil-hidroxitolueno (BHT), o terc-butil-hidroquinona (TBHQ), o propilo galato (PG) e o ácido etilendiamino tetra-acético (EDTA), este último devido às suas propriedades quelantes [93, 114]. Contudo, o uso destes antioxidantes tem levantado algumas questões relacionadas com a saúde humana. Estudos realizados evidenciam que BHA e BHT, apesar de demonstrarem elevada eficácia,

apresentam propriedades cancerígenas, o que leva ao aumento da toxicidade do alimento. Desta forma, a aplicação destes antioxidantes foi parcialmente restrita devido ao efeito adverso nas enzimas do corpo humano [96, 115, 116].

Os antioxidantes sintéticos acima mencionados, nomeadamente BHA, TBHQ e Galato de Propilo estão sujeitos a um limite de boas práticas de fabrico de 200 mg/kg, para molhos tipo maionese, segundo o Regulamento (UE) n° 1129/2011 [39, 41, 110, 117, 118].

O antioxidante mais usado pela indústria em estudo é o Etilenodiaminatetracetato de cálcio dissódico, também conhecido como EDTA de cálcio dissódico (EDTA) devido à sua elevada capacidade de quelação de metais de transição. O EDTA liga-se fortemente a iões metálicos, como o ferro e o cobre, que atuam como catalisadores no processo de oxidação lipídica, permitindo uma redução na cinética da oxidação. Além disso, a capacidade do EDTA em transferir os iões metálicos para longe do ponto alvo da oxidação (fase lipídica ou área interfacial) revela ser um fator determinante no retardar desta ação [119–121].

Através do estudo desenvolvido por Jacobsen *et al* (2001) verificou-se que o EDTA evita a formação não só de hidroperóxidos (produtos oxidação primários) como também de compostos orgânicos voláteis (produtos oxidação secundários), como o heptadienal e hexanal. Ao impedir a formação destes compostos, responsáveis pelos odores e sabores a ranço, contribui para a estabilidade das propriedades organoléticas da maionese [122, 123].

No que diz respeito à introdução deste componente em maioneses, o forte efeito antioxidante do EDTA advém da sua capacidade de quelar o ferro presente na gema do ovo (fosvitina), localizada na interface óleo-água na maionese, e o ferro livre, que de outra forma se encontravam disponíveis para catalisar a reação de oxidação [123–125]. De acordo o Regulamento (UE) n° 1129/2011 [39], o uso de EDTA em molhos é restrito, apresentando um teor máximo de 75 mg/kg.

2.5.5 Antioxidantes Naturais

Os antioxidantes naturais são moléculas que podem ser isoladas a partir de frutos, plantas aromáticas, chá e sementes e em pequenas quantidades possuem a capacidade de interromper a formação de radicais livres. Dessa forma, são capazes de reduzir a cinética das reações de oxidação dos compostos lipídicos ou impedir reações de escurecimento [126].

Os antioxidantes naturais apresentam um conjunto de vantagens, desvantagens e limitações, exibidas na **Tabela 2.8**. A nível molecular, estes antioxidantes podem ser tão potentes quanto os sintéticos, no entanto para atingirem a mesma eficácia devem ser inseridos em maior quantidade. Esta diferença deve-se à constituição do extrato natural, que para além dos

componentes ativos, responsáveis por conferir o poder antioxidante, apresenta outros constituintes que não contribuem para o retardar da oxidação. A nível económico, as alternativas naturais apresentam um custo mais elevado uma vez que os antioxidantes provêm de fontes botânicas com disponibilidade limitada e cujos métodos de extração implicam maiores custos ^[113].

Tabela 2.8 - Vantagens e desvantagens da aplicação de antioxidantes naturais. Adaptado de ^[141, 127].

| Vantagens | Desvantagens |
|---|---|
| Aceite pelos consumidores | Composição e atividade variáveis |
| Certificado por oficiais de saúde | Presença de outras substâncias não ativas |
| Vasta lista de antioxidantes disponíveis | Concentrações elevadas |
| Impacto sensorial (cor, odor, sabor) | Impacto sensorial (cor, odor, sabor) |
| Rotulado como “aroma” | Custo elevado |
| Pode ser substituído por produtos alimentares | Disponibilidade não imediata |

Os antioxidantes naturais tanto exibem forte atividade de eliminação de radicais livres, como possuem alta capacidade de absorção de radicais ou catalisadores de metal de modo a torná-los inativos. Se por um lado, impedem a formação de radicais livres e a propagação de espécies reativas de oxigénio, por outro eliminam radicais livres e procedem à quelatação metais de transição. O potencial antioxidante dessas substâncias naturais depende da distribuição de grupos funcionais na estrutura em causa. Por exemplo, o número e a posição dos grupos hidroxilo livre (-OH) na estrutura do flavonoide decidem o potencial de eliminação de radicais livres ^[128, 129].

Grande parte dos antioxidantes ocorre de forma natural em muitos alimentos, como é o exemplo da vitamina C encontrada em frutas e legumes e da vitamina E encontrada em sementes e nozes. Algumas vitaminas, ervas, especiarias (Alecrim, tomilho, orégão, sálvia, manjeriço, pimenta, cravo, canela e noz-moscada) e extratos de plantas (chá e semente de uva) também contêm compostos ativos antioxidantes. Além disso, os próprios óleos alimentares também contêm na sua estrutura antioxidantes naturais, como é o caso do α -tocoferol ^[115].

Contudo, tanto a potência do extrato natural, como a sua composição química, sabor e aroma estão intrinsecamente relacionados com o local geográfico, o período de recolha e o método de extração. Assim, é necessário ter em conta estes fatores quando se realizam os testes de eficácia do novo substituto natural nas matrizes em estudo ^[130, 131].

Gengibre

Kishk & Elsheshetawy (2013) investigaram o desempenho de gengibre em pó como antioxidante natural na estabilidade oxidativa da maionese e estudaram as suas características reológicas e sensoriais após aplicação deste elemento natural. Os resultados mostraram que a adição de gengibre em pó em concentrações 1% e 1,25% melhoravam a estabilidade oxidativa da maionese. Após 20 semanas, os valores de índice de peróxidos, índice de p-anisidina e valor total de oxidação mostraram ser significativamente mais baixos comparativamente à amostra controle. Relativamente às características reológicas da maionese, não sofreram alterações pela adição do gengibre em pó nas concentrações definidas. Curiosamente, o gengibre em pó melhorou o sabor e a textura, tendo a aceitabilidade geral entre o tempo zero e após 20 semanas melhorado ^[132].

Semente de uva

Altunkaya *et al* (2013) estudaram a capacidade antioxidante do extrato de semente de uva (0,05; 0,10 e 0,15%) na estabilidade oxidativa da maionese durante um período de armazenamento de 8 semanas a temperatura ambiente avaliando os seguintes parâmetros: índice de peróxidos, dienos e trienos conjugados e o teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*TBARs*). Os resultados mostraram que a maior capacidade antioxidante e o menor de índice de peróxidos e *TBARs* foi encontrado na maionese enriquecida com 0,15% de extrato de semente de uva. Porém, a aplicação deste extrato na maionese diminuiu a aceitação sensorial, especialmente em termos de cor, uma vez que a maionese tende a perder a sua coloração amarela e a adquirir uma tonalidade avermelhada ^[29].

Quitosana

Garcí *et al* (2014) avaliaram a influência da adição de quitosana como antioxidante natural na estabilidade da maionese. Três formulações foram desenvolvidas com EDTA e quitosanas com diferentes massas moleculares. As amostras de maionese foram armazenadas a 37; 47 e 57°C por 63 dias. Durante este período, foram analisados semanalmente os parâmetros: índice de peróxido e acidez. As maioneses com quitosana obtiveram melhores resultados sensoriais quanto a odor e sabor em relação à maionese controle. Observaram que a adição de quitosana retardou o processo de oxidação lipídica das maioneses durante 63 dias de armazenamento. A maionese com a quitosana com maior peso molecular apresentou melhor estabilidade durante o armazenamento acelerado em todas as temperaturas ^[133].

Extrato de Alecrim

O extrato de Alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*), planta aromática pertencente da família *Lamiaceae*, é um dos extratos naturais mais utilizados devido à sua forte capacidade antioxidante e lipossolubilidade ^[134, 135]. O extrato de Alecrim é constituído por diversos grupos de componentes polifenólicos incluindo terpenos fenólicos, flavonoides e alguns ácidos fenólicos. A composição do extrato varia consoante o método e local de extração (folha, flores ou caule) e localização geográfica. Apesar dos métodos de caracterização terem identificado vários componentes, os compostos ativos predominantes são os diterpenos fenólicos - ácido carnósico e o carnosol - que representam mais de 90% da atividade antioxidante do extrato de Alecrim ^[136].

Um dos aspetos mais significativos da atividade antioxidante do extrato de Alecrim é a relação entre os diterpenos fenólicos (ácido carnósico e carnosol) e a atividade de eliminação de radicais livres ^[135, 137]. Além de atuarem como antioxidantes primários, os grupos hidroxilo constituintes das moléculas de ácido carnósico e carnosol também apresentam capacidade de quelar iões metálicos, como o ferro e cobre, ajudando assim no retardar da oxidação lipídica por meio de um mecanismo secundário ^[136]. Tal característica faz com que o mecanismo de ação do extrato de Alecrim se aproxime do EDTA, sendo por isso considerado um substituto eficaz do EDTA. Gallego *et al* (2013) e Zhang *et al* (2010) revelaram que a capacidade antioxidante do extrato de Alecrim é atribuída à presença de diterpenos fenólicos que eliminam o oxigénio singlete, radicais hidroxilo e radicais peróxido, impedindo a oxidação lipídica ^[138, 139].

De acordo com a legislação europeia, o extrato de Alecrim encontra-se listado como E-392. O limite legal permitido em molhos emulsionados é expresso pela soma de carnosol e ácido carnósico em relação à matéria gorda, sendo o limite de 100 mg/kg. Quanto aos temperos e condimentos, o limite legal é 200 mg/kg.

2.5.6 Sinergismo

Por apresentarem propriedades específicas, os antioxidantes tendem a ser mais eficazes em certas matrizes alimentares em detrimento de outras. A combinação entre dois ou mais antioxidantes torna-se, por vezes, mais eficaz que o uso individual, favorecendo os efeitos sinérgicos que melhoram a atividade dos antioxidantes ^[140]. Além disso, a escolha de combinações sinérgicas permite a redução na concentração de cada componente, aumento assim a eficácia do antioxidante. Porém, este efeito depende de valores de pH, temperatura de armazenamento e processamento, concentração de compostos ativos e quantidade de oxigénio ^[141, 142].

Um bom exemplo de sinergia é a combinação entre agentes quelantes metálicos e supressores de radicais livres. Esta conjugação mostra sinergismo na inibição da oxidação de

componentes alimentares, devido principalmente à ação de poupança de supressores de radicais livres por quelantes. Os agentes quelantes, que atuam essencialmente durante a fase de iniciação, inibem a oxidação catalisada por metais produzindo níveis mais baixos de radicais. Por sua vez, estes radicais são eliminados pelos antioxidantes que atuam como supressores de radicais livres [110, 142].

Yin *et al* (2012) analisaram o efeito antioxidante de α -tocoferol em combinação com extrato de chá verde e alguns dos seus componentes ativos (catequinas e epicatequinas) em diferentes sistemas lipídicos, incluindo emulsões óleo-em-água. Os resultados demonstraram um forte efeito sinérgico na combinação entre α -tocoferol e extrato de chá verde, em óleo de girassol e emulsão óleo-água, especialmente quando o extrato se encontrava em excesso comparativamente ao tocoferol [143].

3. Materiais e Métodos

3.1 Preparação e armazenamento das matrizes alimentares

No âmbito deste estudo foram desenvolvidos molhos emulsionados – Maionese 65% de gordura – e molhos não emulsionados – Molho 0% e Ketchup – com diferentes combinações de conservantes e antioxidantes, com intenção de substituir os já usados pela empresa por alternativas naturais viáveis. Foram escolhidas estas matrizes devido à diversidade das composições. A maionese, por conter 65% gordura, considera-se um molho importante para o estudo da eficácia dos antioxidantes naturais. O Ketchup, por apresentar um elevado teor de açúcar e atividade de água, é indicado para o estudo da influência dos conservantes naturais ao longo do tempo de vida útil. O Molho 0%, um molho sem gordura, com baixo teor de sal e elevada atividade de água, reúne também as condições ideais para o estudo da eficácia dos conservantes naturais ao longo do tempo. A **Tabela 3.1** apresenta as designações definidas para as diferentes combinações de conservante para o Ketchup e Molho 0% e a **Tabela 3.2** as designações para as combinações de antioxidante/conservante para as Maioneses 65%.

Estes produtos foram produzidos num reator de homogeneização, seguindo os procedimentos e formulações usados pela empresa. A adição dos conservantes e antioxidantes variou consoante a sua afinidade para com as fases aquosa/oleosa e a quantidade introduzida dependia dos teores máximos definidos por lei e doses recomendadas (**Tabela 3.3**).

De acordo com a revisão bibliográfica, existem diversas soluções para a substituição de conservantes e antioxidantes sintéticos, contudo estas ainda se encontram em fase de validação ou testagem em matrizes iguais ou semelhantes às desenvolvidas nesta dissertação. Neste sentido foram selecionadas alternativas já existentes no mercado (sugeridas por fornecedores da empresa) de forma a validar a sua eficácia nas matrizes definidas.

Na tentativa de alterar o conservante utilizado pela empresa (Sorbato de Potássio) testaram-se dois conservantes. O primeiro, mencionado neste trabalho como **VinTamp**, trata-se de um vinagre em pó tamponado. Já o segundo, referido ao longo do texto como **ELAL**, trata-se de um conservante natural à base de extrato de laranja e ácido láctico. As doses recomendadas de conservante a aplicar encontram-se descritas na **Tabela 3.3**. Para a produção das matrizes, e por não ter sido realizado o *Challenge test*, considerou-se o teor máximo para ambos os conservantes naturais.

Tabela 3.1 - Designação das combinações de conservante com Ketchup e Molho 0%.

| Combinações Ketchup e Molho 0% | Designação |
|---|-------------------|
| Ketchup + Sorbato | Ket_1 |
| Ketchup + VinTamp | Ket_2 |
| Ketchup + ELAL | Ket_3 |
| Molho 0% + Sorbato | M1 |
| Molho 0% + VinTamp | M2 |
| Molho 0% + ELAL | M3 |

Tabela 3.2 - Designação das combinações de antioxidante/conservante das Maioneses 65%.

| Combinações Maionese 65% | Designação |
|-------------------------------------|-------------------|
| S/conservante + EDTA | COMB_1 |
| S/conservante + XTRA | COMB_2 |
| S/conservante + Alecrim | COMB_3 |
| Sorbato + EDTA | COMB_4 |
| Sorbato + XTRA | COMB_5 |
| Sorbato + Alecrim | COMB_6 |
| VinTamp + EDTA | COMB_7 |
| VinTamp + XTRA | COMB_8 |
| VinTamp + Alecrim | COMB_9 |
| ELAL + EDTA | COMB_10 |
| ELAL + XTRA | COMB_11 |
| ELAL + Alecrim | COMB_12 |

Como alternativa natural ao EDTA de cálcio dissódico foram produzidas Maioneses 65% com dois tipos de antioxidante: **XTRA**, que consiste numa mistura de extrato de Alecrim com extratos de espinafres e **Alecrim**, um antioxidante à base de extratos de Alecrim. A quantidade de XTRA é aplicada segundo a dose recomendada (**Tabela 3.3**), sendo que neste caso optou-se pela dosagem intermédia de 3500 ppm. Relativamente ao **Alecrim**, a quantidade a adicionar foi calculada de acordo com o máximo permitido por lei, cálculo este dado pela razão entre o limite máximo admitido para o extrato de alecrim (100 ppm) e a soma de ácido carnósico e carnosol, medido em relação à matéria gorda. As amostras de referência para as Maioneses 65% foram *Sorbato de Potássio + EDTA*, e para o Ketchup e Molho 0% considerou-se como referência as amostras produzidas com *Sorbato de Potássio*.

Tabela 3.3 - Teores máximos de conservante e antioxidante permitidos para as matrizes em estudo.

| | | Teor (mg/kg) | Autoridade |
|---------------------|---------------------|--------------|--|
| Antioxidante | EDTA | 75 | Regulamento (CE) n°1333/2008 ^[36] |
| | Alecrim | 100 | |
| | XTRA | 3000 – 4000 | Dose recomendada |
| Conservante | VinTamp | 4000 – 6500 | Dose recomendada |
| | ELAL | 1000 – 2000 | |
| | Sorbato de potássio | 1300 | Regulamento (CE) n°1333/2008 ^[36] |

Após a produção, os produtos foram transferidos para frascos de vidro de 250 mL, previamente esterilizados, fechados com tampas metálicas e com o mesmo *headspace*. As amostras foram armazenadas em prateleiras à temperatura ambiente ($\approx 23^{\circ}\text{C}$) e em estufa ($\approx 37^{\circ}\text{C}$) durante 3 meses.

3.2 Análises Físico-Químicas

3.2.1 pH

Os valores de pH das amostras de maionese, Molho 0% e Ketchup foram medidos à temperatura ambiente utilizando um medidor de pH da HANNA Instruments, modelo HI 2211, com recurso a um eléctrodo de prata e corpo de vidro, igualmente da HANNA Instruments, modelo HI1053. O eléctrodo foi mergulhado no frasco da amostra e retirou-se o valor após estabilização. As calibrações foram realizadas com soluções standard de pH 4,01 e 7,01.

3.2.2 Acidez

A acidez contabiliza o total de ácidos presentes na amostra e é expressa em percentagem de ácido acético. Com auxílio de uma balança analítica (KERN, modelo ALJ 250-4AM) pesaram-se 0,84g da matriz a analisar para um tubo de amostra e adicionaram-se 20mL de água destilada. A medição deste parâmetro consiste numa titulação com uma solução de NaOH 0,1M, sob constante agitação, até atingir um pH de 8,20 (ponto de viragem da fenolftaleína). O volume de titulante gasto correlaciona-se com a quantidade de ácido acético presente na amostra. Esta medição é realizada com recurso a um medidor de pH com bureta da PH-Matic 23 CRISON Instruments, modelo CRI 2304 e elétrodo CRISON 5011T.

3.2.3 Cloretos

A medição dos cloretos permite avaliar o teor de sal presente na amostra e é expresso em percentagem de cloreto de sódio (%NaCl). Com auxílio de uma balança analítica (KERN, modelo ALJ 250-4AM) pesaram-se 2,1 g da matriz a analisar para um tubo de amostra. O método consiste numa titulação com AgNO_3 0,1M (Honeywell/Fluka), usando uma solução auxiliar de Ácido Sulfúrico 0,05M (Pareac Applichem) para ajustar o pH. A titulação termina quando o pH atinge 8,30. O volume de titulante gasto é convertido na quantidade de NaCl presente na amostra. Esta medição é feita com recurso a um medidor de pH com bureta da Salt-Matic 23 CRISON Instruments.

3.2.4 Viscosidade

A viscosidade é uma das características físicas mais importantes de avaliar na maionese. Este parâmetro foi avaliado através de um viscosímetro de Brookfield com sonda 07 a 30 rpm. O tipo de sonda e rotações por minuto variam consoante a viscosidade esperada (**Tabela 3.4**).

Tabela 3.4 - Variação do tipo de sonda e velocidade de rotação segundo a viscosidade esperada.

| Viscosidade (cP) | Sonda | rpm | Tempo |
|---------------------|----------|------------------|-------|
| Alta (>10000) | 06 ou 07 | Mínimo – 10 rpm | |
| Médio (3000 – 5000) | 04 | Ótimo – 50 rpm | 30 s |
| Baixa (1000) | 02 ou 03 | Máximo – 100 rpm | |

A medição da viscosidade é realizada através da inserção de um disco (neste caso, sonda 07) na maionese. O viscosímetro Brookfield funciona segundo o princípio da viscosimetria rotacional; este aparelho mede a viscosidade detetando o torque (τ) necessário para girar a sonda em velocidade constante (neste caso, 30 rpm) enquanto imersa na amostra. O torque obtido é proporcional ao arrasto viscoso da sonda imersa, e por isso, proporcional à viscosidade da amostra. A maionese é descrita como um fluido não newtoniano, da categoria pseudoplástico, sendo que a viscosidade varia consoante a taxa de cisalhamento, mais propriamente, a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento.

3.2.5 Consistência

A consistência foi medida com recurso a um consistómetro da CSC Scientific, modelo LD-BC. Com o consistómetro fechado, colocou-se a amostra de Ketchup (ou Molho 0%) até acima. De seguida abriu-se o consistómetro e contou-se 30 segundos. Ao fim desse tempo, contabilizou-se a distância percorrida. As medições foram realizadas à temperatura ambiente.

3.2.6 °Brix

O °Brix é uma escala numérica de índice de refração, que quantifica o teor de sólidos solúveis presentes numa solução aquosa, sendo que a quantidade de sólido solúvel é o total de todos os sólidos dissolvidos em água, como o açúcar e sal. Este parâmetro foi medido com recurso a um refratómetro da HANNA Instruments, modelo HI 96801.

3.2.7 Índice de peróxidos

Para determinação do Índice de Peróxidos (IP) começa-se por dissolver uma amostra de óleo num solvente adequado (meio ácido) seguida da adição de uma solução de iodeto de potássio. Os hidroperóxidos presentes na amostra de óleo são reduzidos pelo iodeto de potássio, e a libertação do iodo confere uma cor amarela. A quantidade de iodo produzido por esta reação pode ser contabilizada por uma titulação com uma solução aquosa de tiosulfato de sódio, na presença de amido. A quantidade de iodo produzido é diretamente proporcional ao valor de peróxidos^{[144], [145], [109], [146]}.

Extração da fase lipídica

A extração do óleo foi realizada de acordo com o método descrito por Lagunes-Galvez *et al* (2002) embora com algumas alterações^[147]. Para validação do método de extração foram realizados ensaios preliminares cujos parâmetros manipulados foram o tempo de congelamento, a rotação e o tempo de centrifugação, como é possível ver pela **Tabela 3.5**. Foram congeladas 6 amostras de 155g de maionese numa câmara de congelamento a -24°C. Colocaram-se porções de 30g em tubos de centrifugação após o descongelamento a 5°C durante 2h.

Tabela 3.5 - Parâmetros manipulados durante os ensaios preliminares da extração da fase lipídica.

| Nº ensaio/Variáveis | 1 | 2 | 3 |
|------------------------------|------|--------|--------|
| Tempo congelção (h) | 24 | 48 | 72 |
| Rotação (rpm) | 4200 | 10 000 | 10 000 |
| Tempo de centrifugação (min) | 20 | 10 | 10 |

Tendo em conta os resultados obtidos na validação do método de extração da fase lipídica, as amostras foram congeladas a -24°C durante 72h, sendo que o descongelamento se deu a 5°C durante 2h. Após este tempo, foi possível verificar a separação de fases.

De seguida, porções de 30g foram colocadas em tubos de centrifugação que, por conseguinte, foram colocados numa centrifugadora da Beckman Coulter, modelo Avanti Centrifuge J-26 XPI com rotor JA 25/50, a 10 000 rpm durante 10 min. A fase lipídica da emulsão, isto é, o sobrenadante, foi depois utilizado na determinação do índice de peróxidos e do índice de p-anisidina. A **Figura 3.1** ilustra a sequência do processo de extração do óleo.

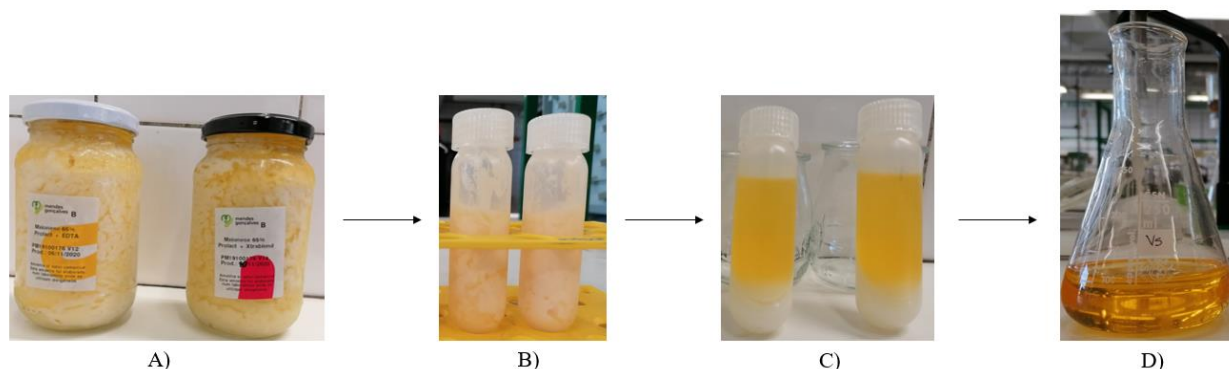


Figura 3.1 - Sequência de processos para extração do óleo - A) Maioneses após descongelamento a 5°C, 2h; B) Porções de 30g em tubos de centrifugação; C) Resultado após centrifugação 10000 rpm 10min; D) Extração do sobrenadante.

Determinação do índice de peróxidos

Este parâmetro foi determinado de acordo com o método oficial Cd 8b-90 (2003), onde consta que a massa da toma de ensaio é dependente do índice de peróxidos esperado (**Tabela 3.6**). Colocou-se a amostra de óleo num balão de erlenmeyer de 250 mL, e adicionaram-se 50mL de uma solução ácido acético (Carlo Erba, $\geq 99,8\%$) e isooctano (Carlo Erba, $\geq 99,5\%$) na proporção 3:2. Mediu-se 0,5mL de solução saturada de iodeto de potássio (Honeywell, $\geq 99,5\%$) preparada na hora e de acordo com o mesmo método. Deixou-se repousar por 5 min na ausência de luz para favorecer a reação. De seguida, adicionaram-se 30 mL de água destilada. Procedeu-se à titulação com solução de tiosulfato de sódio (M&B Laboratory Chemicals, 99%) (concentração variável e a definir consoante o IP esperado ^[148]). Adicionaram-se 2mL de solução de amido 1% como indicador. No momento de adição desta solução notou-se a mudança de tonalidade para violeta escuro. A titulação procedeu até desaparecimento da cor escura. Assim que se atingiu o ponto de viragem, fechou-se a bureta e contabilizou-se o volume de titulante gasto. De acordo com o Decreto-Lei nº 106/2005 de 29 de junho, o limite legal para um óleo ser considerado bom é de 10 meqO₂/kg, sendo que acima deste valor considera-se o óleo não conforme.

O cálculo do índice de peróxidos é feito através da Equação (2):

$$\text{Índice de peróxidos (IP)} \left(\frac{\text{meqO}_2}{\text{kg}} \right) = \frac{(V - V_0) \times c \times 1000}{m} \quad (2)$$

Onde, V – Volume de solução tiosulfato de sódio gasto, mL; V₀- Volume de solução tiosulfato de sódio do ensaio em branco, mL; c – Concentração de tiosulfato de sódio usado na titulação, M; m – Massa da toma de ensaio, g.

Tabela 3.6 - Massa da toma de ensaio de óleo (g) consoante o valor de peróxidos esperado.

| Valor de peróxidos esperado (meqO ₂ /kg) | Massa (g) | Incerteza (g) |
|--|-----------|---------------|
| 0 – 12 | 5,0 – 2,0 | ± 0,01 |
| 12 – 20 | 2,0 – 1,2 | ± 0,01 |
| 20 – 30 | 1,2 – 0,8 | ± 0,01 |
| 30 – 50 | 0,8 – 0,5 | ± 0,01 |
| 50 – 90 | 0,5 – 0,3 | ± 0,001 |

3.2.8 Índice de p-anisidina

De acordo com o método oficial Cd 18-90 da AOCS (2003), num balão volumétrico de 25 mL, colocou-se uma porção de óleo com massa compreendida entre 0,5 – 4,0 g consoante o índice de p-anisidina esperado, e perpez-se o volume com isooctano (Carlo Erba, $\geq 99,5\%$). A esta solução designou-se de solução mãe, e mediu-se a absorvância a 350 nm utilizando como branco o solvente isooctano. Separadamente, preparou-se a solução de p-anisidina (Sigma-Aldrich, 99%) dissolvendo 0,25g de p-anisidina em 100 mL de ácido acético glacial (Carlo Erba, $\geq 99,8\%$).

De seguida, e com auxílio de 2 frascos (frasco A e B), pipetou-se 5 mL da solução mãe para o frasco A e adicionou-se 1 mL da solução p-anisidina. De igual forma, pipetou-se 5mL de isooctano para o frasco B e adicionou-se 1 mL da solução p-anisidina. Ambos os frascos foram agitados e resguardados da luz durante 10 min, antes da medição da absorvância, de forma a promover a reação. Mediu-se a absorvância da solução do frasco A a 350 nm, utilizando como branco a solução presente no frasco B. Os valores de absorvância foram medidos com recurso a um espectrofotómetro da *Thermo Scientific, Evolution 201*.

O cálculo do índice de p-anisidina é feito através da Equação (3):

$$IpA \left(\frac{nm}{g} \right) = \frac{25 (1,2Abs_2 - Abs_1)}{m} \quad (3)$$

Onde, Abs_1 – Absorvância da solução-mãe (nm); Abs_2 – Absorvância após 10 min de reação com p-anisidina (nm); m – Massa da toma de ensaio (g)

3.2.9 Valor total de oxidação (TOTOX)

Combinando o índice de peróxidos (IP) com índice p-anisidina (IpA) é possível prever o valor total de oxidação, comumente designado de TOTOX^[132, 149–152]. Este valor é calculado segundo a Equação (4) abaixo representada:

$$TOTOX = 2 IP + IpA \quad (4)$$

3.3 Análise dos compostos de oxidação secundários

3.3.1 Procedimento HS-SPME

Porções de 3g – 4g das amostras de maionese foram colocadas num frasco de 22 mL, selado com um septo de borracha revestido de teflon com tampa de rosca magnética. A fibra DVB/Carb/PDMS, de espessura de filme de 50/30 μm (df) e 1 cm de comprimento (Supelco Analytical (Bellefonte, PA, EUA)), foi a escolhida para a amostragem por HS-SPME. Antes de usar, a fibra foi condicionada seguindo as recomendações do fabricante. Brancos de fibra foram executados periodicamente para garantir a ausência de contaminantes e/ou efeito de memória. Os frascos de amostra foram equilibrados na incubadora a 50°C durante 10 min e, em seguida, extraídos por 50 minutos à mesma temperatura. A desorção térmica dos analitos decorreu expondo a fibra ao injetor do GC a 260 °C durante 3 minutos em *splitless*. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

3.3.2 Condições GC/MS

A análise cromatográfica foi realizada em GC acoplado a espectrometria de massa, com o auxílio de um cromatógrafo Bruker Scion SQ 456 GC-MS. Foi utilizado um amostrador automático CTC-CombiPal, e os dados adquiridos com o sistema MSWS 8.2 Bruker e analisados com Bruker MS Data Review 8.0. A separação cromatográfica decorreu numa coluna capilar DB-WAX (60 m x 0.32 mm i.d., 1 μm df). O programa de temperatura iniciou-se aos 40 °C, onde se manteve 5 min subindo a 4°C/min até aos 240 °C, mantendo-se 5 min a esta temperatura. O hélio foi utilizado como gás de arraste, a fluxo constante de 1,7 mL/min. Para determinar os fragmentos de massa, a ionização electrónica (EI) foi ajustada a 70 eV e os espectros registados entre 40 e 450 Da. A linha de transferência do MS bem como a fonte iónica foram colocadas a 240 °C e 220 °C, respetivamente. Os espectros de massa foram comparados com a biblioteca do *NIST MS Search Program Version 2.0*. Além disso, recorreu-se a uma solução de hidrocarbonetos lineares de C8 a C20 para cálculo dos índices de retenção lineares (LRI). O conteúdo relativo (%) dos componentes presentes na amostra foram determinados segundo a normalização da área do pico.

3.4 Análises microbiológicas

Realizaram-se análises microbiológicas às amostras armazenadas à temperatura ambiente e em estufa, no início e no fim do acompanhamento de 3 meses, seguindo-se os Métodos ISO aplicados no Laboratório de Qualidade da MG para a contagem dos microrganismos a 30 °C (ISO 4833:2013), bactérias ácido-lácticas (ISO 15214:1998), bolores e leveduras (ISO 21527-1:2008) e *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-1:2004). Estas análises foram realizadas pelo Laboratório de Qualidade da MG.

3.4.1 Preparação da Suspensão inicial

Para preparar a suspensão inicial pesaram-se, assepticamente, 10 g de cada uma das amostras para um saco de homogeneização (*Stomacher*) e adicionaram-se 90mL de uma solução *Tryptona Salt*. As misturas foram fortemente agitadas, e em seguida foram preparadas diluições seriadas (de 1 para 10) em solução *Tryptona Salt*.

3.4.2 Contagem de Microrganismos a 30°C (ISO 4833:2013)

Inoculou-se 1 mL da suspensão inicial e de cada diluição preparada para a respetiva placa e adicionou-se 12 a 15 mL do meio de cultura específico (PCA - *Plate Count Agar*). Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas a 30°C. Procedeu-se à contagem, ao fim de 72h, de todas as colónias desenvolvidas num máximo de 300 colónias.

3.4.3 Contagem de Bolores e Leveduras (ISO 21527-1:2008)

Inoculou-se 0,1 mL da suspensão inicial e de cada diluição preparada para a respetiva placa para o meio de cultura específico (DRBC - *Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol* para produtos com $a_w > 0,95$; DG18 - *Dichloran Glicerol Agar* para produtos com $a_w < 0,95$). Espalhou-se o líquido sobre a superfície da placa com um espalhador estéril até a completa absorção no meio. As placas foram incubadas aerobicamente, com as tampas numa posição superior, na estufa a 25°C por 5 dias. No final do tempo de incubação procedeu-se à leitura das placas, selecionando-se placas com menos de 150 colónias/propágulos.

3.4.4 Contagem de Bactérias Ácido Lácticas (ISO 15214:1998)

Inoculou-se 1 mL de suspensão inicial e de cada diluição preparada para a respetiva placa e adicionou-se 12 a 15 mL do meio de cultura específico (MRS - *de Man, Rogosa and Sharpe*). Após a solidificação do meio, adicionou-se uma outra camada de meio de cultura (15 mL) e deixou-se solidificar novamente. De seguida, as placas foram invertidas e incubadas a 30°C durante 72h±3h, sendo que ao fim deste tempo selecionaram-se as placas com mais de 15 colónias e menos de 150. Para confirmação das colónias, repicaram-se as colónias características para meio de cultura NA (*Nutrient Agar*) e incubou-se a placa a 37°C durante 24h. Posteriormente foi realizado o Teste Peróxido de Hidrogénio.

3.4.5 Contagem de *Enterobacteriaceae* (ISO 21528-1:2004)

Inoculou-se 1 mL da suspensão inicial e de cada diluição preparada para a respetiva placa e adicionou-se 12 a 15 mL do meio de cultura específico (VRBG - *Violet Red Bile Glucose Agar*). Após solidificação, adicionou-se uma outra camada de 15 mL de meio específico e deixou-se solidificar novamente. Por fim, as placas foram invertidas e incubadas a 37°C durante 24h ± 2h. Após o período de incubação procedeu-se à leitura das placas, selecionando-se as placas com mais de 15 colónias e menos de 150 colónias. Para confirmação das colónias, repicaram-se as colónias características para meio de cultura NA (*Nutrient Agar*) e incubou-se a placa a 37°C durante 24h. Posteriormente foram realizados o teste da oxidase e o teste da fermentação da glucose.

3.5 Acompanhamento Sensorial

No sentido de acompanhar a evolução e estabilidade organoléptica das maioneses, Molho 0% e Ketchup foram realizadas provas sensoriais avaliando parâmetros como cor, sabor, odor e identificação de traços de ranço. As amostras (**Figura 3.2**) foram regularmente provadas por 3 elementos do IDI (Departamento de Investigação e Desenvolvimento de Produto) familiarizados com os produtos, sendo que estes não tinham conhecimento da sua formulação, pelo que, cada provador deveria identificar as diferenças entre as amostras e caso existissem, descrevê-las. Relativamente às maioneses, essas diferenças eram classificadas de acordo a escala da **Figura 3.3**, sendo que a classificação atribuída tinha o objetivo de avaliar o deterioramento sensorial das maioneses ao longo do tempo.

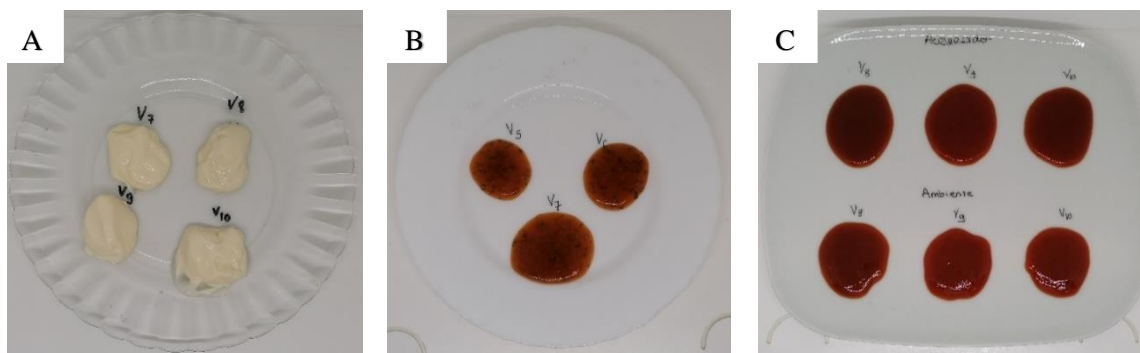


Figura 3.2 – Registo fotográfico da prova sensorial de maioneses (A), Molho 0% (B) e Ketchup (C).

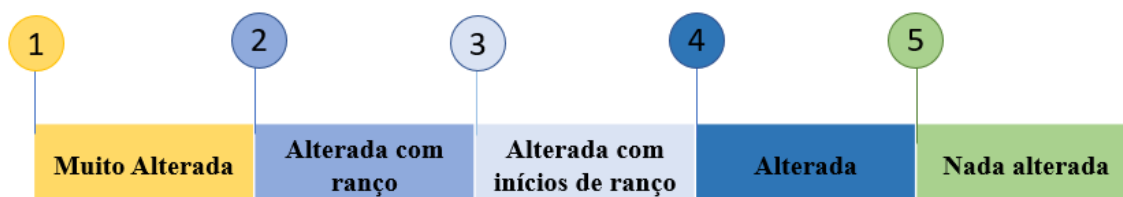


Figura 3.3 - Escala de classificação usada nas provas sensoriais das Maioneses 65% ao longo do tempo de acompanhamento.

A cor é uma das características mais importantes no que diz respeito à aceitação por parte do consumidor. Esta propriedade tanto pode ser analisada de forma subjetiva, isto é, olhando para ela e descrevendo o que se vê, como também de forma objetiva recorrendo a instrumentos de bancada, nomeadamente colorímetros. Estes instrumentos usam o sistema CIELab que é descrito por três eixos: (i) L*- luminosidade (compreendido entre 0 e 100, onde 0 corresponde ao preto absoluto e o branco absoluto a 100), (ii) a*- componente verde/vermelho ((+a*) caracteriza cores vermelhas, enquanto (-a*) apresenta uma tendência para a cor verde), (iii) b*- componente azul/amarelo ((+b*) caracteriza cor amarela, enquanto (-b*) assinalam cores azuis). A variação total da cor das amostras durante o período de armazenamento foi calculada segundo a fórmula $\Delta E = \sqrt{(\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2 + (\Delta L^*)^2}$ [153–155].

Para a medição das amostras utilizou-se um espectrocolorímetro, modelo CR-5 (Konica Minolta), no qual foi colocada uma porção da amostra (cerca de 20mL) no recipiente apropriado. As leituras dos valores L*, a* e b* realizaram-se a todas amostras ao longo dos 3 meses. Estas análises foram efetuadas pelo Laboratório de Qualidade da MG.

4. Apresentação e discussão de resultados

4.1 Análises Físico-Químicas

O conceito *shelf life* (tempo de prateleira) refere-se ao período de tempo desde o momento em que o produto é produzido até o momento em que deve ser consumido ou usado. Vários fatores são usados para determinar o *shelf life* de um produto, uma vez que é importante que este mantenha características como textura, aparência, sabor e qualidade microbiológica ao longo do tempo^[156]. Enquanto as maioneses apresentam um *shelf life* entre 9 e 12 meses, os molhos não emulsionados (Ketchup e Molho 0%) apresentam um *shelf life* entre 12 e 18 meses. Desta forma, e para garantir a integridade dos produtos ao longo do tempo foram realizadas análises físico-químicas, tais como: acidez, cloretos, pH, viscosidade, Brix e consistência.

Atendendo a que a duração do estágio é inferior ao *shelf life* dos produtos testados, optou-se por colocar uma parte das amostras produzidas na câmara climática (ou estufa) para realizar um estudo de *shelf-life* acelerado, e ter uma percepção do comportamento das amostras ao fim de 9 meses. No entanto, e tendo em conta as condições da câmara climática (37°C, 75% humidade e ausência de luz) os resultados são considerados apenas uma aproximação da realidade, sendo necessário compará-los com os resultados obtidos à temperatura ambiente.

Posto isto, e segundo o cálculo definido pela Equação 5, uma amostra que permaneça um mês em câmara climática, equivale a um armazenamento de três meses à temperatura ambiente (em prateleira). Na empresa e por já ter sido estudada a cinética dos produtos em estudo é utilizada a Equação 5. A Equação 5 tem por base a equação de Arrhenius que estima a relação de dependência entre a temperatura e a cinética de oxidação^[146]. Porém, é preciso ter em conta que esta equivalência se trata apenas de uma aproximação.

$$t_{amb} = t_{cc} * 2^{\left(\frac{T_{cc}-T_{amb}}{10}\right)} \quad (5)$$

Onde, t_{amb} é tempo de armazenamento à temperatura ambiente (em prateleira), t_{cc} o tempo de armazenamento em condições aceleradas, T_{cc} a temperatura da câmara climática e T_{amb} a temperatura ambiente.

Graficamente, esta diferença é caracterizada por linhas a cheio (ou preenchidas) e linhas a tracejado, sendo que as linhas a cheio representam as amostras armazenadas à temperatura ambiente, enquanto as linhas a tracejado indicam as amostras armazenadas em câmara climática, simulando os valores ao fim de 6 e 9 meses à temperatura ambiente. O eixo das abcissas é definido como o tempo do *shelf life* das amostras, 9 meses armazenadas em prateleira, isto é, temperatura ambiente.

Para as análises realizadas foram estabelecidos limites, superior e inferior, para uma melhor compreensão dos valores obtidos. Esses limites foram definidos com base nos valores da amostra padrão no mês de produção e nos desvios associados a cada parâmetro (**Tabela 4.1**).

Tabela 4.1 - Definição dos limites de variação aceitáveis associado a cada parâmetro com base nos valores da amostra padrão.

| Amostra padrão | Valor obtido no mês de produção | | | |
|--------------------------------|---------------------------------|----------|-----------|--------------|
| | Acidez | Cloretos | °Brix | Consistência |
| Maionese 65% Sorbato + EDTA | 0,55±0,15 | 1,46±10% | - | - |
| Ketchup + Sorbato | 1,14±0,15 | 1,79±10% | 29,4±7,5% | 9,5±20% |
| Molho 0% + Sorbato | 1,18±0,15 | 1,19±10% | 9,2±7,5% | 11±20% |

4.1.1 Maionese 65%

Acidez e Cloretos

A acidez titulável é um parâmetro que contabiliza o total de ácidos presentes na amostra e é apresentada em percentagem de ácido acético (% ácido acético). O ácido acético funciona como conservante natural na maionese, na inibição do crescimento de microrganismos indesejados. O objetivo da análise deste parâmetro foca-se na avaliação dos valores de acidez ao longo do tempo, no sentido de garantir a qualidade e segurança do produto. Do ponto de vista geral, os valores de acidez não demonstraram oscilações, mantendo-se entre os valores de 0,50 – 0,70 (Figuras I.1, I.2, I.3 e I.4 do **Anexo I**).

Os cloretos são um parâmetro que permite avaliar o teor de sal presente na amostra e é expresso em percentagem de cloreto de sódio (%NaCl). A adição de sal além de melhorar as características da maionese ajudando na função emulsionante da gema do ovo^[3, 25], permite a redução da atividade da água, o que contribui para a inibição do crescimento microbiano^[26, 50, 157]. Os valores de cloretos mantiveram-se dentro dos limites de aceitação estipulados, com oscilação de valores entre 1,30 – 1,70 (Figuras I.7, I.8, I.9 e I.10 do **Anexo I**).

pH

O pH da maionese tem um importante efeito na estrutura da emulsão. De acordo com a literatura^[3], quando o pH está próximo do ponto isoelétrico das proteínas da gema de ovo (pH=3,9), a viscoelasticidade e a estabilidade da maionese estão no ponto mais alto, sendo que processos de destabilização como floculação e coalescência são evitados. Além da importância para a estabilidade da emulsão, o pH característico da maionese é um dos fatores que regula o crescimento de microrganismos. Dessa forma, é importante a monitorização dos valores de pH ao longo do tempo para assegurar a qualidade e segurança do produto.

Os resultados dos ensaios de estabilidade relativos ao pH encontram-se ilustrados na **Tabela 4.2** e nas Figuras I.13 e I.14 do **Anexo I**. Dentro dos resultados obtidos destacam-se os valores de pH das Maioneses 65% VinTamp (**Figura 4.1**) e Maioneses 65% ELAL (**Figura 4.2**).

Tabela 4.2 - Intervalo de valores de pH para as combinações de Maionese 65% ao longo do tempo.

| Intervalo de Valores de pH | | |
|---|---------|------------------|
| Maionese 65% S/conservante | COMB_1 | 3,46 < pH < 3,55 |
| | COMB_2 | 3,48 < pH < 3,67 |
| | COMB_3 | 3,28 < pH < 3,30 |
| Maionese 65% Sorbato de Potássio | COMB_4 | 3,87 < pH < 3,93 |
| | COMB_5 | 3,87 < pH < 3,94 |
| | COMB_6 | 3,68 < pH < 3,96 |
| Maionese 65% VinTamp | COMB_7 | 4,62 < pH < 4,67 |
| | COMB_8 | 4,62 < pH < 4,67 |
| | COMB_9 | 4,62 < pH < 4,67 |
| Maionese 65% ELAL | COMB_10 | 3,05 < pH < 3,24 |
| | COMB_11 | 3,07 < pH < 3,18 |
| | COMB_12 | 3,17 < pH < 3,28 |

Os resultados obtidos para as Maioneses 65% VinTamp estão representados na **Figura 4.1**.

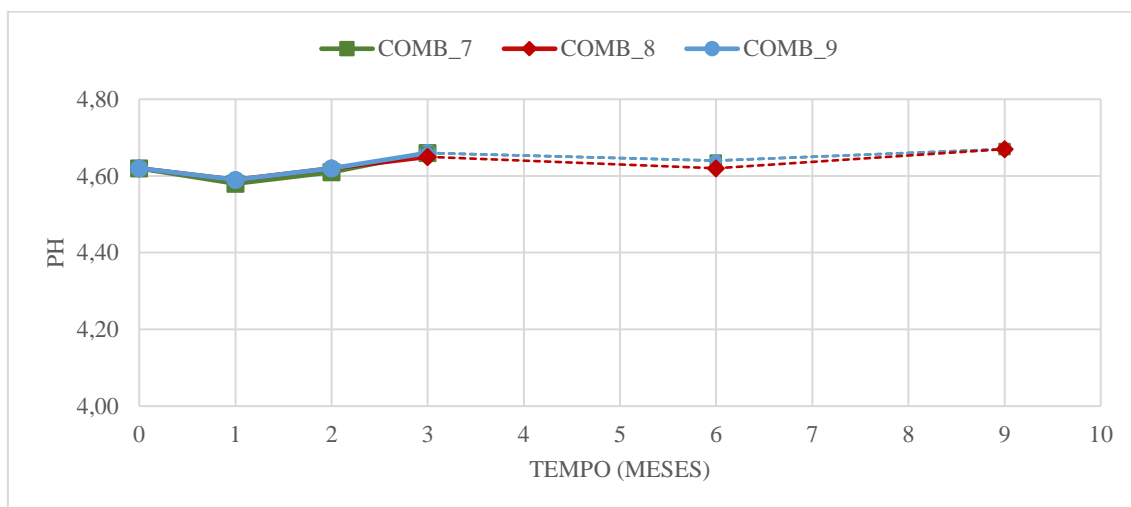


Figura 4.1 - Valores de pH para combinações de Maionese 65% VinTamp ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

O comportamento entre as diferentes combinações é idêntico, sendo que todas as amostras apresentam valores de pH superiores a 4,60, valores estes superiores aos registados para a amostra padrão (Maionese 65% Sorbato de Potássio). Este aumento deve-se ao conservante VinTamp, caracterizado como um vinagre tamponado, com pH compreendido entre $5,6 < \text{pH} < 6,6$. Sendo a maionese um produto tipicamente ácido, ao inserir o VinTamp na matriz, este produzirá um efeito tampão, absorvendo os iões H^+ , elevando conseqüentemente o pH. Ao situar-se fora do intervalo de variação aceitável para este tipo de produto, a probabilidade de surtir efeitos adversos ao nível microbiológico é bastante elevada.

Relativamente às Maioneses 65% ELAL, os resultados encontram-se na **Figura 4.2**. Observa-se que o pH destas amostras é mais baixo comparativamente às restantes maioneses, porém verifica-se um comportamento aproximadamente constante ao longo do tempo para todas as combinações. O ELAL é um conservante à base de ácido láctico com uma gama de pH 2,0 – 4,0. O facto de o próprio conservante apresentar um perfil ácido, promove a diminuição do pH final da amostra.

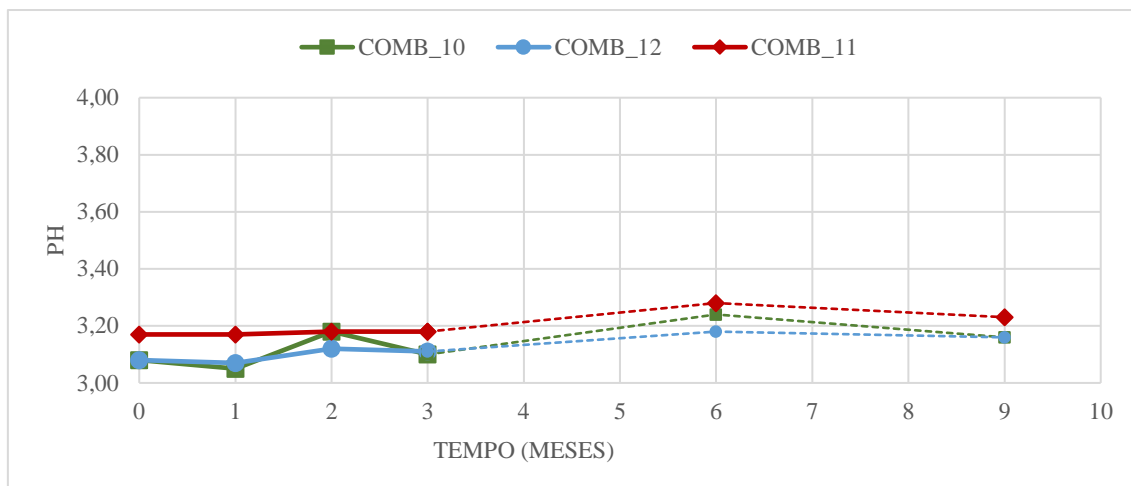


Figura 4.2 - Valores de pH para combinações de Maionese 65% ELAL ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

Posto isto, pode concluir-se que o pH das maioneses testadas se mantém constante ao longo do tempo, mesmo quando submetido a temperaturas mais elevadas (câmara climática), e que depende das características físico químicas do conservante aplicado.

Viscosidade

Sabendo que a maionese é uma emulsão, e que as emulsões são termodinamicamente instáveis, foram realizadas análises de viscosidade às diferentes combinações de maionese com o objetivo de avaliar a estabilidade do produto e a integridade das suas características reológicas ao longo do tempo. Os resultados dos ensaios de estabilidade da viscosidade encontram-se ilustrados na **Tabela 4.3** e nas Figuras I.15 e I.16 do **Anexo I**. Dos resultados obtidos destacam-se os valores de viscosidade das Maioneses 65% Sem conservante (**Figura 4.3**) e Maioneses 65% Sorbato de Potássio (**Figura 4.4**) devido à descida abrupta da viscosidade nos meses iniciais.

Os valores da viscosidade das Maioneses 65% ELAL e VinTamp, exibidos nas Figuras I.15 e I.16 do **Anexo I**, apresentam um comportamento linear ao longo do tempo, também com tendência decrescente nos primeiros meses. Foram as combinações de maionese que mostraram maior estabilidade com valores de viscosidade compreendidos entre os 10400 e 16300 cP.

Na **Figura 4.3** são apresentados os valores da viscosidade das Maioneses 65% sem conservante. De um modo geral, é visível a diminuição da viscosidade nos meses iniciais, o que pode ser justificado pela instabilidade da emulsão. Depois do 3º mês de armazenamento, há uma tendência de estabilização dos valores. No entanto, a COMB_1 é a que apresenta valores de viscosidade mais baixos. De modo a corroborar estes resultados, aconselha-se uma nova produção da

COMB_1, sob as mesmas condições, para averiguar as causas da instabilidade, e se estão relacionadas com o método de produção ou com a estabilidade da emulsão.

Tabela 4.3 - Intervalo de valores de Viscosidade para as combinações de Maionese 65% ao longo do tempo.

| Intervalo de Valores de Viscosidade (cP) | | |
|---|---------|---------------|
| Maionese 65% S/conservante | COMB_1 | 14100 – 10670 |
| | COMB_2 | 20100 – 16000 |
| | COMB_3 | 19200 – 9100 |
| Maionese 65% Sorbato de Potássio | COMB_4 | 13700 – 8933 |
| | COMB_5 | 14000 – 9467 |
| | COMB_6 | 23700 – 8500 |
| Maionese 65% VinTamp | COMB_7 | 13900 – 12670 |
| | COMB_8 | 15200 – 14000 |
| | COMB_9 | 16300 – 14530 |
| Maionese 65% ELAL | COMB_10 | 13700 – 13330 |
| | COMB_11 | 11100 – 11600 |
| | COMB_12 | 14400 – 12930 |

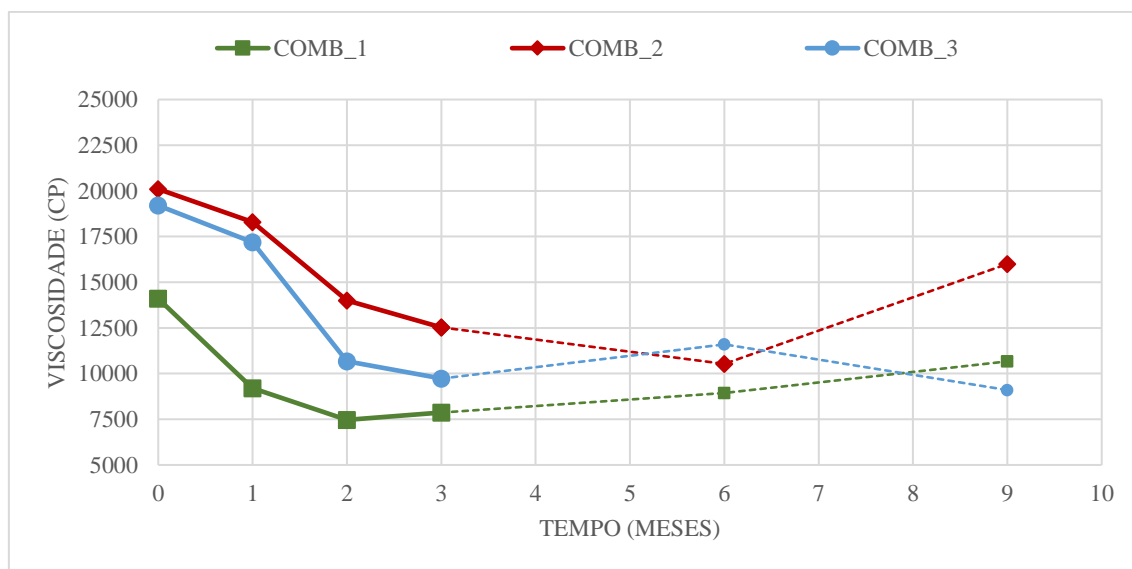


Figura 4.3 - Valores da viscosidade para combinações de Maionese 65% sem conservante ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

Relativamente à **Figura 4.4**, que exibe a evolução da viscosidade para as combinações de Maionese 65% com sorbato de potássio, é evidente a queda acentuada na amostra COMB_6 (ver linha azul, **Figura 4.4**), afirmando a instabilidade da emulsão. É possível verificar que, nos meses seguintes, a viscosidade se manteve constante. Para as COMB_4 e COMB_5, os valores da viscosidade apresentaram um comportamento linear e idêntico ao longo dos 9 meses, com a COMB_4 a apresentar os valores de viscosidade mais baixos.

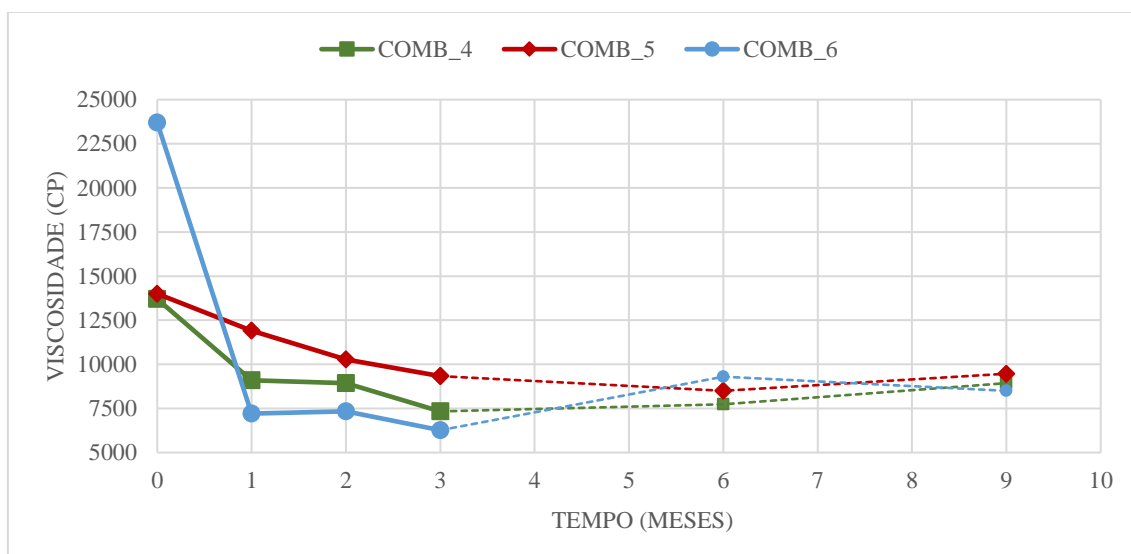


Figura 4.4 - Valores da viscosidade para combinações de Maionese 65% Sorbato ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

A oscilação dos valores de viscosidade nas **Figuras 4.3** e **4.4** pode ser justificada pela homogeneidade e distribuição do tamanho de gotículas de óleo^[13]. Segundo a literatura^[13, 158], o ideal para conferir a estabilidade e viscosidade desejada, baseia-se numa rede compactada de muitas gotículas de pequenas dimensões, sob forma de “favo de mel”, com fortes interações entre si. Quando estas interações enfraquecem, há tendência de aglomeração das gotículas, levando à formação de gotículas de maiores dimensões, porém em menor quantidade. Isto leva a que o produto perca consistência, o que se traduz numa quebra da emulsão. É também referido que à medida que as amostras de maionese envelhecem, a distribuição do tamanho das gotículas de óleo muda, produzindo gotículas de maior dimensão e em menor quantidade, o que proporciona a separação das fases. O armazenamento a temperatura elevadas promove o aumento do movimento *browniano* das gotículas, a diminuição da viscosidade da fase contínua e a solubilização dos tensoativos, o que por conseguinte, contribui para a quebra da emulsão^[3, 10, 159, 160].

De um modo geral, é possível observar uma diminuição da viscosidade ao longo do tempo, para todas as combinações de Maionese 65%, sendo esta mais acentuada nos meses iniciais.

4.1.2 Ketchup e Molho 0%

Acidez, Cloretos e Brix

Para avaliar a acidez e o teor de sal das amostras de Ketchup e Molho 0% ao longo do tempo, seguiu-se o raciocínio descrito no **ponto 4.1.1**. Os resultados da acidez e dos cloretos para as combinações de Ketchup e Molho 0% são apresentados na **Tabela 4.4** e nas Figuras I.5, I.6, I.11 e I.12 do **Anexo I**, . Tal como verificado para as combinações de maionese, os valores de acidez e cloretos para o Ketchup e Molho 0% não sofreram variações significativas ao longo do tempo de acompanhamento.

O °Brix é uma escala numérica de índice de refração, que quantifica o teor de sólidos solúveis presentes numa solução aquosa. A determinação deste parâmetro está dependente da composição do produto a analisar, e se este contém ou não um teor de açúcar considerável^[161]. Por norma, molhos emulsionados como maionese não são passíveis de serem medidos, visto que para além de apresentarem baixo teor de sacarose, a quantidade de óleo presente na matriz torna o produto opaco, interferindo na exposição ao raio de luz. Os resultados obtidos encontram-se expostos na **Tabela 4.4** e nas Figuras I.15 e I.16 do **Anexo I**.

Tabela 4.4 - Intervalo de valores de Acidez , Cloretos e Brix para as combinações de Ketchup e Molho 0% ao longo do tempo.

| | | Acidez | Cloretos | Brix |
|-----------------|-------|-------------|-------------|-------------|
| Ketchup | Ket_1 | 1,14 – 1,23 | 1,79 – 1,81 | 29,0 – 29,7 |
| | Ket_2 | 1,28 – 1,36 | 1,83 – 1,84 | 29,4 – 29,7 |
| | Ket_3 | 1,35 – 1,42 | 1,82 – 1,86 | 29,1 – 29,4 |
| Molho 0% | M1 | 1,18 – 1,27 | 1,19 – 1,22 | 8,5 – 9,2 |
| | M2 | 1,24 – 1,29 | 1,21 – 1,25 | 8,1 – 9,2 |
| | M3 | 1,27 – 1,42 | 1,22 – 1,35 | 8,7 – 9,1 |

pH

Nas Figuras 4.5 e 4.6 verifica-se que o comportamento das diferentes combinações de Ketchup e Molho 0%, respetivamente, está de acordo com as características dos conservantes aplicados.

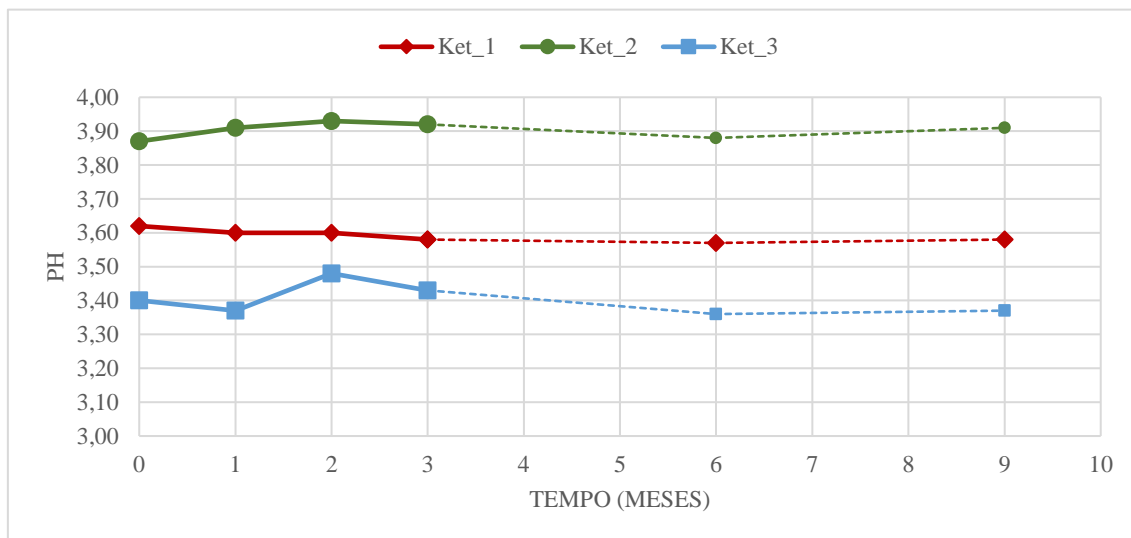


Figura 4.5 - Valores de pH para combinações Ketchup ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

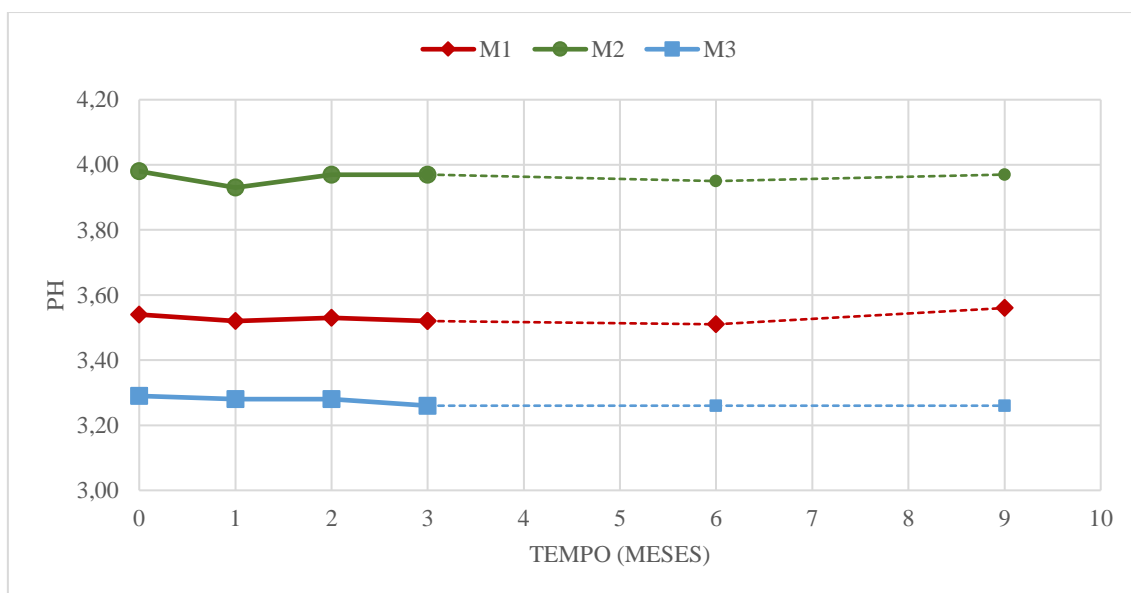


Figura 4.6 - Valores de pH para combinações Molho 0% ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

As amostras Ket_2 e M2, representadas pelos pontos redondos a cheio, apresentam os valores de pH mais altos, devido ao efeito tampão causado pela adição do VinTamp, descrito como vinagre tamponado. As combinações Ket_1 e M1 (ver linha vermelha, **Figura 4.5 e 4.6**), e as combinações Ket_3 e M3 (ver linha azul), estão também em concordância com as características do conservante testado. As amostras com ELAL (Ket_3 e M3) detêm os valores de pH mais baixo, uma vez que o ELAL é um conservante à base de ácido láctico e com uma gama de pH compreendida entre $2 < \text{pH} < 4$.

Consistência

A consistência é um dos parâmetros mais importantes na determinação da qualidade global do produto e aceitabilidade por parte do consumidor. É dada pela distância percorrida (cm) pelo produto ao fim de 30 segundos. Os resultados obtidos para este parâmetro encontram-se representados nas **Figuras 4.7 e 4.8**.

A **Figura 4.7** corresponde aos valores de consistência das amostras de Ketchup. É possível observar que para todas as combinações, os valores de consistência encontram-se dentro dos limites definidos. As combinações Ket_2 e Ket_3 (linha verde e azul, **Figura 4.7**) apresentam comportamentos semelhantes ao longo do tempo. Quanto à combinação Ket_1, considera-se que houve perda de consistência no último mês de análise (linha vermelho, **Figura 4.7**).

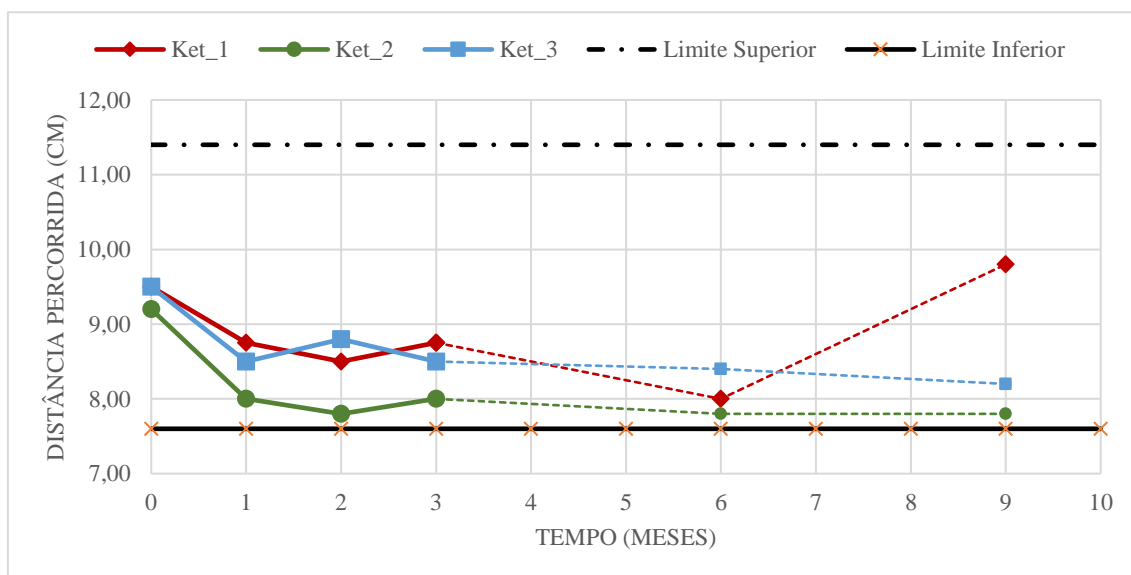


Figura 4.7 - Valores de consistência para combinações Ketchup ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

Relativamente às combinações do Molho 0%, representadas na **Figura 4.8**, é visível um aumento na distância percorrida pelo molho ao longo do tempo, o que significa que as amostras de Molho 0% foram perdendo consistência. A amostra M1 perdeu 32% da consistência ao longo tempo, enquanto a M2 perdeu 18% e a M3 cerca de 29%. O comportamento entre as diferentes combinações é semelhante, sendo a M3 a amostra que detém valores mais altos, com excedente no último mês.

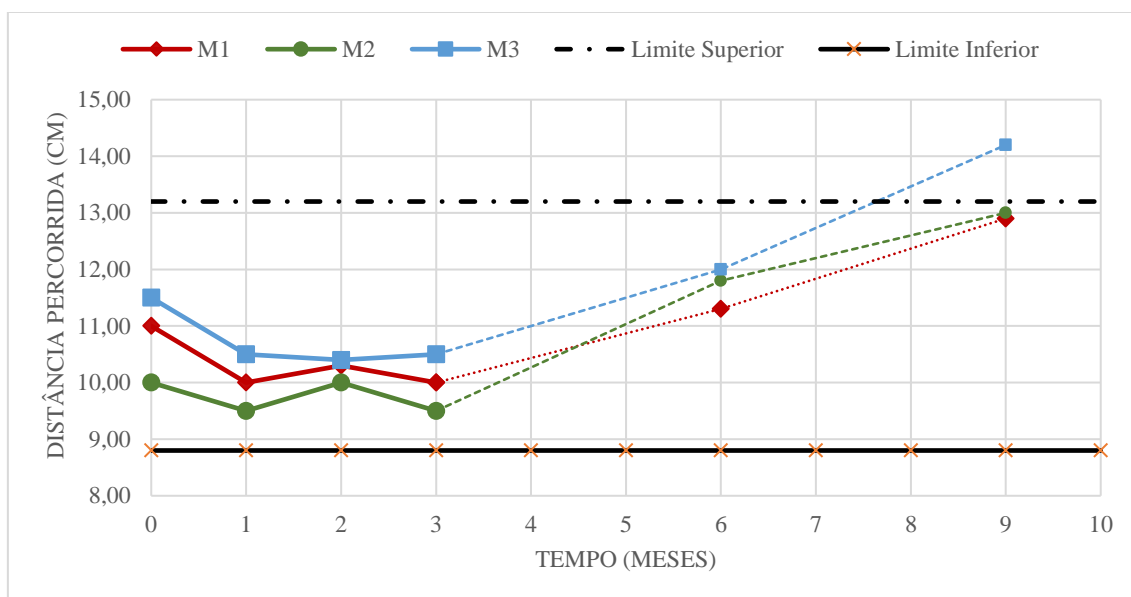


Figura 4.8 - Valores de consistência para combinações Molho 0% ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

4.2 Estudo da eficácia dos antioxidantes

O objetivo deste capítulo consiste no estudo da eficácia dos antioxidantes nas diferentes combinações de maioneses, de modo a averiguar qual dos antioxidantes naturais pode ser considerado um potencial substituto do EDTA.

O elevado teor de óleo constituinte da maionese (65%) torna-a altamente suscetível à oxidação de lipídica, sendo considerada uma das principais causas da deterioração da qualidade da maionese. Durante a oxidação, as estruturas dos ácidos gordos sofrem algumas alterações que levam à formação de duas classes principais de compostos: a primeira classe são os produtos de oxidação primários (hidroperóxidos) que podem decompor-se para dar lugar à segunda classe de compostos (produtos de oxidação voláteis), como aldeídos, cetonas e álcoois que levam ao desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis.

Para o estudo da eficácia dos antioxidantes utilizou-se o óleo extraído das maioneses. De acordo com o **ponto 3.2.7**, para otimizar a quantidade de sobrenadante extraído realizaram-se ensaios preliminares. Para isso parâmetros como tempo de congelação, tempo de centrifugação e velocidade de centrifugação foram manipulados. As **Figuras 4.9, 4.10 e 4.11** apresentam os resultados obtidos dos três ensaios realizados.

Os resultados obtidos pelo ensaio nº1 revelaram que 24h de tempo de congelação e 4200 rpm não eram suficientes para promover a quebra da emulsão, pelo que não foi possível extração de sobrenadante (**Figura 4.9**).

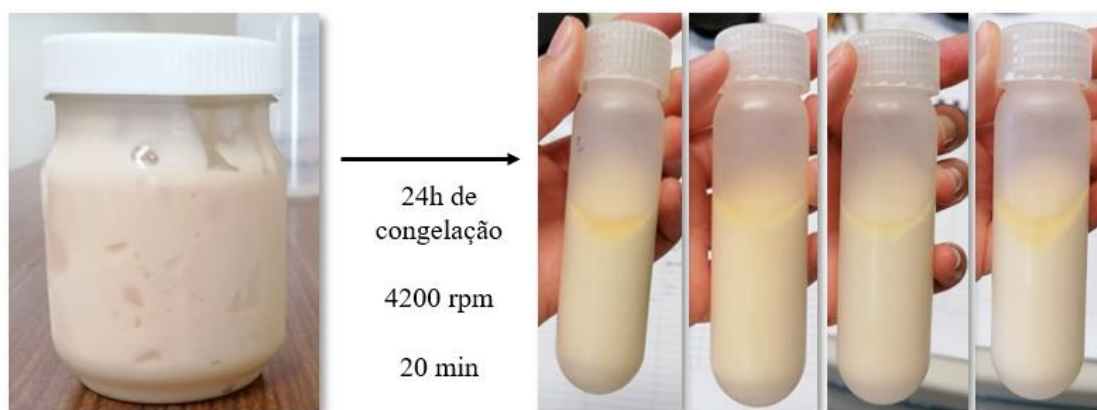


Figura 4.9 - Resultados do ensaio nº1 para validação do método de extração da fase lipídica.

Analisando a **Figura 4.10**, relativa ao ensaio nº2, é notória uma melhoria na extração da fase lipídica comparativamente ao ensaio anterior. Tanto é visível a separação das fases, como foi possível a extração de uma pequena quantidade óleo.

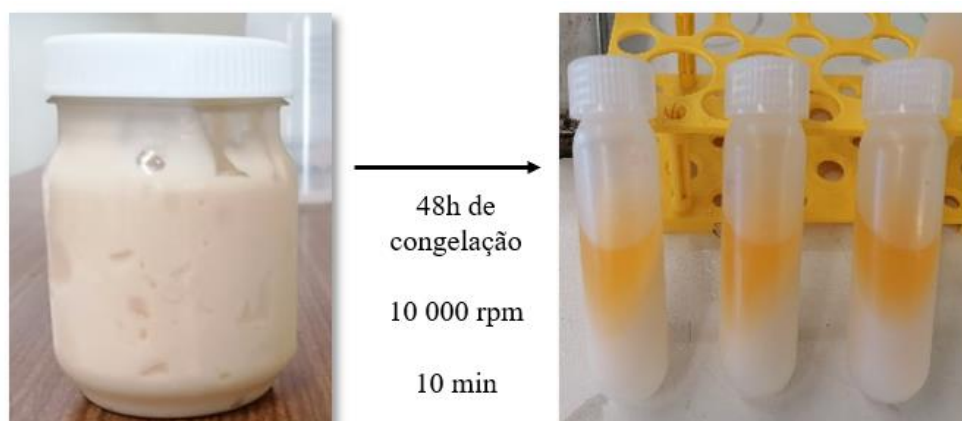


Figura 4.10 - Resultados do ensaio nº2 para validação do método de extração da fase lipídica.

Os resultados obtidos pelo ensaio nº3 revelaram-se os mais promissores. Pela **Figura 4.11** verifica-se que as condições subjacentes a este ensaio permitiram a quebra da emulsão e obtenção da quantidade de sobrenadante desejada. Foram estas as condições aplicadas no decorrer do trabalho.



Figura 4.11 - Resultados do ensaio nº3 para validação do método de extração da fase lipídica.

O valor do Índice de Peróxidos (IP) foi determinado com base na medição da concentração de hidroperóxidos e é expresso em miliequivalentes de oxigénio por kg de óleo (meqO_2/kg). As alterações no valor de índice de peróxidos são apresentadas nas **Figuras 4.12, 4.15, 4.18 e 4.21**. De acordo com o Decreto-Lei nº 106/2005 de 29 de junho, o limite legal para um óleo ser considerado bom, ou seja, sem indícios de oxidação é de $10 \text{ meqO}_2/\text{kg}$, sendo que acima deste valor considera-se o óleo não conforme. Este limite encontra-se representado com linha a cheio de cor preta.

A medição do IP baseia-se numa titulação iodométrica cujo titulante usado é tiosulfato de sódio (TS). De acordo com o método seguido, a concentração de TS ([TS]) varia consoante o índice de peróxidos esperado. Para $\text{IP} > 20 \text{ meqO}_2/\text{kg}$, deve usar-se uma concentração de titulante de $0,1 \text{ M}$, enquanto para $\text{IP} < 20 \text{ meqO}_2/\text{kg}$ a concentração deve ser $0,01\text{M}$. Os ensaios realizaram-se segundo este princípio. No entanto, para as amostras em que se utilizou a $[\text{TS}] = 0,1\text{M}$, o volume de titulante gasto era inferior a $0,5\text{mL}$, e por isso o procedimento teve que ser repetido, porque segundo o método oficial Cd 8b-90 (2003), para titulações cujo volume de titulante seja inferior a $0,5 \text{ mL}$, o procedimento deve ser repetido com uma concentração de tiosulfato de sódio de $0,01\text{M}$.

No decorrer da oxidação lipídica, um decréscimo no nível de peróxidos não constitui, propriamente, uma garantia de boa estabilidade oxidativa, uma vez que os hidroperóxidos tendem em decompor-se em produtos de oxidação secundários, nomeadamente aldeídos insaturados, moléculas responsáveis pelos odores e sabores característicos do ranço.

A determinação do índice de p-anisidina (IpA) é um método que permite identificar a presença de aldeídos insaturados (α e β -alcenais) em óleos. Este ensaio consiste na reação entre aldeídos insaturados e p-anisidina em meio acético, dando origem a um complexo amarelo que absorve luz no comprimento de onda de 350 nm. Para um óleo ser considerado bom, ou seja, não rançoso, a IUPAC estabeleceu que este deve apresentar um valor de IpA inferior a 10 [109, 150, 162, 163]. As alterações nos valores de IpA devido à aplicação de diferentes antioxidantes estão representadas nas **Figuras 4.13, 4.16, 4.19 e 4.22**.

4.2.1 Combinações Maionese 65% sem conservante

A **Figura 4.12** apresenta os resultados do índice de peróxidos (IP) para as combinações de Maionese 65% sem conservante. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos após 2 e 3 meses em câmara climática, o que equivale a 6 e 9 meses à temperatura ambiente, respetivamente.

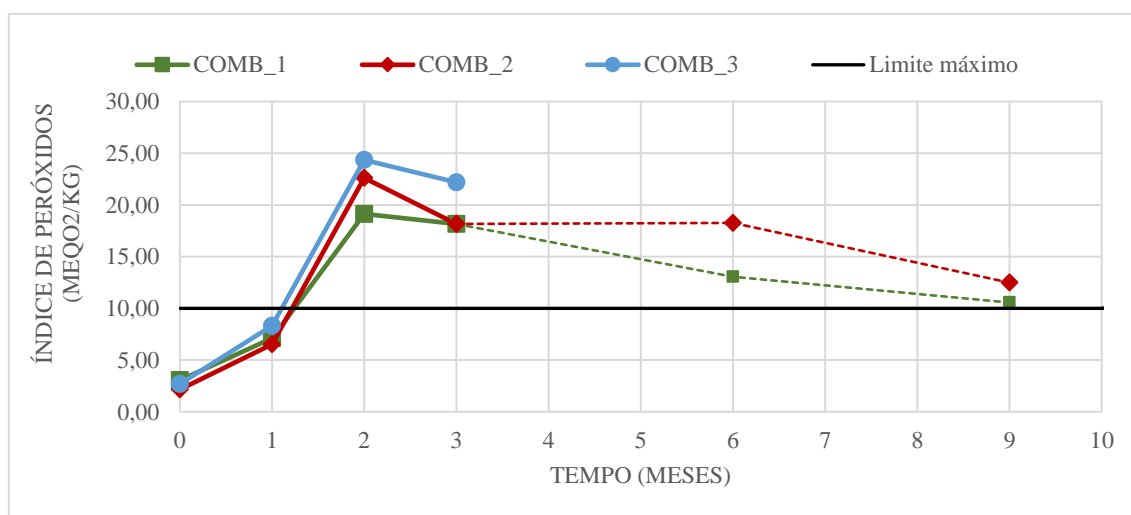


Figura 4.12 - Representação gráfica dos valores de Índice de Peróxidos obtidos para o estudo dos antioxidantes nas Maioneses 65% sem conservante. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

É possível analisar que as amostras COMB_3 (ver linha azul, **Figura 4.12**) exibem valores de IP mais altos comparativamente às COMB_1 e COMB_2. Por lapso, no momento de

colocar as amostras na câmara climática, as amostras COMB_3 não foram contabilizadas, o que justifica a ausência dos valores a tracejado.

Entre as combinações de Maionese 65% sem conservante, a que apresentou valores de IP mais baixos foi a COMB_1 (ver linha verde, **Figura 4.12**). O estudo da eficácia de antioxidantes é realizado com o óleo extraído da maionese, sendo por isso necessário destabilizar a emulsão para que ocorra a separação de fases, como referido no **Capítulo 3**. Porém, e mesmo após a otimização do processo de extração, a quantidade de sobrenadante obtido das amostras de COMB_1, era inferior às restantes. Uma possível justificação para este fenómeno reside no facto da emulsão não estar suficientemente instável para ocorrer a separação de fases. Desta forma, sugere-se a realização de mais ensaios, entre os quais novos testes de otimização, para perceber o que está a interferir no processo de destabilização (por exemplo, o tempo e temperatura de congelação).

É visível o aumento no valor do índice de peróxidos do mês 0 ao mês 2 para todas as amostras de Maionese 65% sem conservante, o que confirma a ocorrência de oxidação lipídica. A partir do 3º mês de prateleira, os valores de IP começaram a diminuir, o que é explicado pelo aumento das reações em cadeia, comuns da fase de propagação. A diminuição do valor IP não significa a diminuição da oxidação lipídica, mas indica o início da decomposição dos hidroperóxidos em compostos de oxidação secundários.

De acordo com a literatura^[164], para compreender melhor o comportamento dos antioxidantes durante todo o processo da oxidação, foi recomendado o cálculo do valor do índice de p-anisidina para identificar a formação de compostos secundários. Os resultados obtidos para este parâmetro são apresentados na **Figura 4.13**.

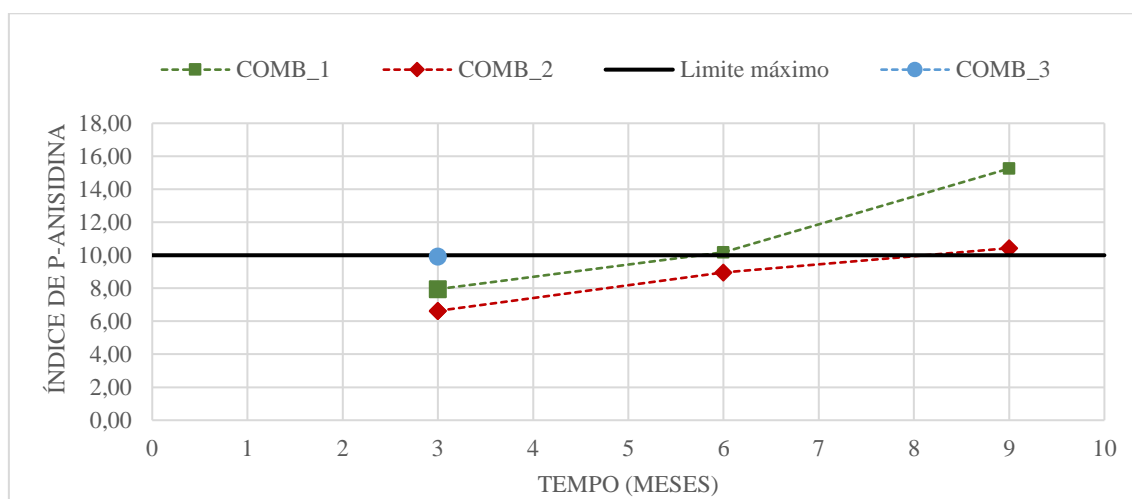


Figura 4.13 - Representação gráfica dos valores de Índice de p-Anisidina obtidos para o estudo dos antioxidantes nas Maioneses 65% sem conservante. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

Pelos resultados obtidos verifica-se que a COMB_2 (ver linha vermelha, **Figura 4.13**), embora exiba valores de IP ligeiramente mais elevados que a COMB_1, apresenta valores de índice de p-anisidina (IpA) mais baixos.

O antioxidante natural XTRA consiste numa mistura de extratos de espinafre e extratos de Alecrim. Neste caso, mostrou maior eficácia do que o EDTA, caracterizado pelo elevado potencial de agente quelante no impedir a decomposição dos hidroperóxidos em compostos de oxidação secundários.

O valor do IpA da COMB_3 é dado pelo ponto azul isolado no terceiro mês (ver **Figura 4.13**), uma vez que as amostras não foram colocadas em câmara climática, pelo que não existem dados para o acompanhamento dos 9 meses para esta amostra.

De forma a conjugar os dados de oxidação primária e secundária, calculou-se o valor total da oxidação (TOTOX) de acordo com a equação (6) descrita no **ponto 3.2.9**. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados na **Figura 4.14**.

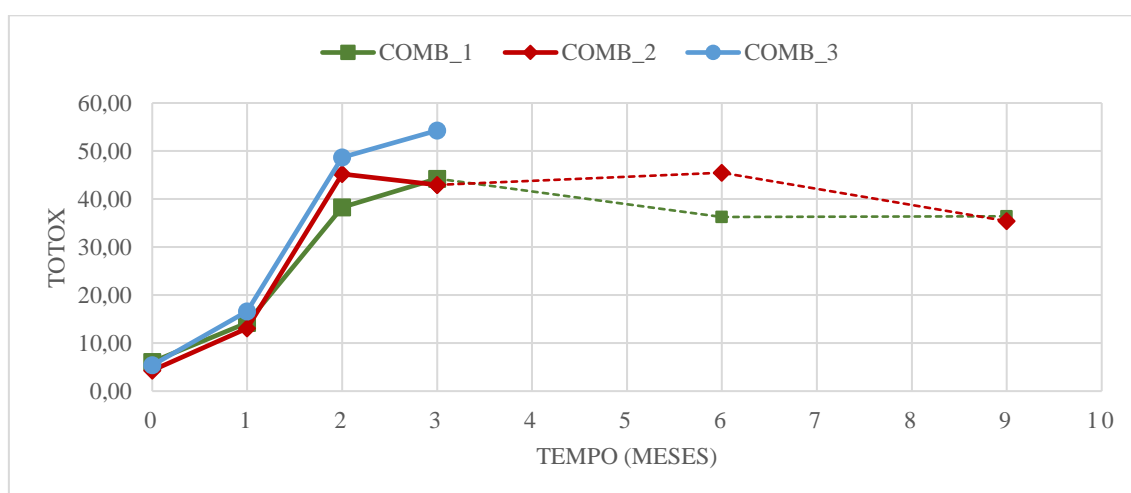


Figura 4.14 - Representação gráfica dos valores de TOTOX obtidos para o estudo dos antioxidantes nas Maioneses 65% sem conservante. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

A partir da **Figura 4.14**, é possível concluir que o EDTA (antioxidante da COMB_1) e XTRA (antioxidante da COMB_2) apresentam eficácias muito parecidas, sendo por isso o XTRA considerado um potencial substituto do EDTA. Apesar da COMB_2 apresentar valores de IpA ligeiramente mais baixos do que a COMB_1, num panorama geral sobre o estado oxidativo das Maioneses 65% sem conservante, o EDTA foi o antioxidante que mostrou maior eficácia ao longo do tempo.

4.2.2 Combinações Maionese 65% Sorbato de potássio

A **Figura 4.15** apresenta os resultados do índice de peróxidos (IP) para as combinações de Maionese 65% Sorbato. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos após 2 e 3 meses em câmara climática, o que equivale a 6 e 9 meses à temperatura ambiente, respetivamente.

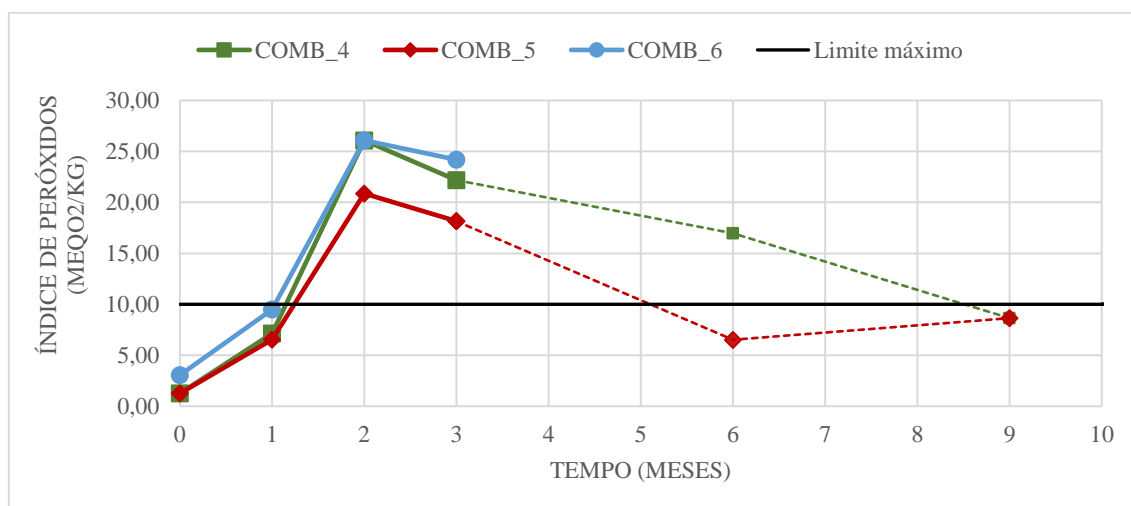


Figura 4.15 Representação gráfica dos valores de Índice de Peróxidos obtidos no estudo dos antioxidantes nas Maioneses 65% Sorbato de potássio. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

Na **Figura 4.15** observa-se que no segundo mês de prateleira, os valores de IP estão acima dos 10 meqO₂/kg admitidos para óleos. A COMB_6 apresenta os valores de IP mais elevados relativamente aos outros antioxidantes testados, comportamento este semelhante ao registado na **Figura 4.12**. Tal como a COMB_3, as amostras COMB_6 não foram contabilizadas, o que justifica a ausência dos valores a tracejado.

O comportamento da COMB_4 e COMB_5 é semelhante, sendo que a COMB_5 (antioxidante XTRA) apresenta valores de IP mais baixos ao longo do tempo, podendo este ser um sinal de que XTRA é um potencial substituto do EDTA.

Também na **Figura 4.15** os valores de IP tendem a descer no terceiro mês, sinal de que os produtos primários de oxidação estão a decompor-se em produtos secundários, responsáveis pelos *off-flavours*.

Para avaliar a eficácia dos antioxidantes no desenvolvimento dos produtos secundários, apresenta-se na **Figura 4.16** os resultados obtidos para o Índice de p-Anisidina.

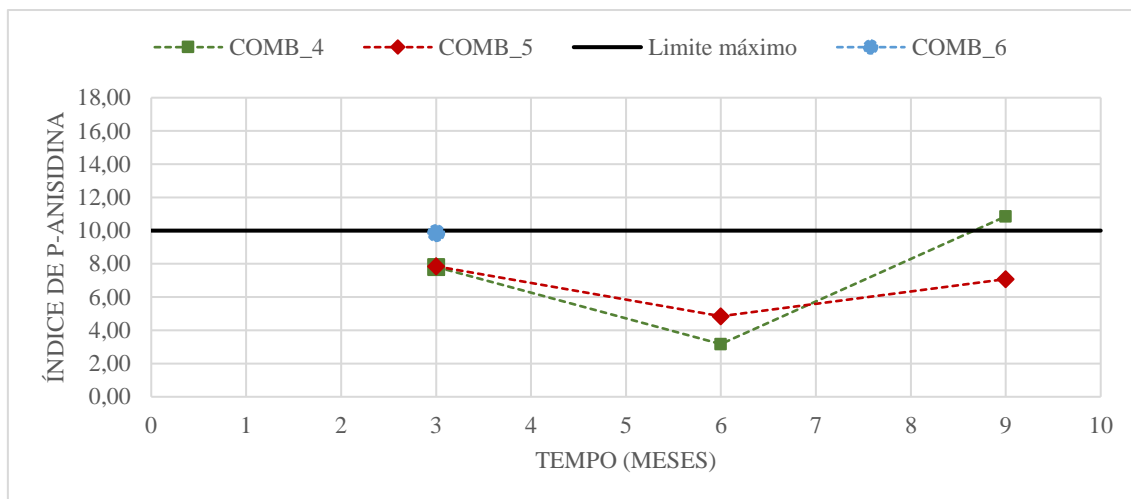


Figura 4.16 - Representação gráfica dos valores de Índice de p-Anisidina no estudo dos antioxidantes nas Maioneses 65% Sorbato de potássio. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

Pela **Figura 4.16** verifica-se a COMB_5 (ver linha vermelha) apresenta um comportamento mais uniforme ao longo do tempo comparativamente com a COMB_4, que apresenta um valor de IpA acima do limite estipulado pela IUPAC no último mês. Isto significa que o XTRA (antioxidante da COMB_5) foi um antioxidante eficaz na captação de metais, isto é, exerceu a sua função como agente quelante.

A COMB_6, identificada pelo ponto azul (ver **Figura 4.16**), refere-se ao valor de IpA no 3º mês de prateleira, onde foi notória uma descida no valor de índice de peróxidos (**Figura 4.15**). O facto destas amostras não terem sido colocadas em câmara climática, impossibilita o acompanhamento dos 9 meses.

Contemplando o panorama geral da oxidação lipídica nas combinações de Maionese 65% Sorbato, e tendo presente os valores de TOTOX apresentados na **Figura 4.17**, conclui-se que as COMB_5 foram as maioneses que exibiram melhor comportamento ao longo do tempo, o que permite afirmar a eficácia deste antioxidante.

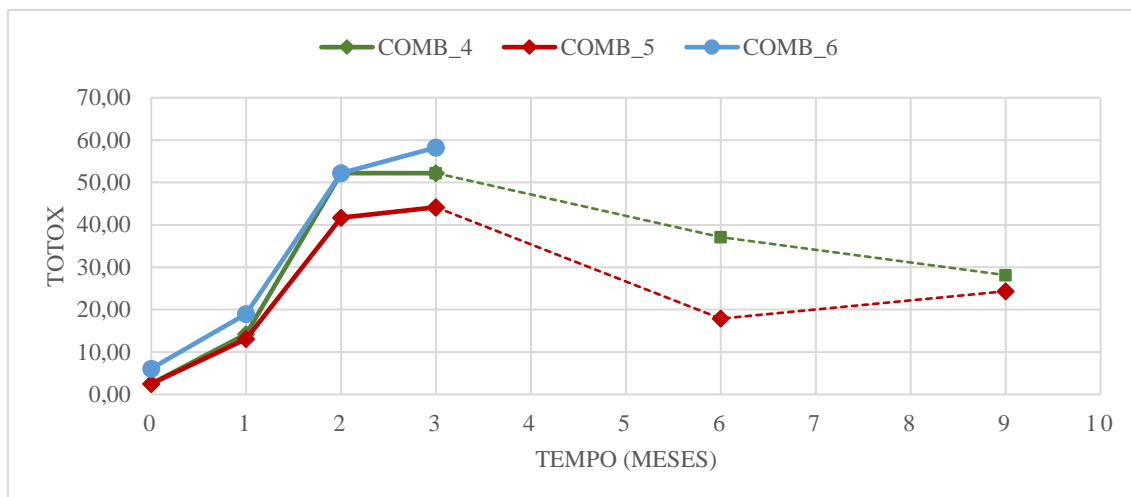


Figura 4.17 - Representação gráfica dos valores de TOTOX obtidos para o estudo dos antioxidantes nas Maionese 65% Sorbato de potássio. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

4.2.3 Combinações Maionese 65% VinTamp

O estudo da eficácia dos antioxidantes para as combinações de Maionese 65% VinTamp encontra-se representado na **Figura 4.18**. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos após 2 e 3 meses em câmara climática, o que equivale a 6 e 9 meses à temperatura ambiente, respetivamente.

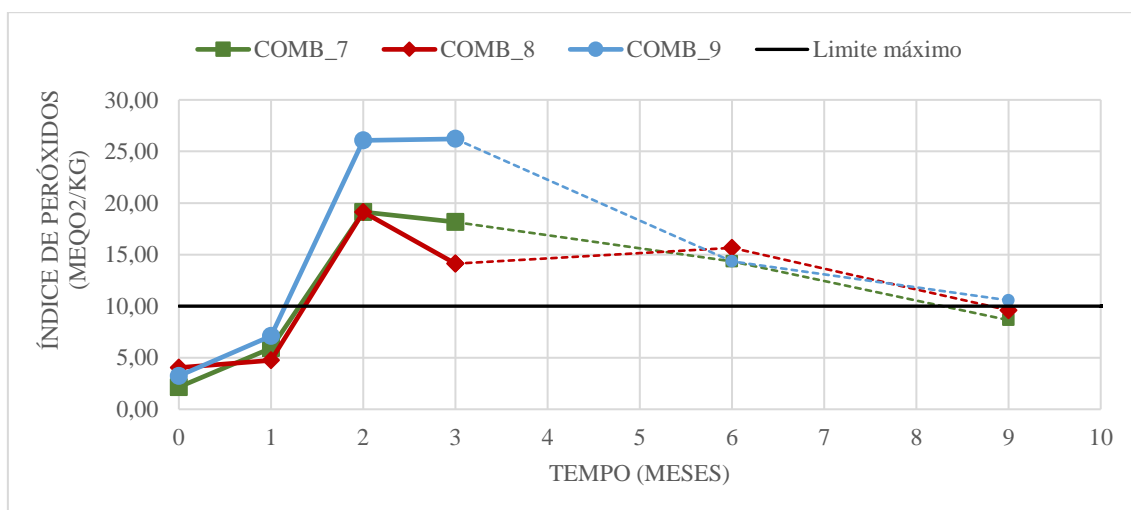


Figura 4.18 - Representação gráfica dos valores de Índice de Peróxidos no estudo dos antioxidantes nas Maionese 65% VinTamp. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

Observando a **Figura 4.18**, verifica-se que as amostras COMB_9 são as que apresentam valores de IP mais elevados ao longo do tempo. Além disso, foi a combinação de Maionese 65% que não apresentou um decréscimo dos valores de IP no 3º mês de prateleira, contrariamente às restantes maioneses, o que significa que os hidroperóxidos ainda não entraram na fase de decomposição.

A eficácia dos antioxidantes XTRA e EDTA (COMB_7 e COMB_8, respetivamente) é idêntica nos primeiros meses. Porém, a queda dos valores de IP no 3º mês de prateleira para a COMB_8 é mais acentuada do que para a COMB_7.

Os hidroperóxidos presentes no óleo oxidado são intermediários transitórios que se decompõem em vários compostos, como aldeídos, cetonas, ácidos, entre outros. Os produtos da oxidação primários são incolores e não conferem odor/sabor, enquanto os produtos da oxidação secundários promovem um odor característico, normalmente associado ao ranço.

Os resultados obtidos do Índice de p-Anisidina para o estudo da eficácia dos antioxidantes nas Maioneses 65% VinTamp encontram-se representados na **Figura 4.19**.

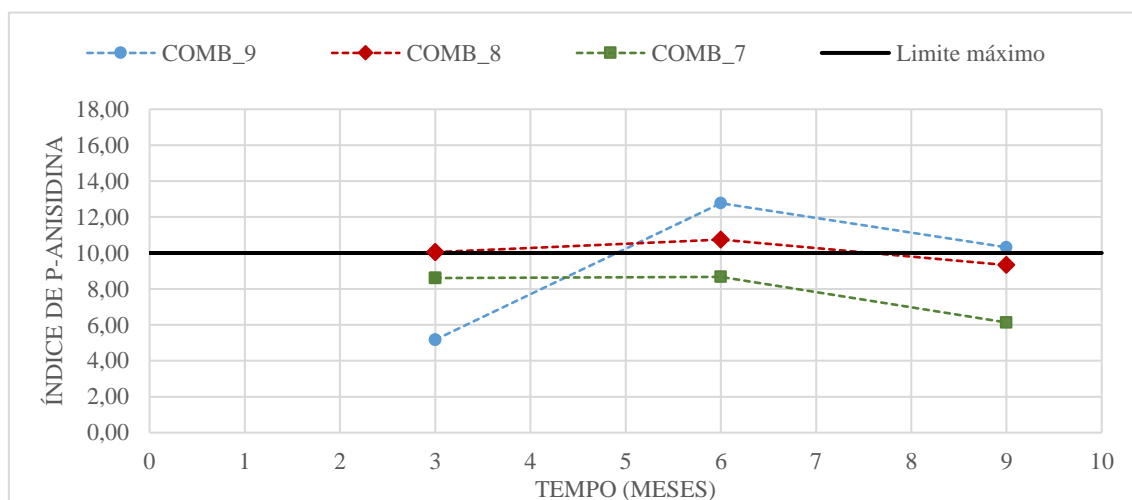


Figura 4.19 - Representação gráfica dos valores de Índice de p-Anisidina no estudo dos antioxidantes nas Maioneses 65% VinTamp. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

Ao interpretar os dados fornecidos pela **Figura 4.19**, é possível aferir que o EDTA (antioxidante do COMB_7) foi o antioxidante que demonstrou maior eficácia nesta fase da oxidação (ver linha verde tracejado). A eficácia do EDTA advém da sua capacidade de quelar iões metálicos, entre eles o ferro, proveniente da gema do ovo localizada na interface óleo-água da maionese^[122]. Como referido no **Subcapítulo 2.5**, referente à oxidação lipídica, os metais de transição são um dos fatores que influencia a cinética da reação de degradação por eliminação do átomo de

hidrogénio e consequente decomposição do peróxido, o que resulta na formação de radicais livres. O EDTA, por ter a capacidade de quelar os iões metálicos, quebra o ciclo reacional da formação de radicais livres, e, por conseguinte, não há formação de compostos secundários.

Relativamente à COMB_8 (ver linha vermelha, **Figura 4.19**), apresenta um comportamento semelhante à COMB_7, no entanto revela valores de IpA ligeiramente mais elevados. O valor de IpA retirado da amostra ao fim de 2 meses em estufa ultrapassa o valor limite máximo associado ao IpA para óleos, embora esse excedente seja pouco significativo.

No caso da COMB_9 (ver linha azul tracejado, **Figura 4.19**), foi a combinação onde o antioxidante testado revelou menor eficácia quanto à formação de produtos secundários. Uma das possíveis razões associadas a este fenómeno prende-se no facto do extrato de Alecrim apresentar melhor eficácia enquanto antioxidante primário do que antioxidante secundário. De acordo com a literatura^[93, 135, 136, 138, 165], a atividade antioxidante do extrato de Alecrim deve-se à presença de compostos fenólicos, nomeadamente ácido carnósico e carnosol, responsáveis por 90% da atividade antioxidante deste extrato. A ação destes compostos ativos relaciona-se com a captura de radicais livres e eliminação do átomo de hidrogénio do radical lipídico, levando a que o extrato de Alecrim funcione maioritariamente como antioxidante primário. Após a criação de hidroperóxidos, o carnosol e ácido carnósico têm pouca eficácia a impedir a sua decomposição em produtos de oxidação secundários. Contudo, existem estudos que relatam que a sua função como agente quelante está interligada com a sua estrutura química, onde os grupos hidroxilo (-OH), situados no ácido carnósico e nas moléculas de carnosol, têm a capacidade de quelar iões metálicos pró-oxidantes e, portanto, ajudam a retardar a oxidação lipídica por meio de um mecanismo secundário.

De forma a conjugar os dados obtidos da eficácia dos antioxidantes na oxidação primária e secundária, calculou-se o valor de TOTOX para as diferentes combinações de Maionese 65%. Os valores de TOTOX, exibidos na **Figura 4.20**, consolidam os resultados obtidos anteriormente, sendo os antioxidantes EDTA e XTRA (antioxidantes da COMB_7 e COMB_8, respetivamente) considerados os mais eficazes no processo da oxidação lipídica.

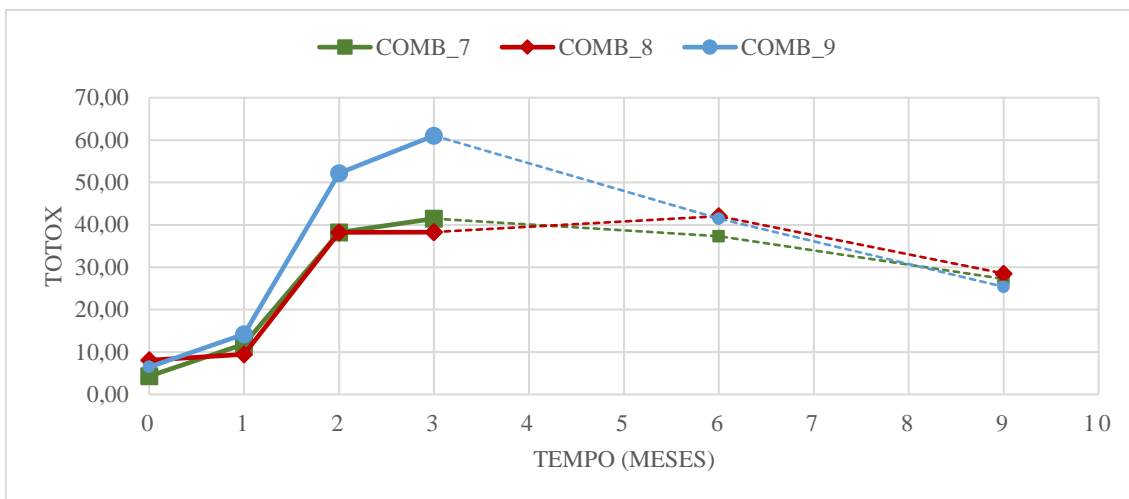


Figura 4.20 - Representação gráfica dos valores de TOTOX obtidos para o estudo dos antioxidantes nas Maioneses 65% VinTamp. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

4.2.4 Combinações Maionese 65% ELAL

A **Figura 4.21** apresenta os resultados do índice de peróxidos (IP) para as combinações de Maionese 65% ELAL. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos após 2 e 3 meses em câmara climática, o que equivale a 6 e 9 meses à temperatura ambiente, respetivamente.

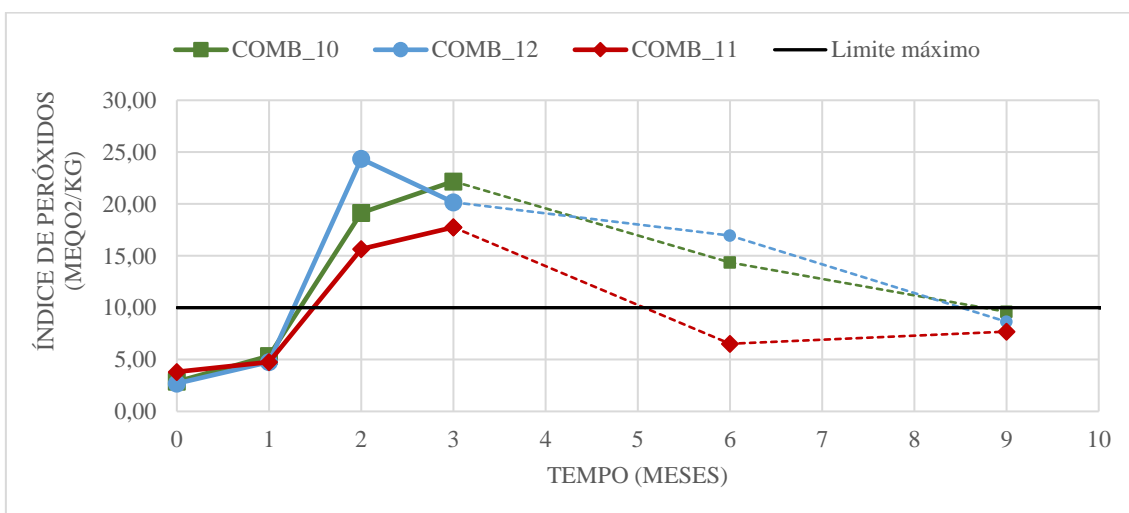


Figura 4.21 - Representação gráfica dos valores de Índice de Peróxidos no estudo dos antioxidantes nas Maioneses 65% ELAL. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

A **Figura 4.21** permite aferir que a COMB_11 foi a que apresentou valores de IP mais baixos (ver linha a vermelho). O cenário de dificuldade na obtenção de sobrenadante, verificado para a COMB_5, voltou a repetir-se para a COMB_11. Apesar de ter sido possível a extração do óleo, a quantidade obtida era muito reduzida comparativamente a todas as outras maioneses. Uma possível justificação para este fenómeno reside no facto da emulsão não estar suficientemente instável para ocorrer a separação de fases esperada, sendo que isto pode estar relacionado com a interação do conservante e antioxidante com os restantes ingredientes da matriz. Desta forma, sugere-se a realização de mais ensaios, entre eles novos testes de otimização, para perceber o que está a interferir no processo de destabilização (por exemplo, o tempo de congelação).

Relativamente à COMB_10 apresenta valores de IP ligeiramente superiores aos registados para a COMB_11. Observa-se ainda que, para estas amostras de maionese, o IP continua em crescimento, o que indica que os hidroperóxidos ainda não se encontram em decomposição.

A COMB_12 é a que detém valores de IP mais elevados, sendo também a combinação que apresenta o decréscimo no 3º mês de prateleira. Comparativamente aos outros antioxidantes, o Extrato de Alecrim (antioxidante da COMB_12) parece ser o que tem menor efeito no retardar da oxidação.

De forma de avaliar a eficácia dos antioxidantes na inibição da formação de compostos secundários recorreu-se ao Índice de p-Anisidina, e os resultados encontram-se expostos na **Figura 4.22**.

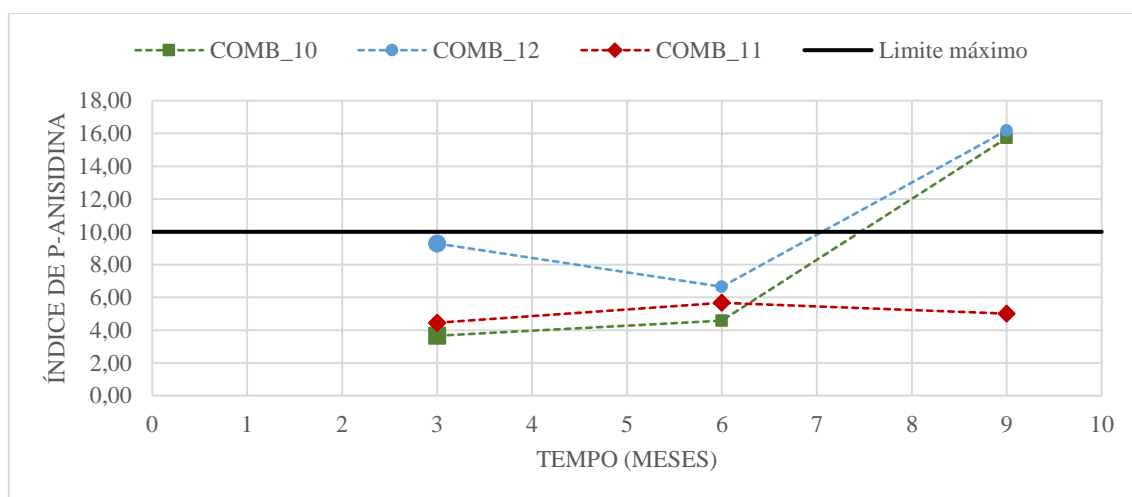


Figura 4.22 - Representação gráfica dos valores de Índice de p-Anisidina no estudo dos antioxidantes nas Maioneses 65% ELAL. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

Entre os antioxidantes testados, o que parece controlar melhor a formação de compostos secundários é o XTRA (antioxidante da COMB_11), exibindo um comportamento constante ao longo do tempo. Uma possível justificação reside no potencial efeito sinérgico conferido pela mistura de extrato de espinafre e extrato de alecrim, permitindo que este atue como antioxidante primário, na eliminação de átomos de hidrogénio e na captura de radicais livres, e como antioxidante secundário, sob forma de agente quelante.

Apesar da amostra não ter revelado uma descida de IP no 3º mês, optou-se por determinar na mesma o IpA sob forma de averiguar existência de algum erro associado à medição do IP devido à dificuldade na obtenção do sobrenadante. Visto que houve registo de um valor de IpA, embora baixo, assume-se que exista algum erro associado. Posto isto, sugere-se a repetição das análises para corroborar os resultados obtidos, tanto para o IP como para o IpA.

Quanto à COMB_12, os valores de IpA encontram-se dentro do esperado e sempre superiores às restantes combinações de maionese. Relativamente à COMB_10, apesar do gráfico do IP não revelar descida nos valores, apresentam valores baixos de IpA. Para corroborar os resultados, as análises do índice de peróxidos devem ser repetidas, uma vez que a probabilidade de erro no procedimento experimental para a medição do índice de peróxidos é superior ao da avaliação do IpA, pois existem mais fatores externos a influenciar.

Por forma a consolidar os resultados obtidos para o estudo da eficácia dos antioxidantes, em ambas as fases da oxidação, calculou-se o TOTOX e os resultados são apresentados na **Figura 4.23**.

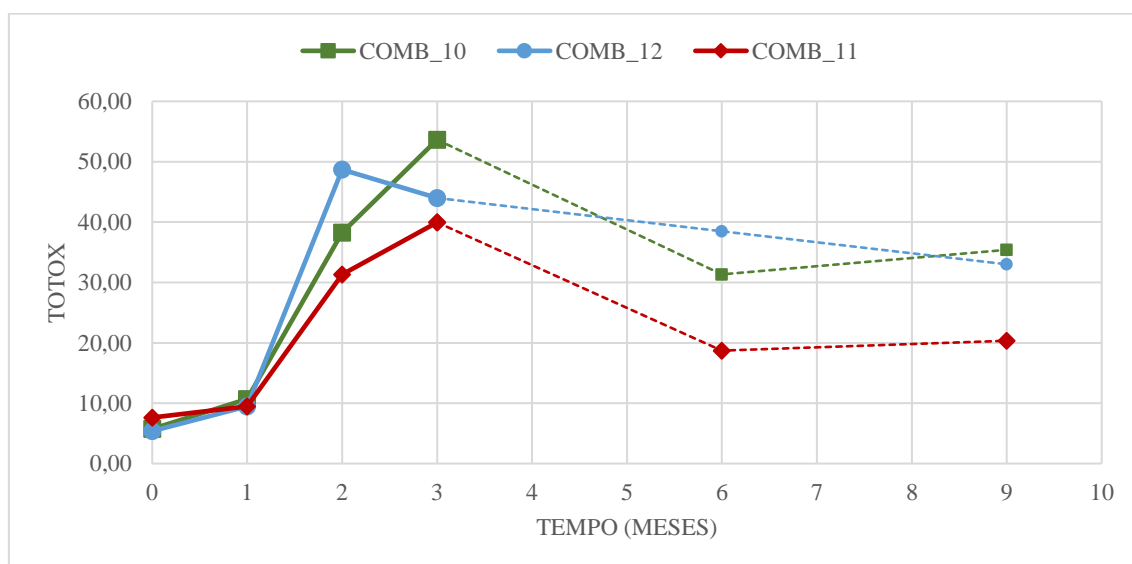


Figura 4.23 - Representação gráfica dos valores de TOTOX obtidos para o estudo dos antioxidantes nas Maioneses 65% ELAL. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

Os resultados obtidos na **Figura 4.23** consolidam os dados das **Figuras 4.21 e 4.22**, sendo os antioxidantes XTRA e EDTA os que demonstram maior eficácia nas combinações de Maionese 65% analisadas.

Com base nas análises efetuadas para a avaliação da eficácia dos antioxidantes EDTA, XTRA e Extratos de Alecrim nas diferentes combinações de Maionese 65%, é possível concluir que o XTRA mostrou potencial para substituto do EDTA.

De forma a corroborar esta hipótese, sugere-se como trabalho futuro, um estudo da caracterização do XTRA para conhecer a sua composição. No caso do extrato de Alecrim existe literatura que relata a origem do seu efeito antioxidante, o que não acontece para o extrato de espinafre. Com recurso à técnica analítica de HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), esta caracterização permitirá identificar os compostos fenólicos e outros componentes presentes no extrato de espinafre, responsáveis pelo poder antioxidante e ainda, perceber em que concentração se encontra cada extrato, e a sua contribuição para o efeito sinérgico final.

4.3 Análise dos compostos de oxidação secundários

Apesar da análise do índice de peróxidos e índice de p-anisidina conferir dados sobre o estado oxidativo da maionese, não revela informação sobre a natureza dos compostos formados, fornecendo apenas informação qualitativa.

Para obter uma descrição mais detalhada sobre a composição e quantidade de compostos voláteis formados durante a oxidação lipídica, entre os quais os principais responsáveis pelos odores e aromas desagradáveis associados ao ranço, recorreu-se à conjugação de duas técnicas analíticas: micro extração em fase sólida (SPME) seguida de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). A técnica SPME permitiu isolar, através do *headspace*, e identificar os compostos voláteis e semi-voláteis presentes na maionese, enquanto a técnica GC-MS permitiu a identificação dos compostos através da comparação com os espectros de referência da biblioteca NIST (*National Institute for Standard Technology*). As técnicas analíticas com recurso a *headspace* são muito utilizadas para a identificação de compostos voláteis, sendo o HS-SPME (*Headspace Solid Phase Micro Extraction*) considerado um método rápido, sensível, sem uso de solvente orgânico e económico, usado para preparar amostras para análise por cromatografia gasosa.

Na **Tabela 4.5** estão apresentados os 32 compostos identificados, entre os quais aldeídos (15), álcoois (5), cetonas (3), ácidos carboxílicos (2), ésteres (5) e furanos (2). A maioria destes compostos estão relacionados com as propriedades organolépticas do óleo constituinte da maionese, tendo características sensoriais que contribuem para as sensações *off-flavour* e *off-odour*, bem conhecidas pela literatura.

Para a separação destes compostos em SPME utilizou-se uma fibra DVB/Carb/PDMS e uma coluna capilar polar (DB-WAX). Relativamente à fibra, o facto de ser uma conjugação de 3 polímeros, possibilitou a adsorção de uma maior quantidade de compostos voláteis com diferentes propriedades químicas, e segundo a literatura este é o revestimento adequado para análise de compostos relacionados com o odor e fragância dos alimentos^[166, 167]. A utilização de uma DB-WAX, coluna de polietilenoglicol (PEG) de alta polaridade, permitiu isolar uma grande variedade dos compostos em função da sua polaridade e volatilidade^[168].

As amostras submetidas a esta análise foram as COMB_1, COMB_2 e COMB_3. Escolheram-se estas combinações para apenas se considerar o efeito do antioxidante na matriz e eliminar a probabilidade de sinergia entre o conservante e antioxidante. Foi também tido em conta o tempo de armazenamento das amostras – 2 meses em prateleira e 3 meses em câmara climática.

A 1ª análise foi realizada às amostras com 2 meses de prateleira, partindo do pressuposto que antes desse tempo não haveria desenvolvimento de produtos de oxidação secundários. A 2ª análise foi realizada às amostras armazenadas 3 meses em câmara climática, de modo a simular o estado oxidativo da maionese ao fim dos 9 meses em prateleira. Foram escolhidos estes dois pontos no tempo para compreender a evolução do desenvolvimento dos compostos secundários e apurar a eficácia dos antioxidantes.

A **Tabela 4.5** apresenta a concentração (%) dos 32 compostos identificados no início e no fim do acompanhamento para as COMB_1, COMB_2 e COMB_3. O cálculo da concentração teve por base a área de cada composto retirada do cromatograma.

Tabela 4.5 - Concentração (%) dos compostos voláteis identificados no início e no fim do acompanhamento para as amostras COMB_1, COMB_2 e COMB_3.

| Composto | CAS | Área do pico (%) | | | | | |
|------------------------------------|------------|-----------------------|-------|-------|-----------------------|-------|-------|
| | | 2 meses de prateleira | | | 9 meses de prateleira | | |
| | | I | II | III | I | II | III |
| Aldeídos (15) | | | | | | | |
| Pentanal | 110-62-3 | 0,10 | - | - | 0,07 | 0,05 | 0,04 |
| Hexanal | 66-25-1 | 1,23 | 0,25 | 0,59 | 0,84 | 0,79 | 0,64 |
| Heptanal | 111-71-7 | 0,09 | 0,05 | 0,06 | 0,10 | 0,07 | 0,08 |
| Octanal | 124-13-0 | 0,09 | 0,05 | 0,05 | 0,07 | 0,06 | 0,05 |
| (2Z) -Heptenal | 57266-86-1 | 2,47 | 0,09 | 0,54 | 3,11 | 2,28 | 4,02 |
| Nonanal | 124-19-6 | 0,22 | 0,42 | 0,37 | 0,10 | 0,19 | 0,15 |
| (2E) -Octenal | 2548-87-0 | 0,26 | 0,02 | 0,10 | 0,20 | 0,07 | 0,17 |
| Furfural | 98-01-1 | 0,34 | - | - | 0,46 | 0,26 | 0,40 |
| Benzaldeído | 106-32-1 | - | 0,05 | - | - | - | - |
| (2E,4E) -Heptadie-nal | 4313-03-05 | 0,13 | - | 0,09 | 0,13 | 0,12 | 0,15 |
| (2E) -Nonenal | 18829-56-6 | - | - | - | - | 0,20 | 0,17 |
| (2E) -Decenal | 3913-81-3 | 0,08 | - | - | 0,30 | 0,08 | 0,16 |
| Benzeneacetaldeído | 122-78-1 | 0,06 | - | - | - | - | 0,08 |
| (2E,4E) -Decadienal | 25152-84-5 | 0,36 | - | 0,11 | 0,79 | 0,14 | 0,72 |
| 2,4 - Decadienal | 2363-88-4 | 0,36 | 0,05 | 0,14 | 1,42 | 0,38 | 1,30 |
| Álcoois (5) | | | | | | | |
| Etanol | 64-17-5 | 0,87 | 0,97 | 0,99 | 1,05 | 1,19 | 1,02 |
| 1-Pentanol | 71-41-0 | 0,04 | - | - | 0,05 | - | 0,04 |
| 2-Etil-1-hexanol | 104-76-7 | - | - | - | - | 0,09 | 0,06 |
| (2E) -Octen-1-ol | 18409-17-1 | 0,04 | - | - | 0,05 | - | 0,03 |
| α -Terpineol | 98-55-5 | 0,08 | - | - | 0,07 | - | - |
| Cetonas (3) | | | | | | | |
| 3-Penten-2-ona | 625-33-2 | 0,04 | - | - | 0,05 | 0,05 | 0,05 |
| 1-Octen-3-ona | 4312-99-6 | 0,27 | - | 0,08 | 0,13 | - | 0,11 |
| (3E) -Octen-2-ona | 18402-82-9 | - | - | - | - | 0,04 | - |
| Ácidos (2) | | | | | | | |
| Ácido Acético | 64-19-7 | 91,44 | 97,50 | 96,14 | 90,59 | 93,35 | 90,49 |
| Ácido Hexanóico | 142-62-1 | 0,12 | - | 0,11 | 0,08 | 0,09 | 0,06 |
| Furanos (2) | | | | | | | |
| 2,5- Dimetil furano | 625-86-5 | - | 0,12 | 0,20 | - | 0,25 | - |
| 2- Pentil furano | 3777-69-3 | 0,23 | 0,12 | 0,23 | 0,18 | 0,25 | 0,26 |
| Ésteres (5) | | | | | | | |
| Octanoato de etilo | 106-32-1 | 0,42 | 0,14 | 0,12 | - | - | - |
| Decanoato de etilo | 110-38-3 | 0,35 | 0,11 | 0,08 | - | - | - |
| 2-hexen-1-ol benzo-ato | 76841-70-8 | 0,08 | - | - | 0,12 | - | - |
| <i>trans</i> -4-decenoato de etilo | 76649-16-6 | 0,19 | 0,06 | - | - | - | - |
| 1-Octen-1-ol ace-tato | 77149-68-9 | 0,04 | - | - | 0,04 | - | 0,04 |

I – COMB_3; II – COMB_1; III – COMB_2

Aldeídos

Os aldeídos são os compostos voláteis mais abundantes em óleos com características rançosas e são considerados os principais produtos de oxidação secundários responsáveis pelas alterações organolépticas das maioneses. Alcanais, alcenais, alcadienais e aldeídos aromáticos estão entre os aldeídos detetados ^[169].

A **Tabela 4.5** revela que alcanais como hexanal, heptanal, octanal e nonanal foram detetados em todas as amostras no início e final do acompanhamento. Quanto aos alcenais, o (2Z) - Heptenal foi o que mostrou um maior incremento na concentração ao longo do tempo para todas as amostras, enquanto o (2E) -Nonenal apenas foi detetado nas amostras COMB_1 e COMB_2 ao fim dos 9 meses. Relativamente aos aldeídos aromáticos, Benzaldeído e Benzeneacetaldéido, registaram-se apenas quantidades vestigiais para algumas amostras.

Pela análise da **Tabela 4.5**, verifica-se que as concentrações de hexanal e pentanal aumentaram com o nível de oxidação, as de octanal e heptanal não sofreram variações significativas ao longo do tempo, e o nonanal foi o único no qual a concentração diminuiu com o evoluir da oxidação lipídica, sendo essa diminuição mais acentuada nas amostras COMB_1 e COMB_2.

O hexanal, pentanal e heptanal são formados pela decomposição de hidroperóxidos formados pela auto oxidação do ácido linoleico^[170-172], nomeadamente 13-hidroperóxido e 11-hidroperóxido (ver **Figura 2.4**). O octanal e nonanal tem origem na quebra das ligações do 10-hidroperóxido e 11-hidroperóxido do ácido oleico, respetivamente (ver **Figura 2.3**). Atendendo a que o óleo de girassol utilizado na produção é maioritariamente constituído por ácido oleico e linoleico, era de esperar a presença destes compostos.

As perceções olfativas associadas a cada composto dependem da quantidade em que se encontra na matriz. Segundo a literatura, o hexanal quando encontrado em pequenas concentrações é responsável por atributos como o frutado, o doce, o verde e o cítrico^[173]. No entanto, quando em excesso promove atributos desagradáveis e indesejáveis, como o ranço^[174]. Na **Tabela 4.6** estão apresentados os aromas e odores dos aldeídos identificados nas combinações de Maionese 65% sem conservante, de acordo com o reportado na literatura.

Tabela 4.6 - Percepção olfativa associada a cada aldeído^[170, 171, 175–184].

| Composto | Aroma/odor |
|----------------------|--|
| Pentanal | Amêndoa, picante, amadeirado, amargo, oleoso, caramelo, frutado, bolorento |
| Hexanal | Relva, peixe, verde, maçã verde, rançoso, seboso, gorduroso, oleoso |
| Heptanal | Gorduroso, podre, peixe, nozes, cítrico, rançoso |
| Octanal | Limão, verde, fresco, pungente, oleoso, ensaboado |
| (2Z) -Heptenal | Rançoso, frito, pungente, ensaboado, gorduroso |
| Nonanal | Verde, gorduroso, ceroso, pintado, cítrico |
| (2E) -Octenal | Gorduroso, cogumelo, verde, oleoso |
| Furfural | Amadeirado, amêndoa, noz |
| Benzaldeído | Amêndoa, caramelo |
| (2E,4E) -Heptadienal | Gorduroso, noz |
| (2E) -Nonenal | Pepino, verde, seboso, oleoso |
| (2E) Decenal | Metálico, ensaboado, sebo, laranja, verde |
| Benzeneacetaldéido | Doce, mel |
| (2E,4E) -Decadienal | Verde, gorduroso, frito, cera |

A identificação dos compostos foi feita com base no tempo de retenção dos picos e nos espectros de massa obtidos, no entanto e devido à complexidade das amostras, recorreu-se também ao cálculo dos índices de retenção linear (LRI).

Os LRI são importantes para a identificação dos compostos, pois permitem ser comparados com a literatura^[185]. Estes dados em combinação com o método de cromatografia convencional, que identifica os compostos por comparação dos espectros de referência da biblioteca NIST, fornecem uma identificação praticamente inequívoca da natureza dos compostos.

Para o cálculo do LRI (Equação II.1, **Anexo II**) foi necessário injetar uma série homóloga de hidrocarbonetos nas mesmas condições experimentais (**Figura 4.24**). No **Anexo II** encontram-se as Tabelas II.1 – II.6 que contêm os valores de LRI calculados e os LRI obtidos pela literatura, sendo que os dados retirados estão de acordo com o tipo de coluna (DB-WAX) usado nesta análise.

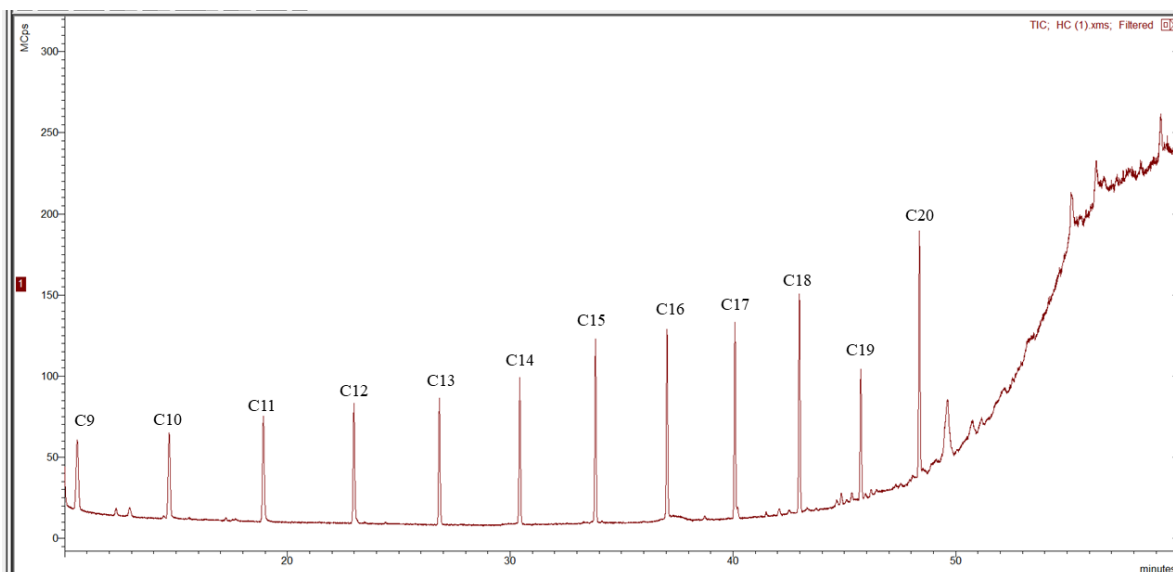


Figura 4.24 - Cromatograma da série homóloga dos hidrocarbonetos.

Álcoois

Os álcoois são geralmente formados pela decomposição de hidroperóxidos secundários, provenientes da auto oxidação do ácido linoleico, ou pela redução de compostos de carbonilo^[171, 172]. Foram identificados 5 álcoois: etanol, 1-pentanol, (2E) -octen-1-ol, 2-Etil-1-Hexanol e α -Terpienol.

Através da análise da **Tabela 4.5**, é possível verificar que o etanol é o composto alcoólico mais abundante, tendo sido identificado em todas as amostras ao longo dos 9 meses de acompanhamento. Este resultado era esperado, uma vez que o regulador de acidez da maionese é o vinagre de álcool^[178].

O 1-pentanol, composto derivado do radical 13-alcoxi do ácido linoleico, foi identificado na COMB_3 ao longo dos 9 meses, e na COMB_2 no último mês. Porém, em ambos os tempos de análise, apresentava baixa concentração, de 0,04%. Por norma, os odores/aromas associados a este componente são o doce^[171], o balsâmico^[178, 179], o verde^[177] e o oleoso^[186]. Verifica-se que para um nível de oxidação mais avançado, apenas a COMB_1 apresenta ausência deste composto.

Relativamente ao 2-Etil-1-Hexanol só é identificado ao fim dos 9 meses nas COMB_1 e COMB_2. Normalmente este composto está associado a perceções olfativas agradáveis como rosas e cítricos, sendo que podem surgir perceções mais desagradáveis como o oleoso, quando está presente em maiores concentrações^[187].

Quanto ao (2E) -octen-1-ol e α -Terpienol estão presentes na COMB_3 tanto nos primeiros 2 meses de prateleira, como ao fim dos 9 meses, sendo que as suas concentrações pouco variaram com a evolução da oxidação lipídica. O α -Terpienol é responsável por atributos olfativos agradáveis como o anis, mentol e doce^[175, 187, 188].

Apesar de serem compostos de oxidação secundários, os álcoois não são considerados importantes contribuintes para os *off flavours* na maionese pois apresentam valores de *odor threshold* relativamente altos. O conceito *odor threshold*, ou limite de detecção de odores, define-se como a concentração mais baixa de um determinado composto com odor perceptível pelo olfato humano. Dependendo da concentração em que se encontram nas amostras analisadas, as percepções olfativas podem diferir^[19, 170, 171].

Cetonas

Dos compostos secundários detetados nas amostras de Maionese 65% foram identificadas 3 cetonas: 3-Penten-2-ona, 1-Octen-3-ona e (3E) -Octen-2-ona.

Na **Tabela 4.5**, observa-se que a 3-Penten-2-ona foi detetada em todas as amostras ao fim de 9 meses com uma concentração de 0,05%. A 3-Penten-2-ona é uma cetona com origem na decomposição de produtos formados pela autooxidação do ácido linoleico, e está associada a percepções olfativas agradáveis como fruta, e desagradáveis como rançoso e gorduroso^[178, 181]. Como referido para outros compostos voláteis, estes diferentes atributos para o mesmo composto estão relacionados com a concentração em que se encontram na matriz.

Quanto à 1-octen-3-ona, cetona muito conhecida pelos seus aromas desagradáveis – cogumelo, bolorento, pungente e metálico^[173, 174, 182] – é a segunda cetona mais presente nas amostras de Maionese 65% estudadas, com uma concentração de 0,27% na COMB_3 ao fim de 2 meses em prateleira. Cetona formada a partir do 10-hidroperóxido, produto originário da decomposição do ácido linoleico^[170]. A COMB_1 é uma exceção, pois não apresenta quaisquer vestígios ao longo dos 9 meses.

Ácidos Carboxílicos

Pela análise dos cromatogramas das amostras de Maionese 65% sem conservante foram detetados 2 ácidos carboxílicos: ácido acético e ácido hexanóico^[189]. O ácido acético provém do

vinagre utilizado na produção das maioneses, enquanto o ácido hexanóico deriva do radical 13-alcoxi do ácido linoleico.

Na **Tabela 4.5**, é possível observar que o ácido acético é o componente mais abundante relativamente a todos os outros compostos identificados, com uma concentração acima dos 90%, que se mantém dentro da mesma ordem de grandeza para todas as amostras de Maionese 65% sem conservante testadas ao longo dos 9 meses. De acordo com a literatura, os atributos sensoriais do ácido acético são definidos como pungente, vinagre e azedo^[171, 177-179, 182]. Quanto ao ácido hexanóico, caracterizado por atributos olfativos como azedo, gorduroso, mofo e queijo^[171, 178, 182, 187], está presente em todas as amostras, com concentrações entre 0,06% e 0,12%, exceto na COMB_1 no 2º mês de prateleira.

O efeito dos antioxidantes não revela grande influência na concentração do ácido acético visto que a sua presença nas amostras se deve à própria composição da maionese, não estando propriamente interligado com a oxidação lipídica.

Furanos

Nas amostras de Maionese 65% sem conservante também foram identificados derivados de furano: 2-pentil furano e 2,5- Dimetil furano. A **Figura 4.25** apresenta a monitorização dos derivados de furano presentes na COMB_1 através da extração do ião ($m/z = 81,82$ e 53).

O 2-pentilfurano, formado a partir da quebra de ligação C-C do radical 9-hidroxilo do ácido linoleico^[170, 171, 190], foi identificado em todas as amostras de Maionese 65% sem conservante ao longo dos 9 meses em prateleira. A concentração deste composto heterocíclico aromático sofre um ligeiro aumento com a evolução da oxidação lipídica na COMB_1, com um aumento de 0,12% para 0,25% e na COMB_2 com um aumento de 0,23% para 0,26%. A presença deste composto contribui para aromas como gorduroso^[180], manteiga^[171] e feijão verde^[177]. Tal como os álcoois, os derivados de furano, por causa do limite de deteção de odor relativamente alto, não deverão provocar alterações organolépticas acentuadas na maionese^[19].

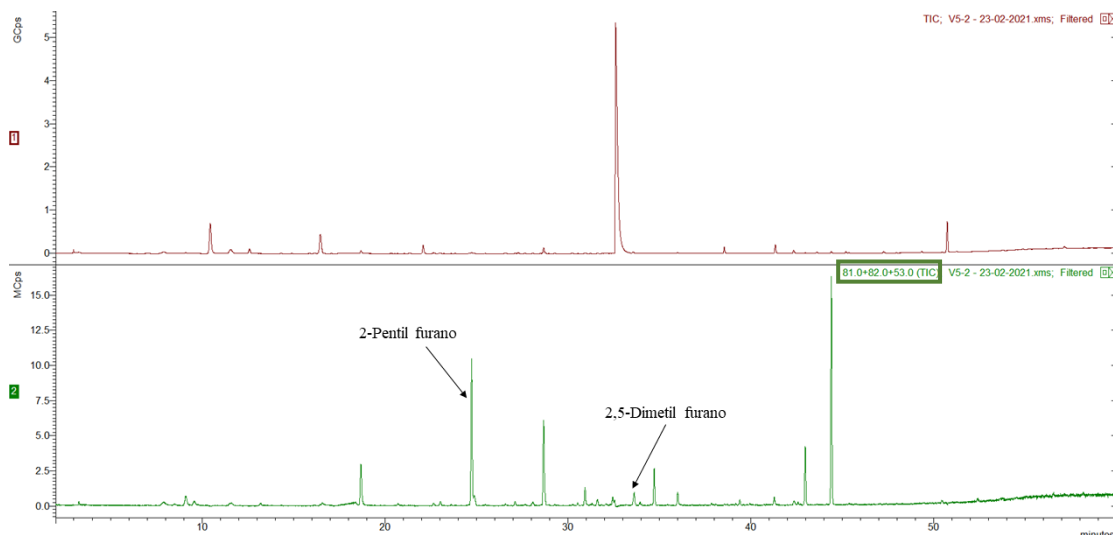


Figura 4.25 – Perfil cromatográfico da COMB_1 ao fim de 9 meses em prateleira (A) e monitorização dos derivados de furano (B) através da extração do ião ($m/z=81,82$ e 53).

Ésteres

Na classe dos ésteres foram identificados 5 compostos: Octanoato de etilo, Decanoato de etilo, 2-hexen-1-ol benzoato, *trans*-4-decanoato de etilo e 1-Octenol acetato. Os ésteres são formados pela interação de produtos de esterificação dos álcoois e ácidos carboxílicos livres provenientes da decomposição dos lípidos^[19].

Através da **Tabela 4.5**, é possível visualizar que o octanoato de etilo e decanoato de etilo estão presentes em todas as amostras de Maionese 65% sem conservante armazenadas 2 meses em prateleira, e nenhum vestígio ao fim dos 9 meses de acompanhamento. Enquanto o octanoato de etilo resulta da interação entre o etanol e o ácido octanóico, e apresenta perceções olfativas como a cera e frutado^[175, 176, 191], o decanoato de etilo tem origem na interação entre etanol e o ácido decanóico, e detém atributos agradáveis como o de fruta^[192] e maçã doce, e menos agradáveis como a cera.

De uma forma geral, conclui-se que dos 32 compostos de oxidação secundários identificados, a classe dos aldeídos foi a predominante, além dos ácidos carboxílicos, onde o ácido acético detém mais de 90% do total dos compostos, sendo esta concentração expectável tendo em conta a composição da maionese. Inserido nos aldeídos, o (2Z)-Heptenal foi o componente com maior incremento da concentração ao fim dos 9 meses, promovendo odores/aromas associados a gordura, relva e pungente^[183]. O hexanal, heptanal, octanal, nonanal e (2E)-Octenal estiverem presentes em todas as amostras de Maionese 65% analisadas, porém com variações pouco significativas ao longo do tempo, tendo sido o hexanal o que mais se destacou. Quanto às restantes

classes de compostos, apresentaram quantidades mais pequenas e oscilações pouco significativas tanto ao longo dos 9 meses como entre os diferentes antioxidantes.

Relativamente à eficácia dos antioxidantes, o XTRA (antioxidante da COMB_2) mostrou um comportamento semelhante ao EDTA (antioxidante da COMB_1), porém através dos dados obtidos não foi possível eleger o melhor entre os dois. Para isto seriam necessárias mais amostras, entre as quais uma Maionese 65% sem conservante e sem antioxidante para servir de amostra controlo, um período de análises mais longo e amostras submetidas a diferentes temperaturas, uma vez que a temperatura é um dos fatores que influencia a cinética da oxidação lipídica.

4.4 Acompanhamento Sensorial

Além das avaliações aos parâmetros físico químicos, as matrizes produzidas foram também acompanhadas sensorialmente ao longo dos 9 meses. A evolução do estado oxidativo promove mudanças ao nível organolético nas maioneses devido aos *off flavours* originados pelos compostos de oxidação secundários, identificados no **Subcapítulo 4.3**. Como forma de avaliação, considerou-se a escala de classificação definida pela **Figura 3.3**, onde uma pontuação de 1 significa que a maionese está muito alterada, com odor/aroma intenso a ranço e 5 que a maionese não está nada alterada.

Relativamente ao Ketchup e Molho 0% avaliou-se o impacto do conservante e a sua conjugação com os restantes ingredientes. A cor foi também um parâmetro considerado pois é o que em primeira instância chama a atenção do consumidor. Para o cálculo da variação total de cor (ΔE) considerou-se como coordenadas padrão (L^* , a^* , b^*) as obtidas para as amostras padrão no mês de produção (**Tabela 4.7**).

Tabela 4.7 - Coordenadas (L^* , a^* , b^*) das amostras padrão de Maionese 65%, Ketchup e Molho 0%.

| Coordenadas CIELab | Maionese 65% | Ketchup | Molho 0% |
|--------------------|----------------|---------|----------|
| | Sorbato + EDTA | Sorbato | Sorbato |
| L^* | 91 | 23 | 28 |
| a^* | 2 | 25 | 19 |
| b^* | 14 | 26 | 22 |

Combinações de Maionese 65% sem conservante

De acordo com a escala de classificação ilustrada pela **Figura 3.3**, elaborou-se a **Tabela 4.8** que permite uma avaliação da evolução organolética das maioneses 65% sem conservante ao longo dos 9 meses.

Tabela 4.8 - Avaliação organolética das Maioneses 65% sem conservante de acordo com a escala de classificação definida.

| Maionese 65% s/conservante | Tempo (Meses) | | | | | |
|-------------------------------|---------------|-----|-----|-----|----|----|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 6 | 9 |
| COMB_1 | NA | NA | NA | NA | AR | MA |
| COMB_2 | NA | NA | NA | AIR | AR | MA |
| COMB_3 | NA | VCA | VCA | AIR | - | - |

NA – Nada alterada; VCA – Vestígios conservante/antioxidante; AIR – Alterada com inícios de ranço; AR – Alterada com ranço; MA – muito alterado

Na **Tabela 4.8** verifica-se que as maioneses com Extrato de Alecrim foram as que apresentaram mais alterações ao nível sensorial. Nos primeiros meses de armazenamento, apesar de não terem sido detetados sinais de ranço, atingiram uma classificação de 4 (ver **Figura 3.6**) uma vez que o sabor das maioneses estava ligeiramente alterado devido ao antioxidante inserido, que conferia um sabor adocicado. O momento em que são notificados inícios de ranço coincide com o mês da descida de valores de IP.

Atendendo aos valores de IpA registados para a COMB_1, o resultado sensorial obtido para o último mês era esperado. Contudo, foram as maioneses em que o sabor se degradou mais lentamente.

A COMB_2 apresenta uma evolução sensorial semelhante à COMB_1 nos primeiros meses. No entanto, no terceiro mês de prateleira foram detetados ligeiros traços de ranço, tendo sido atribuída uma classificação inferior.

Enquanto a **Tabela 4.8** se baseia na deteção do desenvolvimento de ranço, sendo relevantes sobretudo as alteração de sabor e odor, a **Tabela 4.9** apresenta as variações da cor.

De acordo com a literatura, a determinação dos valores da variação total de cor (ΔE) serve para averiguar se a diferença entre a amostra padrão e amostras analisadas é realmente visível ao olho humano, tendo em conta 3 condições^[35]:

- Se $\Delta E < 1$ – as diferenças de cor não são perceptíveis pelo olho humano;
- Se $1 < \Delta E < 3$ – as diferenças de cor não são óbvias pelo olho humano;
- Se $\Delta E > 3$ – a diferença de cor é perceptível pelo olho humano;

Tabela 4.9 - Variação Total de cor (ΔE) das amostras de Maionese 65% sem conservante ao longo do tempo.

| Maionese 65% s/conservante | ΔE | | | | | |
|-------------------------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Mês 0 | Mês 1 | Mês 2 | Mês 3 | Mês 6 | Mês 9 |
| COMB_1 | 1,0 | 1,4 | 1,0 | 1,4 | 1,4 | 1,4 |
| COMB_2 | 2,2 | 1,0 | 3,0 | 2,2 | 2,2 | 2,2 |
| COMB_3 | 8,3 | 7,3 | 1,7 | 1,4 | 2,0 | 1,4 |

Na **Tabela 4.9** observa-se que a COMB_3 teve variações de cor mais acentuadas apresentando um $\Delta E= 8,3$ no mês 0 e $\Delta E=7,3$ no mês 1. Como a variação destas amostras foi superior a 3 ($\Delta E > 3$), significa que a diferença de cor, comparativamente à amostra padrão, era bastante clara.

As restantes maioneses apresentam variações no intervalo $1 < \Delta E < 3$, o que indica que, apesar de existirem algumas diferenças colorimétricas com a amostra padrão, estas não são óbvias o olho humano. O cálculo do ΔE teve-se por base as coordenadas presentes na Tabela III.1 do **Anexo III**.

Combinações de Maionese 65% Sorbato de potássio

Conforme mostrado na **Tabela 4.10**, as pontuações sensoriais da COMB_5 diminuíram a partir do terceiro mês de armazenamento, momento que coincide com o início da decomposição de hidroperóxidos em produtos de oxidação secundária. Porém, as classificações atribuídas não estão de acordo com os resultados obtidos para o IP e TOTOX, onde o XTRA (antioxidante da COMB_5) mostra maior eficácia relativamente ao EDTA.

Tabela 4.10 - Avaliação organolética das Maioneses 65% Sorbato de potássio de acordo com a escala de classificação definida.

| Maionese 65% Sorbato | Tempo (Meses) | | | | | |
|-------------------------|---------------|----|-----|-----|----|-----|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 6 | 9 |
| COMB_4 | NA | NA | NA | NA | NA | AIR |
| COMB_5 | NA | NA | NA | AIR | AR | MA |
| COMB_6 | NA | NA | VCA | AIR | - | - |

NA – Nada alterada; VCA – Vestígios conservante/antioxidante; AIR – Alterada com inícios de ranço; AR – Alterada com ranço; MA – muito alterado

No caso da maionese com Extratos de Alecrim (antioxidante da COMB_6), a pontuação atribuída está de acordo com os restantes resultados apurados para o estado oxidativo desta maionese. No segundo mês de prateleira, apesar de não serem identificados sabores relacionados com ranço, é perceptível um sabor adocicado, proveniente do Extrato de Alecrim.

A COMB_4, a nível sensorial encontra-se dentro do esperado, tendo revelado alterações apenas no último mês, estando de acordo com os valores de IpA registados. Assim, e com base na informação fornecida pela **Tabela 4.11**, o EDTA foi o antioxidante que se mostrou mais eficaz na qualidade organolética das combinações de Maionese 65% sorbato de potássio.

Tabela 4.11 - Variação total da cor (ΔE) para as amostras Maionese 65% sorbato de potássio ao longo do tempo.

| Maionese 65% Sorbato de Potássio | ΔE | | | | | |
|-------------------------------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Mês 0 | Mês 1 | Mês 2 | Mês 3 | Mês 6 | Mês 9 |
| COMB_4 | 0,0 | 1,4 | 1,4 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| COMB_5 | 3,0 | 2,2 | 2,0 | 2,2 | 2,2 | 2,2 |
| COMB_6 | 9,3 | 3,3 | 3,0 | 1,7 | 1,4 | 1,7 |

A COMB_4 apresenta um $\Delta E=0$ no mês de produção, visto ser a amostra padrão. Nos restantes meses de análise, há uma variação de cor muito reduzida, o que sugere que não houve diferenças de cor significativas entre as amostras analisadas e a amostra padrão.

A COMB_5 apresenta um ΔE idêntico a partir do segundo mês de prateleira, o que permite afirmar que o tempo de armazenamento e as condições adjacentes não influenciaram a cor das amostras. Como detém valores de ΔE no intervalo $1 < \Delta E < 3$ as diferenças colométricas entre a amostra padrão e a amostra em causa não são óbvias ao olho humano. O cálculo do ΔE teve-se por base as coordenadas presentes na Tabela III.2 do **Anexo III**.

Combinações Maionese 65% VinTamp

Na **Tabela 4.12** são apresentadas as classificações das Maioneses 65% VinTamp por forma a interpretar a influência dos antioxidantes e conservantes na evolução sensorial da amostra ao longo do tempo.

Tabela 4.12 - Avaliação organolética das Maionese 65% VinTamp de acordo com a escala de classificação definida.

| Maionese 65% VinTamp | Tempo (Meses) | | | | | |
|-------------------------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 6 | 9 |
| COMB_7 | NA | NA | NA | NA | AIR | MA |
| COMB_8 | NA | NA | NA | NA | AIR | MA |
| COMB_9 | VCA | VCA | VCA | AIR | AIR | AIR |

NA – Nada alterada; VCA – Vestígios conservante/antioxidante; AIR – Alterada com inícios de ranço; AR – Alterada com ranço; MA – muito alterado

Pela **Tabela 4.12**, é visível que as classificações para COMB_7 foram idênticas à COMB_8. Até ao terceiro mês em prateleira não foram identificados sinais de deterioração oxidativa. As percepções olfativas registadas para EDTA e XTRA (antioxidantes das COMB_7 e COMB_8, respetivamente) a partir do mês 6 estão de acordo com os valores obtidos para o IpA (**Figura 4.19**) e com os valores obtidos no HS-SPME/GC-MS, onde se verificou que ao fim de 9 meses (3 meses em câmara climática) a concentração de aldeídos, entre os quais o hexanal e pentanal, aumentou, o que justifica o odor a ranço. Quanto à COMB_9, obteve uma classificação de 4 logo de início tendo em conta o sabor peculiar que o antioxidante confere à maionese.

No que diz respeito à variação total da cor (ΔE), a **Figura 4.26** mostra o retrato fotográfico retirado à amostra padrão (A) no mês de produção e às amostras Maionese 65% VinTamp ao fim de 2 meses prateleira (B) e a **Tabela 4.13** mostra que a COMB_8 foi a que apresentou variações ligeiramente superiores. Para todas as amostras verifica-se que o ΔE se encontra dentro do intervalo $1 < \Delta E < 3$. O cálculo do ΔE teve-se por base as coordenadas presentes na Tabela III.3 do **Anexo III**.

Tabela 4.13 - Variação total da cor (ΔE) para as amostras Maionese 65% VinTamp ao longo do tempo.

| Maionese 65% VinTamp | ΔE | | | | | |
|-------------------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Mês 0 | Mês 1 | Mês 2 | Mês 3 | Mês 6 | Mês 9 |
| COMB_7 | 1,4 | 1,0 | 1,0 | 1,7 | 1,4 | 1,7 |
| COMB_8 | 1,0 | 2,2 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| COMB_9 | 1,4 | 1,0 | 2,0 | 2,2 | 2,2 | 2,2 |

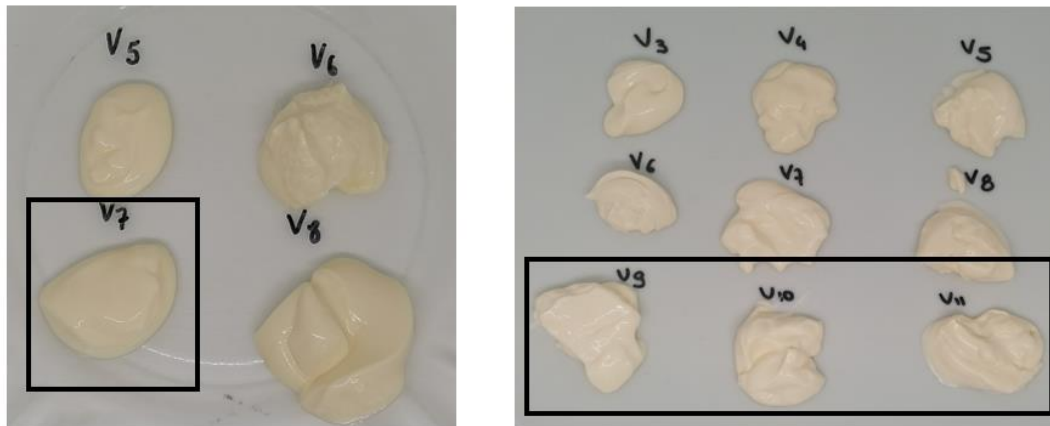


Figura 4.26 - Retrato fotográfico da amostra padrão no mês de produção (A) e das Maioneses 65% VinTamp ao fim de 2 meses em prateleira (B).

Combinações Maionese 65% ELAL

A evolução da percepção do sabor das Maioneses 65% ELAL é apresentada na **Tabela 4.14**.

Tabela 4.14 - Avaliação organolética das Maioneses 65% ELAL de acordo com a escala de classificação definida.

| Maionese 65% ELAL | Tempo (Meses) | | | | | |
|----------------------|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 6 | 9 |
| COMB_10 | VCA | VCA | VCA | AIR | AIR | AIR |
| COMB_11 | VCA | VCA | VCA | VCA | VCA | AIR |
| COMB_12 | VCA | VCA | VCA | AIR | AIR | MA |

NA – Nada alterada; VCA – Vestígios conservante/antioxidante; AIR – Alterada com incícios de ranço; AR – Alterada com ranço; MA – muito alterado

A partir da **Tabela 4.14** observa-se que o conservante aplicado – ELAL – conferiu desde início um sabor diferente às maioneses, que de acordo com os provadores era um sabor “seco” e não muito agradável ao palato. Porém, foram as maioneses onde os antioxidantes melhor comportamento exibiram ao nível da alteração de sabor provocado pela deterioração oxidativa, sendo que apenas a COMB_12 demonstrou uma pior classificação no último mês. Os resultados sensoriais obtidos para a COMB_11 estão de acordo com os valores de IpA registados.

Relativamente à cor, é possível aferir pela **Tabela 4.15** que a COMB_10 e COMB_12 não apresentaram diferenças colorimétricas óbvias na ótica do consumidor, Porém, a COMB_11

detém os valores mais altos no terceiro e nono mês em prateleira, passando estes valores a estarem de acordo com a terceira condição, onde diz que para valores de $\Delta E > 3$, as diferenças colorimétricas são visíveis ao olho humano. O cálculo do ΔE teve-se por base as coordenadas presentes na Tabela III.4 do Anexo III.

Tabela 4.15 -Variação total da cor (ΔE) para as amostras Maionese 65% ELAL ao longo do tempo.

| Maionese 65% ELAL | ΔE | | | | | |
|----------------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Mês 0 | Mês 1 | Mês 2 | Mês 3 | Mês 6 | Mês 9 |
| EDTA | 1,4 | 1,0 | 1,4 | 1,4 | 1,4 | 1,4 |
| Alecrim | 2,8 | 2,8 | 2,2 | 2,0 | 3,2 | 2,0 |
| XTRA | 2,2 | 3,0 | 2,4 | 4,1 | 3,2 | 4,1 |

Ketchup e Molho 0%

Durante o acompanhamento sensorial do Ketchup e Molho 0%, as diferenças de sabor foram sempre detetadas para a combinação com ELAL. De acordo com os comentários dos provadores, o ELAL confere um sabor alterado, “seco”, “láctico” e desagradável. Quanto às restantes combinações de Ketchup e Molho 0% com os conservantes Sorbato de Potássio e VinTamp, não foram identificadas alterações ao nível sabor. A Tabela 4.16 apresenta o ΔE para as amostras de Ketchup e Molho 0% ao longo do tempo.

Tabela 4.16 - Variação total da cor (ΔE) para as amostras de Ketchup e Molho 0% ao longo do tempo.

| Amostras | | ΔE | | | | | |
|----------|-------|------------|-------|-------|------------|------------|------------|
| | | Mês 0 | Mês 1 | Mês 2 | Mês 3 | Mês 6 | Mês 9 |
| Molho 0% | M1 | 0,0 | 1,0 | 4,6 | 3,6 | 7,2 | 3,6 |
| | M2 | 0,0 | 3,7 | 5,0 | 3,6 | 5,8 | 3,6 |
| | M3 | 0,0 | 1,4 | 5,7 | 5,1 | 7,2 | 6,5 |
| Ketchup | Ket_1 | 0,0 | 0,0 | 3,0 | 4,1 | 4,7 | 4,1 |
| | Ket_2 | 6,0 | 2,8 | 4,9 | 6,7 | 7,1 | 5,1 |
| | Ket_3 | 5,0 | 2,2 | 4,4 | 5,5 | 6,2 | 7,5 |

Relativamente à cor, é possível visualizar pela **Tabela 4.16** que tanto as amostras de Ketchup como Molho 0% apresentam alterações muito superiores às registadas para as maioneses uma vez que estes molhos não emulsionados tendem a escurecer ao longo do tempo. A partir do segundo mês de prateleira, praticamente todas as amostras apresentam valores de $\Delta E > 3$. O cálculo do ΔE teve-se por base as coordenadas presentes na Tabela III.5 e III.6 o **Anexo III**.

4.5 Análises Microbiológicas

Enquanto a estabilidade microbiológica das maioneses é baseada no seu baixo pH, presença de conservantes e quantidade de óleo, nas matrizes Ketchup e Molho 0% baseia-se no baixo pH, na presença de conservantes e no tratamento térmico que sofrem durante a produção.

Dessa forma, e no sentido de avaliar a eficácia dos novos conservantes na qualidade e segurança das matrizes alimentares em estudo, realizaram-se análises microbiológicas após confeção e ao fim de 3 e 9 meses de prateleira (sendo estes últimos correspondentes às amostras que permaneceram 3 meses em câmara climática). As combinações de Maionese 65% VinTamp foram uma exceção, tendo sido realizadas análises após 1 mês em prateleira.

Nestas análises efetuou-se a contagem de microrganismos a 30°C (M.O. 30°C), bolores e leveduras, bactérias ácido lácticas (BAL) e pesquisa de *Enterobacteriaceae*, sendo os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colónias por grama de amostra (UFC/g).

4.5.1 Maionese 65%

Combinações Maionese 65% sem conservante

Os resultados obtidos na análise microbiológica das combinações de Maionese 65% sem conservante estão apresentados na **Tabela 4.17**.

Tabela 4.17 - Análise microbiológica das combinações de Maionese 65% sem conservante no mês de produção, no terceiro e nono mês de prateleira.

| COMB_1, COMB_2 e COMB_3 | | | |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| (UFC/g) | Mês 0 | Mês 3 | Mês 9 |
| M.O 30°C | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| BAL | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| Bolores e leveduras | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |

Atendendo aos valores de pH registados para as combinações de Maionese 65% sem conservantes (Figura I.13, **Anexo I**), os resultados obtidos nas análises microbiológicas encontram-se dentro do esperado. Por serem constituídas com 65% gordura, dispõem de água disponível para crescimento microbiano, contrariamente a uma maionese com 80% de gordura. Apesar das bactérias ácido lácticas (BAL) e bolores e leveduras serem microrganismos resistentes a ambientes ácidos, as COMB_1, COMB_2 e COMB_3 não revelaram crescimento destes microrganismos ao longo do tempo de acompanhamento.

Combinações Maionese 65% Sorbato de Potássio

Os resultados obtidos na análise microbiológica das combinações de Maionese 65% Sorbato de Potássio encontram-se expostos na **Tabela 4.18**.

Tabela 4.18 - Análise microbiológica das combinações de Maionese 65% Sorbato de Potássio no mês de produção, no terceiro e nono mês de prateleira.

| COMB_4, COMB_5 e COMB_6 | | | |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| (UFC/g) | Mês 0 | Mês 3 | Mês 9 |
| M.O 30°C | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| BAL | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| Bolores e leveduras | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |

Tendo em conta que todas as combinações apresentam Sorbato de Potássio, o conservante utilizado pela empresa, os resultados obtidos nos boletins microbiológicos estão dentro do esperado. Como referido na literatura, o Sorbato de Potássio é um sal de ácido sórbico muito utilizado nos produtos alimentares. A atividade dos ácidos orgânicos está relacionada com o pH e a forma não dissociado do ácido, o que leva a que quanto mais baixo for o valor de pH maior a concentração de ácido não dissociado em solução, e, por conseguinte, maior inibição do crescimento microbiano. Atendendo a que o pH das amostras COMB_4, COMB_5 e COMB_6 (ver Figura I.14, **Anexo I**) se encontra dentro dos limites de aceitação para este parâmetro, conclui-se que os resultados obtidos na análise microbiológica se encontram de acordo com o esperado.

Combinações Maionese 65% VinTamp

O facto do conservante natural VinTamp provocar um aumento de pH nas maioneses (ver **Figura 4.1**), devido ao seu efeito tampão, potencia uma alteração na flora microbiana da matriz. Tendo conhecimento dessa modificação, procedeu-se à análise 30 dias após o momento de produção. Os resultados evidenciaram um crescimento de microrganismos a 30°C de <10 UFC/g para 400 UFC/g nas Maioneses 65% VinTamp + Alecrim (COMB_9) e de <10 UFC/g para 260 UFC/g nas Maioneses 65% VinTamp + EDTA (COMB_7) e Maionese 65% VinTamp + XTRA (COMB_8) (**Tabela 4.19**). Relativamente às BAL, bolores e leveduras e *Enterobacteriaceae*, os valores permaneceram inalterados (ver **Tabela 4.20**).

Tabela 4.19 – Resultados dos valores de Microrganismos a 30°C das Maioneses 65% VinTamp ao longo do tempo.

| Microrganismos a 30°C | | | | |
|-----------------------|---------|---------------|---------|---------|
| (UFC/g) | Mês 0 | Mês 1 | Mês 3 | Mês 9 |
| COMB_7 | <1,0E+1 | 2,6E+2 | <1,0E+1 | <1,0E+1 |
| COMB_8 | <1,0E+1 | 2,6E+2 | <1,0E+1 | <1,0E+1 |
| COMB_9 | <1,0E+1 | 4,0E+2 | <1,0E+1 | <1,0E+1 |

Tabela 4.20 - Análise microbiológica das combinações de Maionese 65% VinTamp no mês de produção, no primeiro, terceiro e nono mês de prateleira para os restantes microrganismos.

| COMB_7, COMB_8 e COMB_9 | | | | |
|--------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| (UFC/g) | Mês 0 | Mês 1 | Mês 3 | Mês 9 |
| BAL | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| Bolores e leveduras | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |

Os resultados obtidos ao fim de 3 e 9 meses de prateleira para os Microrganismos a 30°C foram considerados suspeitos, tendo em conta que não foi detetada nenhuma alteração microbiana, o que não era esperado uma vez que as análises realizadas um mês após produção detetaram o seu crescimento. Posto isto, decidiu-se repetir a análise a estas maioneses, mas só houve possibilidade de repetir a COMB_9 visto ser a única disponível no momento. Desta repetição apurou-se um crescimento de M.O 30°C de <10 UFC/g para 270 UFC/g, o que significa que a repetição das análises é uma prática obrigatória para a garantir a veracidade dos valores.

Tendo em conta que, a nível sensorial as combinações de Maionese 65% VinTamp não revelaram qualquer alteração, e que a modificação ao nível microbiano se deve ao aumento de pH, sugere-se como trabalho futuro a adaptação da receita de maionese de forma a utilizar o Vin-Tamp como conservante, sem que este altere excessivamente o pH do produto.

Combinações Maionese 65% ELAL

Quanto às Maioneses 65% ELAL, os resultados obtidos ao fim de 3 e 9 meses de prateleira não revelaram alterações microbianas (ver **Tabela 4.22**), à exceção da amostra Maionese 65% ELAL + EDTA que sofreu um incremento nos valores de M.O 30°C (ver **Tabela 4.21**). Uma possível justificação para esta variação pode estar relacionada com o local de recolha da porção de maionese, um erro associado à contagem de colónias, uma contaminação cruzada e o facto de as leituras não terem sido realizadas em triplicado de forma a criar uma base estatística.

Tabela 4.21 - Resultados dos valores de Microrganismos a 30°C das Maioneses 65% ELAL ao longo do tempo.

| Microrganismos a 30°C | | | |
|------------------------------|--------------|---------------|--------------|
| (UFC/g) | Mês 0 | Mês 3 | Mês 9 |
| COMB_10 | < 1,0E+1 | 6,5E+2 | < 1,0E+1 |
| COMB_11 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| COMB_12 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |

Sabendo que a estabilidade microbiológica das maioneses depende do pH, e que as maioneses suplementados com ELAL apresentam valores de pH entre $3,0 < \text{pH} < 3,2$ (ver **Figura 4.2**), os resultados obtidos encontram-se dentro do esperado. O facto do ELAL apresentar ácido láctico na sua constituição, contribui para o aumento da acidez do produto final e para a sua eficácia na inibição do crescimento microbiano. Por forma a consolidar o conhecimento sobre o efeito inibitório destes conservantes naturais, sugere-se como trabalho futuro uma caracterização dos produtos pela técnica de HPLC, com o intuito de saber a sua composição e perceber a relação entre os compostos ativos e a ação antimicrobiana.

Tabela 4.22 - Análise microbiológica das combinações de Maionese 65% ELAL no mês de produção, no terceiro e nono mês de prateleira para os restantes microrganismos.

| COMB_10, COMB_11 e COMB_12 | | | | |
|-----------------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| (UFC/g) | Mês 0 | Mês 1 | Mês 3 | Mês 9 |
| BAL | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| Bolores e leveduras | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |

4.5.2 Ketchup e Molho 0%

A **Tabela 4.23** apresenta os resultados obtidos na análise microbiológica das amostras de Ketchup. A estabilidade microbiológica deste produto depende do seu pH e do tratamento térmico que sofre durante a sua produção. Por ser um molho não emulsionado, o Ketchup apresenta uma atividade de água ligeiramente superior à da maionese.

Tabela 4.23 - Análise microbiológica das combinações Ketchup no mês de produção, no terceiro e nono mês de prateleira.

| Ket_1, Ket_2 e Ket_3 | | | |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| (UFC/g) | Mês 0 | Mês 3 | Mês 9 |
| M.O 30°C | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| BAL | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| Bolores e leveduras | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |

Pela **Tabela 4.23** é possível concluir que nenhum dos conservantes aplicados permitiu crescimento microbiano ao longo do tempo. O facto de o produto ter sido submetido a um tratamento térmico, com temperaturas entre 60 – 90°C, contribuiu para a eliminação dos possíveis microrganismos existentes, uma vez que os microrganismos passíveis de se desenvolver neste tipo de produtos acaba por morrer devido às altas temperaturas.

Por fim, nas **Tabelas 4.24 e 4.25** estão representados os resultados obtidos na análise microbiológica às combinações de conservante com Molho 0%. O Molho 0%, é um molho não emulsionado, com elevada atividade de água e baixo teor de açúcar, sendo que a sua estabilidade microbiana depende também do pH e do tratamento térmico (60 – 90°C) que sofre aquando da sua produção.

Tabela 4.24 - Resultados dos valores de Microrganismos a 30°C para o Molho 0% ao longo do tempo.

| Microrganismos a 30°C | | | |
|------------------------------|--------------|---------------|--------------|
| (UFC/g) | Mês 0 | Mês 3 | Mês 9 |
| M1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| M2 | < 1,0E+1 | 1,4E+2 | < 1,0E+1 |
| M3 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |

Tabela 4.25 - Análise microbiológica das combinações Molho 0% no mês de produção, no terceiro e nono mês de prateleira para os restantes microrganismos.

| M1, M2 e M3 | | | |
|----------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| (UFC/g) | Mês 0 | Mês 3 | Mês 9 |
| BAL | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| Bolores e leveduras | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 | < 1,0E+1 |

Através das **Tabelas 4.24** e **4.25**, é possível concluir que apenas a amostra M2 sofreu alterações na flora microbiana no terceiro mês de armazenamento. Comparando os resultados obtidos para o pH desta amostra (ver **Figura 4.6**) com os expostos na **Tabela 4.24**, conclui-se que a adição do VinTamp foi a causa do crescimento. Ao elevar o pH para valores próximos do limite máximo aceitável, proporcionou uma ligeira diminuição da acidez, tendo-se verificado por isso um crescimento microbiano nesta amostra. No entanto, para refutar estes resultados e eliminar quaisquer possíveis erros associados, as análises devem ser realizadas em triplicado. Relativamente aos restantes microrganismos, verifica-se pela **Tabela 4.25** que os valores permanecem inalterados ao longo do tempo.

De uma forma geral, e apesar de uma atividade de água mais elevada comparativamente com as restantes matrizes alimentares em estudo, os conservantes naturais testados mostraram ser eficazes quando aplicados no Molho 0%.

5. Conclusões e Propostas de Trabalho futuro

O recurso a aditivos por parte da indústria alimentar contribuiu para a produção de géneros alimentícios atrativos para o consumidor, proporcionando uma garantia na qualidade e segurança alimentar, assim como na integridade das características físico químicas e sensoriais ao longo do tempo e possibilitou ainda o aumento do tempo de prateleira. A utilização destes aditivos está abrangida pela Legislação da União Europeia que apresenta uma lista, dividida por categorias, onde são definidos os limites máximos de utilização de cada aditivo e qual o produto alimentar onde pode ser inserido. Contudo, o consumidor tem-se tornado cada vez mais exigente face às suas escolhas alimentares, procurando produtos mais naturais, com apresentação de rótulos “limpos” (*clean label*), ou seja, sem presença de aditivos sintéticos e sem que seja comprometida a qualidade e a segurança alimentar dos produtos.

De forma a corresponder às exigências do mercado e ir ao encontro dos objetivos da Mendes Gonçalves que rematam para a comercialização de produtos “*clean label*”, os objetivos da presente dissertação apontam para o estudo das alternativas naturais com intuito de substituir os conservantes e antioxidantes sintéticos usados pela empresa, e ainda o estudo da eficácia dos conservantes naturais através de *Challenge test* e acompanhamento microbiológico, bem como o estudo da eficácia dos antioxidantes naturais através do acompanhamento de tempo de vida útil dos produtos.

Foram produzidas Maionese 65% de gordura com diferentes combinações de antioxidante/conservante e Ketchup e Molho 0% com diferentes combinações de conservante. Apesar da literatura relatar a existência de diversos elementos naturais com potencial para substituir os aditivos sintéticos, os conservantes e antioxidantes naturais testados (VinTamp e ELAL; XTRA e Alecrim, respetivamente) constavam no portefólio da empresa. As amostras foram produzidas e acompanhadas ao longo do tempo através da avaliação de parâmetros físico-químicos, sensoriais e microbiológicos. No entanto, e atendendo a que o *shelf life* (tempo de prateleira) das matrizes alimentares produzidas era superior ao período de estágio (Maionese 65%, 9-12 meses; Ketchup e Molho 0%, 12-18 meses), optou-se por colocar algumas das amostras em câmara climática (37°C, 75% humidade e ausência de luz) para simular os resultados ao fim de 9 meses.

Em primeiro lugar, verificou-se que a adição dos conservantes e antioxidantes de origem natural não influenciou significativamente os parâmetros físico químicos, uma vez que os valores obtidos permaneceram dentro dos intervalos de aceitação definidos para cada parâmetro. O pH foi o único parâmetro influenciado pelos conservantes testados ao longo do tempo, sendo o VinTamp caracterizado como um vinagre em pó tamponado e o ELAL, um conservante natural à base de uma mistura de extrato de laranja e ácido láctico. As amostras de Maionese 65%, Ketchup e Molho 0% suplementadas com VinTamp apresentaram valores de pH acima do limite médio de

aceitação ($3,0 < \text{pH} < 4,2$). Em contrapartida, as amostras suplementadas com ELAL evidenciaram valores de pH num intervalo entre $3,0 < \text{pH} < 3,2$, valores estes mais baixos do que o aferido para as amostras padrão, porém dentro dos limites de aceitação. Relativamente ao Molho 0%, os resultados obtidos revelaram uma perda de consistência ao longo do tempo.

Em segundo lugar, a avaliação do Índice de Peróxidos e Índice de p-Anisidina permitiu obter resultados quanto à eficácia dos antioxidantes no desenvolvimento da oxidação lipídica. Para este estudo foi necessária a extração da fase lipídica da maionese, sendo que para isso se recorreu à congelação das Maioneses 65% durante 72h, seguido de 2h a 5°C para descongelar e posterior centrifugação para obtenção do óleo. Dos resultados obtidos verificou-se que o XTRA, um antioxidante alternativo baseado numa mistura de extrato de alecrim e extrato de espinafre, foi o que apresentou um comportamento mais semelhante ao EDTA de cálcio dissódico, exibindo capacidades como antioxidante primário e secundário. Isto leva a que o XTRA seja considerado um potencial substituto para o EDTA. No sentido de compreender a origem do efeito antioxidante, sugere-se como trabalho futuro um estudo da caracterização do XTRA para conhecer a sua composição. Com recurso à técnica analítica de HPLC, esta caracterização permitirá identificar os compostos fenólicos presentes no extrato de espinafre, responsáveis pelo poder antioxidante e ainda, perceber em que concentração se encontra cada extrato e a sua contribuição para o efeito sinérgico final.

Uma vez que o Índice de Peróxidos e Índice de p-Anisidina apenas fornecem informação qualitativa sobre o estado oxidativo da maionese, não revelando a natureza ou concentrações dos compostos formados, recorreu-se à técnica analítica HS SPME GC/MS com coluna capilar polar DB-WAX com intuito de identificar os compostos de oxidação secundários responsáveis pelos odores e aromas desagradáveis na maionese. Pela análise dos cromatogramas das Maioneses 65% sem conservante foram identificados 32 compostos, sendo os aldeídos a classe predominante. Não foi possível eleger o antioxidante mais eficaz, visto que o EDTA e XTRA apresentaram perfis aromáticos muito idênticos. Posto isto, sugere-se um trabalho futuro mais focado na avaliação da influência dos compostos de oxidação secundários nas alterações organolépticas das maioneses, envolvendo mais variáveis como tempos de análise, temperaturas de armazenamento e diferentes concentrações dos antioxidantes.

O acompanhamento sensorial realizado às Maioneses 65% permitiu concluir que as amostras suplementadas com Extrato de Alecrim e ELAL foram as que apresentaram classificações mais baixas logo no início do acompanhamento, uma vez que a sua adição promoveu uma alteração de sabor mesmo na ausência de traços de ranço. Quanto ao Ketchup e Molho 0% apenas as amostras com ELAL foram alvo de críticas por parte dos provadores do IDI familiarizados com o produto, referindo que o conservante conferia um sabor “seco” e desagradável. Relativamente

à cor, as coordenadas CIELab obtidas permitiram o cálculo da variação total de cor (ΔE) para todas as amostras ao longo dos 9 meses. Contrariamente às diferenças colorimétricas entre as amostras de maionese, que mostraram variações pouco significativas, com valores de ΔE compreendidos entre $1 < \Delta E < 3$, as diferenças de cor para as amostras de Ketchup e Molho 0% foram bastante significativas, atingindo valores de ΔE superiores a 5. Esta diferença deve-se ao escurecimento das amostras ao longo do tempo. Sugere-se a realização de ensaios em triplicado de modo a construir uma base estatística que permita excluir qualquer tipo de erro associado. Tendo em conta que a MG contém uma sala de provas, que reúne todas as condições necessárias para a realização de uma análise sensorial, sugere-se a realização desta análise, com um painel de provadores treinado e com um teste específico (Teste Triangular) de forma de aprofundar o estudo ao nível sensorial.

As amostras de Maionese 65%, Ketchup e Molho 0% foram submetidas a análise microbiológica no mês da produção e ao fim de 3 e 9 meses em prateleira. Para a deteção de Microrganismos a 30°C utilizou-se o meio específico *PCA* e as placas foram incubadas a 30°C durante 72h, para Bolores e Leveduras utilizou-se o meio de cultura *DRBC* e as placas foram incubadas a 25°C durante 5 dias, para as Bactérias Ácido Láticas utilizou-se o meio de cultura *MRS* e as placas foram incubadas a 30°C durante 72h e por fim, para a deteção das *Enterobacteriaceae* utilizou-se o meio *VRBG* e as placas foram incubadas a 37°C durante 24h, e como teste de confirmação das colónias, realizaram-se os testes da oxidase e fermentação da glucose. Das amostras de Maionese 65%, apenas as suplementadas com VinTamp mostraram crescimento de microrganismos a 30°C, como o caso da Maionese 65% VinTamp + EDTA, que após um mês da produção, revelou um crescimento de <10 UFC/g para 260 UFC/g. O mesmo se sucedeu para as amostras Molho 0% VinTamp que ao fim de 3 meses em prateleira exibiram um aumento de <10 UFC/g para 140 UFC/g de microrganismos a 30°C. O Ketchup foi a matriz que não sofreu qualquer alteração na flora microbiana ao longo do tempo. Pelas análises realizadas foi possível apurar que a quantidade de VinTamp aplicada promoveu alterações no pH e consequentes modificações na flora microbiana, não tendo revelado alterações ao nível sensorial. Já o ELAL, embora tenha demonstrado bons resultados ao nível do acompanhamento físico-químico e microbiológico, promoveu alterações organolépticas em todas as amostras.

Posto isto, não foi possível apurar qual o conservante com melhor eficácia. Como proposta de trabalho futuro, sugere-se a realização do *Challenge test*. Este teste consiste na inoculação de um microrganismo, de concentração conhecida, na matriz alimentar e posterior acompanhamento de 30 dias com intuito de prever qual a concentração ideal de conservante a aplicar de forma a inibir o crescimento. Sugere-se ainda a caracterização dos conservantes naturais pela técnica de HPLC de forma a conhecer a sua composição, e perceber quais os compostos ativos responsáveis pelo efeito antimicrobiano.

Referências Bibliográficas

- [1] Mendes Gonçalves S.A, “Para onde? | Mendes Gonçalves.” <https://www.mendesgoncalves.pt/pt/para-onde> (accessed Mar. 11, 2020).
- [2] Agrocluster, “Inovação como fator da competitividade na empresa.” <http://club.agrocluster.com/publicacoes/rev1.pdf> (accessed Jan. 07, 2021).
- [3] J. A. Depree and G. . Savage, “Physical and flavour stability of mayonnaise,” *Food Sci. Technol.*, vol. 12, no. 2001, pp. 157–163, 2002, doi: 10.1016/S0924-2244(01)00079-6.
- [4] L. L. Schramm, *Emulsions, Foams, and Suspensions: Fundamentals and Applications*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005.
- [5] M. Mirzanajafi-Zanjani, M. Yousefi, and A. Ehsani, “Challenges and approaches for production of a healthy and functional mayonnaise sauce,” *Food Sci. Nutr.*, vol. 7, no. 8, pp. 2471–2484, 2019, doi: 10.1002/fsn3.1132.
- [6] L. J. Harrison and F. E. Cunningham, “Factors Influencing the Quality of Mayonnaise: a Review,” *J. Food Qual.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–20, 1985, doi: 10.1111/j.1745-4557.1985.tb00828.x.
- [7] H. Liu, X. M. Xu, and S. D. Guo, “Rheological, texture and sensory properties of low-fat mayonnaise with different fat mimetics,” *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 40, no. 6, pp. 946–954, 2007, doi: 10.1016/j.lwt.2006.11.007.
- [8] E. Magnusson, C. Rosén, and L. Nilsson, “Freeze-thaw stability of mayonnaise type oil-in-water emulsions,” *Food Hydrocoll.*, vol. 25, no. 4, pp. 707–715, 2011, doi: 10.1016/j.foodhyd.2010.08.024.
- [9] Y. Maphosa and V. A. Jideani, “Factors Affecting the Stability of Emulsions Stabilised by Biopolymers,” *Sci. Technol. Behind Nanoemulsions*, p. 67, 2018, doi: 10.5772/intechopen.75308.
- [10] D. J. McClements, *Food Emulsions*, 3rd Edition, Florida, CRC Press, 2015.
- [11] D. J. Shaw, “Emulsions and foams,” *Introd. to Colloid Surf. Chem.*, pp. 262–276, 1992, doi: 10.1016/b978-0-08-050910-5.50014-1.
- [12] E. Dickinson, *Hydrocolloids and emulsion stability*. Woodhead Publishing Limited, 2009.
- [13] S. E. Duncan, *Food Processing: Principles and Applications*, 2nd Edition, California: Blackwell Publishing, 2004.

- [14] P. Thanasukarn, R. Pongsawatmanit, and D. J. McClements, "Impact of fat and water crystallization on the stability of hydrogenated palm oil-in-water emulsions stabilized by a nonionic surfactant," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 54, no. 10, pp. 3591–3597, 2006, doi: 10.1021/jf0524630.
- [15] A. Höckergård, "The Freeze-Thaw Stability of Mayonnaise and the Effect of Octenyl Succinic Anhydride Modified Starch as Emulsifier," Tese de Mestrado, Universidade de Linnæus, 2011.
- [16] Y. Miyagawa, T. Ogawa, K. Nakagawa, and S. Adachi, "Destabilization of mayonnaise induced by lipid crystallization upon freezing," *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 80, no. 4, pp. 786–790, 2016, doi: 10.1080/09168451.2015.1123611.
- [17] O. Sagdic, F. Tornuk, S. Karasu, M. Z. Durak, and M. Arici, "Microbial ecology of mayonnaise, margarine, and sauces," *Model. Microb. Ecol. Foods Quant. Microbiol. Food Process.*, pp. 519–532, 2016, doi: 10.1002/9781118823071.ch26.
- [18] Code of Federal Regulations, vol. 2, no. 21, 2019.
- [19] S. Ghorbani Gorji, M. Calingacion, H. E. Smyth, and M. Fitzgerald, "Comprehensive profiling of lipid oxidation volatile compounds during storage of mayonnaise," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 56, no. 9, pp. 4076–4090, 2019, doi: 10.1007/s13197-019-03876-6.
- [20] F. Aladedunye and R. Przybylski, "Frying stability of high oleic sunflower oils as affected by composition of tocopherol isomers and linoleic acid content," *Food Chem.*, vol. 141, no. 3, pp. 2373–2378, 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2013.05.061.
- [21] K. M. Schaich, F. Shahidi, and N. A. M. Eskin, *Biochemistry of Foods*, 3rd Edition, Canada, 2015.
- [22] C. C. Berton-Carabin, M. H. Ropers, and C. Genot, "Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 13, no. 5, pp. 945–977, 2014, doi: 10.1111/1541-4337.12097.
- [23] I. D. Fisk, D. A. White, A. Carvalho, and D. A. Gray, "Tocopherol - An intrinsic component of sunflower seed oil bodies," *JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 83, no. 4, pp. 341–344, 2006, doi: 10.1007/s11746-006-1210-2.
- [24] J. Moore, Z. Hao, K. Zhou, M. Luther, J. Costa, and L. Yu, "Carotenoid, tocopherol, phenolic acid, and antioxidant properties of Maryland-grown soft wheat," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 17, pp. 6649–6657, 2005, doi: 10.1021/jf050481b.
- [25] M. Anton, "Egg yolk: Structures, functionalities and processes," *J. Sci. Food Agric.*, vol.

- 93, no. 12, pp. 2871–2880, 2013, doi: 10.1002/jsfa.6247.
- [26] Z. Ma and J. I. Boye, “Advances in the Design and Production of Reduced-Fat and Reduced-Cholesterol Salad Dressing and Mayonnaise: A Review,” *Food Bioprocess Technol.*, vol. 6, no. 3, pp. 648–670, 2013, doi: 10.1007/s11947-012-1000-9.
- [27] V. D. Kiosseoglou and P. Sherman, “The influence of egg yolk lipoproteins on the rheology and stability of O/W emulsions and mayonnaise,” *Colloid Polym. Sci.*, vol. 261, no. 6, pp. 520–526, 1983, doi: 10.1007/bf01419836.
- [28] C. Bengoechea, M. L. López, F. Cordobés, and A. Guerrero, “Influence of semicontinuous processing on the rheology and droplet size distribution of mayonnaise-like emulsions,” *Food Sci. Technol. Int.*, vol. 15, no. 4, pp. 367–373, 2009, doi: 10.1177/1082013209345046.
- [29] A. Altunkaya, R. V. Hedegaard, J. Harholt, L. Brimer, V. Gökmen, and L. H. Skibsted, “Oxidative stability and chemical safety of mayonnaise enriched with grape seed extract,” *Food Funct.*, vol. 4, no. 11, pp. 1647–1653, 2013, doi: 10.1039/c3fo60204d.
- [30] K. J. Bjorkroth and H. J. Korkeala, “*Lactobacillus fructivorans* spoilage of tomato ketchup,” *J. Food Prot.*, vol. 60, no. 5, pp. 505–509, 1997, doi: 10.4315/0362-028X-60.5.505.
- [31] C. Cancela, “Optimization of pasteurization conditions in the industry of tomato based products”, Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa, pp. 1–10, 2015.
- [32] I. Mladenoska and D. Dimitrovski, “Preliminary evaluation of the antimicrobial activity of some spices used as additives in tomato sauce products,” *Advanced Technologies*, vol. 6, no. 1, pp. 14–18, 2017, doi: 10.5937/savteh1701014M.
- [33] J. Rajchl, Aleš; Voldřich, Michal; Čížková, Helena; Hronová, Michaela; Ševčík, Rudolf; Dobiáš, Jaroslav; Pivoňka, “Stability of nutritionally important compounds and shelf life prediction of tomato ketchup,” *J. Food Eng.*, vol. 99, no. 4, pp. 465–470, 2010, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2010.01.035.
- [34] L. Juszczak, Z. Oczadły, and D. Gałkowska, “Effect of Modified Starches on Rheological Properties of Ketchup,” *Food Bioprocess Technol.*, vol. 6, no. 5, pp. 1251–1260, 2013, doi: 10.1007/s11947-012-0813-x.
- [35] T. Torbica, Aleksandra; Belović, Miona; Mastilović, Jasna; Kevrešan, Žarko; Pestorić, Mladenka; Škrobot, Dubravka; Dapčević Hadnadev, “Nutritional, rheological, and sensory evaluation of tomato ketchup with increased content of natural fibres made from fresh tomato pomace,” *Food Bioprod. Process.*, vol. 98, pp. 299–309, 2016, doi:

10.1016/j.fbp.2016.02.007.

- [36] Regulamento nº 1333/2008, Regulamento (CE) Nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho de 16 de dezembro de 2008 relativo aos aditivos alimentares, *Jornal Oficial da União Europeia*, 2008. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:02008R1333-20160317&from=EN> (accessed Feb. 05, 2020)
- [37] Diretiva 89/107/CEE, Diretiva do Conselho de 21 de Dezembro 1988 relativa à aproximação das legislações dos Estados-membros respeitantes aos aditivos que podem ser utilizados nos géneros destinados à alimentação humana, *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 40/27. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:31989L0107&from=PT> (accessed Feb. 05, 2020).
- [38] S. Romeiro and M. Delgado, “Food Additives: Basic Concepts, Legislation and Controversies,” 2013.
- [39] Regulamento nº 1129/2011, “Regulamento (UE) Nº. 1129/2011 da Comissão de 11 de Novembro de 2011 que altera o anexo II do Regulamento (CE) nº 1333/2008 do Parlamento Europeu e do Conselho mediante o estabelecimento de uma lista da União de aditivos alimentares,” *Jornal. Oficial da União Europeia*, L 295/1, 2011. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011R1129&from=PT> (accessed Feb. 05, 2020)
- [40] ASAE, “Aditivos alimentares mais relevantes no âmbito da segurança alimentar,” 2017. <https://www.asae.gov.pt/seguranca-alimentar/aditivos-alimentares/aditivos-alimentares-mais-relevantes.aspx> (accessed Feb. 05, 2020).
- [41] S. P. Anand and N. Sati, “Artificial Preservatives and Their Harmful Effects: Looking Toward Nature for Safer Alternatives,” *Int. J. Pharm. Sci. Res. IJPSR*, vol. 4, no. 7, pp. 2496–2501, 2013, doi: 10.13040/IJPSR.0975-8232.4(7).24960-01.
- [42] S. K. Amit, M. Uddin, R. Rahman, S. M. R. Islam, and M. S. Khan, “A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing,” *Agric. Food Secur.*, vol. 6, no. 51, pp. 1 - 22, 2017, doi: 10.1186/s40066-017-0130-8.
- [43] J. Fialová, J. Chumchalová, K. Miková, and I. Hrušová, “Effect of food preservatives on the growth of spoilage lactobacilli isolated from mayonnaise-based sauces,” *Food Control*, vol. 19, no. 7, pp. 706–713, 2008, doi: 10.1016/j.foodcont.2007.07.018.
- [44] P. A. Marechal, I. Martínez de Marnañón, I. Poirier, and P. Gervais, “The importance of the kinetics of application of physical stresses on the viability of microorganisms:

- Significance for minimal food processing,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 10, no. 1, pp. 15–20, 1999, doi: 10.1016/S0924-2244(99)00012-6.
- [45] J. M. Jay, M. J. Loessner, and D. A. Golden, *Modern Food Microbiology*, 7th Edition, Springer, New York, 2005.
- [46] M. E. Camire, “Evaluation and Definition of Potentially Hazardous” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 2, no. 223, pp. 46–50, 2001.
- [47] M. Landgraf, “Deterioração Microbiana de Alimentos” *Microbiol. dos Aliment.*, pp. 93–108, 1996.
- [48] T. Hottiger, P. Schmutz, and A. Wiemken, “Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Bacteriol.*, vol. 169, no. 12, pp. 5518–5522, 1987, doi: 10.1128/jb.169.12.5518-5522.1987.
- [49] J. E. Henney, C. L. Taylor, and C. S. Boon, *Strategies to Reduce Sodium Intake in the United States*. Washington DC: The National Academies Press, 2010.
- [50] E. Sandulachi, “Water Activity and Its Role in Food Preservation”, Technical University of Moldova, no. 15, pp. 40–47, 2012.
- [51] J. Chirife, M. S. Vigo, R. G. Gomez, and G. J. Favetto, “Water Activity and Chemical Composition of Mayonnaises,” *J. Food Sci.*, vol. 54, no. 6, pp. 1658–1659, 1989, doi: 10.1111/j.1365-2621.1989.tb05184.x.
- [52] M. R. Kasaai, “Use of water properties in food technology: A global view,” *Int. J. Food Prop.*, vol. 17, no. 5, pp. 1034–1054, 2014, doi: 10.1080/10942912.2011.650339.
- [53] N. Beales, “Adaptation of Microorganisms to Cold Temperatures, Weak Acid Preservatives, Low pH and Osmotic Stress: A review,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 3, no. 7, pp. 6–11, 2004, doi: 10.15036/arerugi.33.369.
- [54] C. Kim, K. Wilkins, M. Bowers, C. Wynn, and E. Ndegwa, “Influence of pH and Temperature on Growth Characteristics of Leading Foodborne Pathogens in a Laboratory Medium and Select Food Beverages,” *Austin Food Sci.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–8, 2018.
- [55] C. Jacobsen, M. Timm, and A. S. Meyer, “Oxidation in Fish Oil Enriched Mayonnaise : Ascorbic Acid and Low pH Increase Oxidative Deterioration,” *J. Agric. Food Chem.*, no. 49, pp. 3947–3956, 2001, doi: 10.1021/jf001253e
- [56] J. I. Pitt and A. D. Hocking, *Fungi and Food Spoilage*, 3rd Edition, Springer, 2009.
- [57] M. S. University, “Factors that Influence Microbial Growth: in Safe Practices for food

- processes,” *Microbiol. food*, 2001.
- [58] S. Toroglu, “Survival of acid-adapted and non-adapted *Staphylococcus aureus* in various food samples,” *Ann. Microbiol.*, vol. 56, no. 1, pp. 25–27, 2006, doi: 10.1007/BF03174965.
- [59] A. Vermeulen, “Microbial stability and safety of acid sauces and mayonnaise-based salads assessed through probabilistic growth/no growth models”, PhD Thesis, University of Gent, 2008.
- [60] P. Martorell, M. Stratford, H. Steels, M. T. Fernández-espinar, and A. Querol, “Physiological characterization of spoilage strains of *Zygosaccharomyces bailii* and *Zygosaccharomyces rouxii* isolated from high sugar environments”, *International Journal of Food Microbiology*, vol. 114, pp. 234–242, 2007, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.09.014.
- [61] M. Palma, J. F. Guerreiro, and I. Sá-correia, “Adaptive Response and Tolerance to Acetic Acid in *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii*: A Physiological Genomics Perspective,” *Front. Microbiol.*, vol. 9, no. 274, pp. 1–16, 2018, doi: 10.3389/fmicb.2018.00274.
- [62] P. Jenkins, P. G. Poulos, M. B. Cole, M. H. Vandeven, and J. D. Legan, “The Boundary for Growth of *Zygosaccharomyces bailii* in Acidified Products Described by Models for Time to Growth and Probability of Growth,” *J. Food Prot.*, vol. 63, no. 2, pp. 222–230, 2000, doi: 10.4315/0362-028X-63.2.222.
- [63] G. M. Adamo, D. Porro, and P. Branduardi, “The spoilage yeast *Zygosaccharomyces bailii*: Foe or friend?,” *Yeast*, vol. 34, pp. 359–370, 2017, doi: 10.1002/yea.3238.
- [64] W. Emmerich and F. Radler, “The Anaerobic Metabolism of Glucose and Fructose by *Sucharomyces bailii*,” *J. Gen. Microbiol.*, vol. 129, pp. 3311–3318, 1983.
- [65] ICMSF, *Microrganisms in foods*, 2nd Edition. Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2005.
- [66] D. . Ratkowsky, J. Olley, T. A. McMeekin, and A. Ball, “Relationship Between Temperature and Growth Rate of Bacterial Cultures”, *Journal of Bacteriology*, vol. 149, no. 1, pp. 1–5, 1982.
- [67] R. J. Lambert and M. Stratford, “Weak-acid preservatives: Modelling microbial inhibition and response,” *J. Appl. Microbiol.*, vol. 86, no. 1, pp. 157–164, 1999, doi: 10.1046/j.1365-2672.1999.00646.x.

- [68] C. Vargas, *Organic Acids - Characteristics, Properties and Synthesis*. New York: Nova Science Publishers, Inc, 2016.
- [69] A. Lianou, K. P. Koutsoumanis, and J. N. Sofos, "Organic acids and other chemical treatments for microbial decontamination of food," *Microbial Decontamination in the Food Industry: Novel Methods and Applications*, pp. 592–664, 2012, doi: 10.1533/9780857095756.3.592.
- [70] A. Plumridge, S. J. A. Hesse, A. J. Watson, K. C. Lowe, M. Stratford, and D. B. Archer, "The Weak-Acid Preservative Sorbic Acid Inhibits Conidial Germination and Mycelial Growth of *Aspergillus niger* through Intracellular Acidification," *J. Biol. Chem.*, vol. 70, no. 6, pp. 3506–3511, 2004, doi: 10.1128/AEM.70.6.3506.
- [71] S. C. Ricke, "Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials," *Poult. Sci.*, vol. 82, no. 4, pp. 632–639, 2003, doi: 10.1093/ps/82.4.632.
- [72] G. D. Saraiva *et al.*, "Temperature-dependent vibrational spectroscopic study and DFT calculations of the sorbic acid," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 137, pp. 1409–1416, 2015, doi: 10.1016/j.saa.2014.08.142.
- [73] M. A. Liebert, "Final Report on the Safety Assessment of Sorbic Acid and Potassium Sorbate," *J. Am. Coll. Toxicol.*, vol. 7, no. 6, pp. 837–872, 1988, doi: 10.3109/10915818809078711.
- [74] B. Ray and A. Bhunia, *Fundamental Food Microbiology*, 5th Edition. CRC Press, 2014.
- [75] C. E. Wind and R. Lawrence, "Antimicrobial effectiveness of potassium sorbate and sodium benzoate against *zygosaccharomyces bailii* in a salsa mayonnaise," *J. Food Prot.*, vol. 58, no. 11, pp. 1257–1259, 1995, doi: 10.4315/0362-028X-58.11.1257.
- [76] A. O. Santini, H. R. Pezza, J. Carloni-filho, R. Sequinel, and L. Pezza, "Potentiometric sensor for sorbic acid determination in food products," *Food Chem.*, vol. 115, no. 4, pp. 1563–1567, 2009, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.02.012.
- [77] J. N. Sofos and F. F. Busta, "Antimicrobial Activity of Sorbate," *J. Food Prot.*, vol. 44, no. 8, pp. 614–622, 1981, doi: 10.4315/0362-028x-44.8.614.
- [78] M. S. Rahman, *Hanbook of Food Preservation*, 2nd Edition. CRC Press, 2007.
- [79] E. J. Quinto, I. Caro, L. H. Villalobos-Delgado, J. Mateo, B. De-Mateo-silleras, and M. P. Redondo-Del-río, "Food safety through natural antimicrobials," *Antibiotics*, vol. 8, no. 4, pp. 1–30, 2019, doi: 10.3390/antibiotics8040208.
- [80] M. S. Arshad and S. A. Batool, "Natural Antimicrobials, their Sources and Food Safety,"

Food Addit., 2017, doi: 10.5772/intechopen.70197.

- [81] K. L. Compean and R. A. Ynalvez, “Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: A review,” *Res. J. Med. Plant*, vol. 8, no. 5, pp. 204–213, 2014, doi: 10.3923/rjmp.2014.204.213.
- [82] N. Lee and H. Paik, “Status , Antimicrobial Mechanism , and Regulation of Natural Preservatives in Livestock Food Systems,” *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.*, vol. 36, no. 4, pp. 547–557, 2016, doi: 10.5851/kosfa.2016.36.4.547.
- [83] S. Burt, “Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review,” *Int. J. Food Microbiol.*, vol. 94, no. 3, pp. 223–253, 2004, doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- [84] M. Hyldgaard, T. Mygind, and R. L. Meyer, “Essential oils in food preservation: Mode of action, synergies, and interactions with food matrix components,” *Front. Microbiol.*, vol. 3, no. 12, 2012, doi: 10.3389/fmicb.2012.00012.
- [85] M. Y. Memar, P. Raei, N. Alizadeh, M. A. Aghdam, and H. S. Kafil, “Carvacrol and thymol: Strong antimicrobial agents against resistant isolates,” *Rev. Med. Microbiol.*, vol. 28, no. 2, pp. 63–68, 2017, doi: 10.1097/MRM.0000000000000100.
- [86] B. J. Juven, J. Kanner, F. Schved, and H. Weisslowicz, “Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents,” *J. Appl. Bacteriol.*, vol. 76, no. 6, pp. 626–631, 1994, doi: 10.1111/j.1365-2672.1994.tb01661.x.
- [87] S. Roller and N. Covill, “The Antimicrobial Properties of Chitosan in Mayonnaise and Mayonnaise-Based Shrimp Salads,” *J. Food Prot.*, vol. 63, no. 2, pp. 202–209, 2000, doi: 10.4315/0362-028x-63.2.202.
- [88] H. Il Oh, Y. J. Kim, E. J. Chang, and J. Y. Kim, “Antimicrobial Characteristics of Chitosans against Food Spoilage Microorganisms in Liquid Media and Mayonnaise,” *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 65, no. 11, pp. 2378–2838, 2001, doi: 10.1271/bbb.65.2378.
- [89] M. A. Milani, M. Mizani, M. Ghavami, and P. Eshratbadi, “Comparative analysis of antimicrobial characteristics of mustard paste and powder in mayonnaise” *Eur. J. Exp. Biol.*, vol. 4, no. 2, pp. 412–418, 2014.
- [90] M. Ahmed, J. Pickova, T. Ahmad, M. Liaquat, A. Farid, and M. Jahangir, “Oxidation of Lipids in Foods,” *Sarhad J. Agric.*, vol. 32, no. 3, pp. 230–238, 2016, doi: 10.17582/journal.sja/2016.32.3.230.238.

- [91] F. Shahidi and Y. Zhong, "Lipid oxidation and improving the oxidative stability," *Chem. Soc. Rev.*, no. 39, pp. 4067–4079, 2010, doi: 10.1039/b922183m.
- [92] B. Chen, D. J. McClements, and E. A. Decker, "Oxidation in Different Food Matrices: How Physical Structure Impacts Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions and Bulk Oils," in *Lipid Oxidation: Challenges in Food Systems*, AOCS Press, 2013, pp. 129–154.
- [93] S. Ghorbani Gorji, H. E. Smyth, M. Sharma, and M. Fitzgerald, "Lipid oxidation in mayonnaise and the role of natural antioxidants: A review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 56, pp. 88–102, 2016, doi: 10.1016/j.tifs.2016.08.002.
- [94] S. P. J. N. Senanayake, "Green tea extract : Chemistry , antioxidant properties and food applications – A review," *J. Funct. Foods*, pp. 1–13, 2013, doi: 10.1016/j.jff.2013.08.011.
- [95] J. N. Coupland and D. J. McClements, "Lipid oxidation in food emulsions," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 7, no. 3, pp. 83–91, 1996, doi: 10.1016/0924-2244(96)81302-1.
- [96] I. A. Gomes, S. Gomes, O. Freitas-silva, and J. Passos, "Ingredients of mayonnaise : Future perspectives focusing on essential oils to reduce oxidation and microbial counts," vol. 67, no. 1, 2017.
- [97] K. M. Schaich, *Lipid Oxidation: New Perspectives on an Old Reaction*, 7th Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, Ltd, 2020.
- [98] M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, and K. Robards, "Methods for testing antioxidant activity," *Analyst*, vol. 127, no. 1, pp. 183–198, 2002, doi: 10.1039/b009171p.
- [99] E. N. Frankel, "Lipid Oxidation," *Progress Lipid Res.*, vol. 19, pp. 1–22, 1980.
- [100] D. R. Johnson and E. A. Decker, "The Role of Oxygen in Lipid Oxidation Reactions: A Review," *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, vol. 6, no. 1, pp. 171–190, 2015, doi: 10.1146/annurev-food-022814-015532.
- [101] O. R. Fennema, "Introducción a la química de los alimentos," *Química los Aliment.*, pp. 1-500, 1993.
- [102] I. C. Morales-Aizpurúa and A. Tenuta-Filho, "Oxidation of cholesterol in mayonnaise during storage," *Food Chem.*, vol. 89, no. 4, pp. 611–615, 2005, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.03.016.
- [103] Y. -T Li Hsieh and J. M. Regenstein, "Factors Affecting Quality of Fish Oil Mayonnaise," *J. Food Sci.*, vol. 56, no. 5, pp. 1298–1301, 1991, doi: 10.1111/j.1365-2621.1991.tb04757.x.

- [104] E. Choe and D. B. Min, "Mechanisms and Factors for Edible Oil Oxidation," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 5, no. 4, pp. 169–186, 2006, doi: 10.1111/j.1541-4337.2006.00009.x.
- [105] M. Lennersten and H. Lingnert, "Influence of Wavelength and Packaging Material on Lipid Oxidation and Colour Changes in Low-fat Mayonnaise," *Leb. und-Technologie*, vol. 33, no. 4, pp. 253–260, 2000, doi: 10.1006/fstl.2000.0660.
- [106] E. Widerström and R. Öhman, "Quality and Catastrophic Phase Inversion," Master Thesis, Department of Food Technology, Engineering and Nutrition, Lund Univerisity, 2017.
- [107] M. Pateiro, M. Gagaoua, F. J. Barba, W. Zhang, and J. M. Lorenzo, "A Comprehensive Review on Lipid Oxidation in Meat and Meat Products," *Antioxidants*, vol. 8, no. 429, pp. 1–31, 2019, doi: 10.3390/antiox8100429.
- [108] M. Kozłowska and E. Gruczyńska, "Comparison of the oxidative stability of soybean and sunflower oils enriched with herbal plant extracts," *Chem. Pap.*, vol. 72, pp. 2607–2615, 2018, doi: 10.1007/s11696-018-0516-5.
- [109] R. D. O'Brien, *Fats and Oils - Formulating and Processing Applications*, 3rd Edition. CRC Press, Florida, 2009.
- [110] E. Choe and D. B. Min, "Mechanisms of Antioxidants in the Oxidation of Foods," *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 8, no. 4, pp. 345–358, 2009, doi: 10.1111/j.1541-4337.2009.00085.x.
- [111] E. Wasowicz, A. Gramza, M. Hes, M. Malecka, and H. H. Jelen, "Oxidation of lipids in food systems," *Polish J. Food Nutr. Sci.*, vol. 13, no. 54, pp. 87–100, 2004.
- [112] D. J. McClements and E. A. Decker, "Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems," *J. Food Sci.*, vol. 65, no. 8, pp. 1270–1282, 2000, doi: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb10596.x.
- [113] R. I. Nahas, "Natural antioxidants as food and beverage ingredients," in *Natural Food Additives, Ingredients and Flavourings*, USA: Woodhead Publishing Limited, 2012, pp. 100–126, doi: 10.1533/9780857095725.1.100.
- [114] I. Gülçin, "Antioxidant activity of food constituents: An overview," *Arch. Toxicol.*, vol. 86, no. 3, pp. 345–391, 2012, doi: 10.1007/s00204-011-0774-2.
- [115] P. Anbudhasan, A. Surendraraj, S.Karkuzhali, and S. Sathishkumaran, "Natural Antioxidants and Its Benefits," *Int. J. Food Nutr. Sci.*, vol. 3, no. 6, pp. 225–232, 2014.
- [116] M. Taghvaei and S. M. Jafari, "Application and stability of natural antioxidants in edible

- oils in order to substitute synthetic additives,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 52, no. 3, pp. 1272–1282, 2015, doi: 10.1007/s13197-013-1080-1.
- [117] F. A. Andersen, “Final report on the safety assessment of Butylated Hydroxyanisole,” *Int. J. Toxicol.*, vol. 3, no. 5, pp. 83–132, 1984, doi: 10.1080/10915810802550835.
- [118] R. Venkatesh and D. Sood, “A Review of the Physiological Implications of Antioxidants in Food,” Degree of Bachelor Science, Worcester Polytechnic Institute, 2011.
- [119] C. Jacobsen, X. Xu, N. S. Nielsen, and M. Timm-Heinrich, “Oxidative stability of mayonnaise containing structured lipids produced from sunflower oil and caprylic acid,” *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 105, no. 8, pp. 449–458, 2003, doi: 10.1002/ejlt.200300796.
- [120] J. Aaneby, “Iron Catalyzed Lipid Oxidation in Emulsions and the Influence of Antioxidants,” Master Thesis, Department of Biotechnology, Norwegian University of Science and Technology Department, 2012.
- [121] J. Alamed, D. J. McClements, and E. A. Decker, “Influence of heat processing and calcium ions on the ability of EDTA to inhibit lipid oxidation in oil-in-water emulsions containing omega-3 fatty acids,” *Food Chem.*, vol. 95, no. 4, pp. 585–590, Apr. 2006, doi: 10.1016/j.foodchem.2005.01.041.
- [122] A. S. Jacobsen, Charlotte; Hartvigsen, Karsten; Thomsen, Marianne K.; Hansen, Lotte F.; Lund, Pia; Skibsted, Leif H.; Hølmer, Gunhild; Adler-Nissen, Jens; Meyer, “Lipid oxidation in fish oil enriched mayonnaise: Calcium disodium ethylenediaminetetraacetate, but not gallic acid, strongly inhibited oxidative deterioration,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 2, pp. 1009–1019, 2001, doi: 10.1021/jf000729r.
- [123] M. B. Let, C. Jacobsen, and A. S. Meyer, “Ascorbyl palmitate, γ -tocopherol, and EDTA affect lipid oxidation in fish oil enriched salad dressing differently,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 6, pp. 2369–2375, 2007, doi: 10.1021/jf062675c.
- [124] M. K. Thomsen, C. Jacobsen, and L. H. Skibsted, “Mechanism of initiation of oxidation in mayonnaise enriched with fish oil as studied by electron spin resonance spectroscopy,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 211, no. 6, pp. 381–386, 2000, doi: 10.1007/s002170000199.
- [125] L. G. West, R. C. Dinwoodie, and I. C. Tsui, “Oxidation Stability Using Natural Antioxidants”, US 2010/0028518 A1, Feb. 4, 2010.
- [126] “Antioxidantes Naturais,” *Aditivos e ingredientes*, no. 20, pp. 20–34, 2014.

- [127] J. Pokorný, “Are natural antioxidants better - and safer - Than synthetic antioxidants?,” *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, vol. 109, no. 6, pp. 629–642, 2007, doi: 10.1002/ejlt.200700064.
- [128] S. A. Rather, F. A. Masoodi, R. Akhter, J. A. Rather, and K. A. Shiekh, “Advances in use of Natural Antioxidants as Food additives for improving the Oxidative Stability of Meat Products,” *Madridge J. Food Technol.*, vol. 1, no. 1, pp. 10–17, 2016, doi: 10.18689/mjft-1000102.
- [129] M. S. Brewer, “Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications,” *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 10, no. 4, pp. 221–247, 2011, doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x.
- [130] J. A. Teixeira, Bárbara; Marques, António; Ramos, Cristina; Serrano, Carmo; Matos, Olívia; Neng, Nuno R.; Nogueira, José M.F.; Saraiva, “Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil,” *J. Sci. Food Agric.*, vol. 93, no. 11, pp. 2707–2714, 2013, doi: 10.1002/jsfa.6089.
- [131] M. Gaare, A. Hussain, G. Angad, and D. Veterinary, “Natural Antimicrobials For preservation of Food”, Department of Dairy & Food Microbiology, India, 2013.
- [132] Y. F. M. Kishk and H. E. Elsheshetawy, “Effect of ginger powder on the mayonnaise oxidative stability, rheological measurements, and sensory characteristics,” *Ann. Agric. Sci.*, vol. 58, no. 2, pp. 213–220, 2013, doi: 10.1016/j.aosas.2013.07.016.
- [133] M. Garcí, Y. Silva, and A. Casariego, “Development of a mayonnaise with chitosan as natural antioxidant,” *J. Food Sci. Technol.*, vol. 26, no. 10, pp. 835–843, 2014, doi: 10.9755/ejfa.v26i10.17867.
- [134] M. Kumuda, K. Dhanapal, K. Sravani, and K. Madhavi, “Studies on the Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosemarinus officinalis*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Extracts,” vol. 6, no. 12, pp. 3253–3261, 2017, doi: 10.20546/ijcmas.2017.612.378.
- [135] Y. Yang *et al.*, “Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability,” *Ind. Crop. Prod.*, vol. 80, pp. 141–147, 2016, doi: 10.1016/j.indcrop.2015.11.044.
- [136] S. P. J. N. Senanayake, “Rosemary extract as a natural source of bioactive compounds,” pp. 51–57, 2018, doi: 10.31665/JFB.2018.2140.
- [137] G. Nieto, G. Ros, and J. Castillo, “Antioxidant and Antimicrobial Properties of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.): A Review,” *Medicin*, vol. 5, no. 98, pp. 1–13, 2018, doi:

10.3390/medicines5030098.

- [138] M. G. Gallego, M. H. Gordon, F. J. Segovia, M. Skowrya, and M. P. Almajano, “Antioxidant properties of three aromatic herbs (rosemary, thyme and lavender) in oil-in-water emulsions,” *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 90, no. 10, pp. 1559–1568, 2013, doi: 10.1007/s11746-013-2303-3.
- [139] Y. Zhang, L. Yang, Y. Zu, X. Chen, F. Wang, and F. Liu, “Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during accelerated storage,” *Food Chem.*, vol. 118, no. 3, pp. 656–662, 2010, doi: 10.1016/j.foodchem.2009.05.038.
- [140] N. F. Santos-Sánchez, R. Salas-Coronado, R. Valadez-Blanco, B. Hernández-Carlos, and P. C. Guadarrama-Mendoza, “Natural antioxidant extracts as food preservatives,” *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, vol. 16, no. 4, pp. 361–370, 2017, doi: 10.17306/J.AFS.0530.
- [141] A. E. Abdalla and J. P. Roozen, “Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion,” *Food Chem.*, vol. 64, no. 3, pp. 323–329, 1999, doi: 10.1016/S0308-8146(98)00112-5.
- [142] K. S. Sonam and S. Guleria, “Annals of pharmacology and pharmaceutics synergistic antioxidant activity of natural products,” *Ann. Pharmacol. Pharm.*, vol. 2, no. 8, pp. 1–6, 2017.
- [143] J. Yin, E. M. Becker, M. L. Andersen, and L. H. Skibsted, “Green tea extract as food antioxidant. Synergism and antagonism with α -tocopherol in vegetable oils and their colloidal systems,” *Food Chem.*, vol. 135, no. 4, pp. 2195–2202, 2012, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.07.025.
- [144] E. C. Zuleta, L. Baena, L. A. Rios, and J. A. Calderón, “The oxidative stability of biodiesel and its impact on the deterioration of metallic and polymeric materials: A review,” *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 23, no. 12, pp. 2159–2175, 2012, doi: 10.1590/S0103-50532012001200004.
- [145] B. Barriuso, I. Astiasarán, and D. Ansorena, “A review of analytical methods measuring Lipid Oxidation status in foods: A Challenging Task,” *J. Japanese Soc. Pediatr. Surg.*, 2013, doi: 10.11164/jjsps.3.2_349_1.
- [146] L. Manzocco, S. Calligaris, M. Anese, and M. C. Nicoli, “Determination and Prediction of Shelf Life of Oils/Fats and Oil/Fat-Based Foods,” in *Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats*, pp. 133–156, 2016, doi: 10.1016/B978-1-63067-056-6.00002-1.

- [147] L. Lagunes-Galvez, M. E. Cuvelier, C. Ordonnaud, and C. Berset, "Oxidative stability of some mayonnaise formulations during storage and daylight irradiation," *J. Food Lipids*, vol. 9, no. 3, pp. 211–224, 2002, doi: 10.1111/j.1745-4522.2002.tb00220.x.
- [148] I. F. Association, "Determination of the Peroxide Value," 2019.
- [149] C. C. Akoh and D. B. Min, *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, Biotechnology*, 2nd Edition. New York: Marcel Dekker, Inc, 2002.
- [150] F. A. M. Silva, M. F. M. Borges, and M. A. Ferreira, "Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante," *Quim. Nova*, vol. 22, no. 1, pp. 94–103, 1999, doi: 10.1590/s0100-40421999000100016.
- [151] R. Agregán, P. E. Munekata, R. Domínguez, J. Carballo, D. Franco, and J. M. Lorenzo, "Proximate composition, phenolic content and in vitro antioxidant activity of aqueous extracts of the seaweeds *Ascophyllum nodosum*, *Bifurcaria bifurcata* and *Fucus vesiculosus*. Effect of addition of the extracts on the oxidative stability of canola oil unde," *Food Res. Int.*, vol. 99, pp. 986–994, 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2016.11.009.
- [152] N. Tadesse, N. Reta, and N. Beyero, "Level of Saturation and Anti-Oxidant Value of Heat and Spice Treated Animal Butter," *Food public Heal.*, vol. 7, no. 4, pp. 81–90, 2017, doi: 10.5923/j.fph.20170704.02.
- [153] P. T. Service, "Defining and Communicating Color : The CIELAB System," *Sappi Fine Paper North America*. pp. 1–8, 2013.
- [154] M. H. H. Amin, A. E. Elbeltagy, M. Mustafa, and A. H. Khalil, "Development of low fat mayonnaise containing different types and levels of hydrocolloid gum Sensory optimization of low fat mayonnaise (different oils and gums)," *J. Agroaliment. Process. Technol.*, vol. 20, no. 1, pp. 54–63, 2014.
- [155] N. L. Višnja M. Sikimić, Jovanka V. Popov-Raljić, Branislav P. Zlatković, "Sensors & Transducers," vol. 112, no. 1, pp. 138–163, 2010.
- [156] D. Man, *FOOD INDUSTRY BRIEFING SERIES: SHELF LIFE*, 1st Edition: Blackwell Science Ltd, London, 2002.
- [157] B. M. Mackey, *The Microbiological Safety and Quality of Food*. Maryland: Aspen Publishers, Inc., 2000.
- [158] I. Heertje, "Structure and function of food products: A review," *Food Struct.*, vol. 1, no. 1, pp. 3–23, 2014, doi: 10.1016/j.foostr.2013.06.001.
- [159] P. Partal, A. Guerrero, M. Berjano, and C. Gallegos, "Influence of concentration and

- temperature on the flow behavior of oil-in-water emulsions stabilized by sucrose palmitate,” *JAACS, J. Am. Oil Chem. Soc.*, vol. 74, no. 10, pp. 1203–1212, 1997, doi: 10.1007/s11746-997-0046-8.
- [160] O. Paananen, “Effects of Changes in Production on Stability of Mayonnaise”, Master Thesis, Department of Biochemistry, University of Turku, 2017.
- [161] M. Toledo, “Density and Refractometry,” 2014.
- [162] C. Skiera, P. Steliopoulos, T. Kuballa, U. Holzgrabe, and B. Diehl, “H NMR approach as an alternative to the classical p-anisidine value method,” *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 235, no. 6, pp. 1101–1105, 2012, doi: 10.1007/s00217-012-1841-5.
- [163] T. N. Semb, “Analytical Methods for Determination of the Oxidative Status in Oils,” Master Thesis, Department of Biotechnology, Norwegian University of Science and Technology, 2012.
- [164] A. A. Hassan, N. M. Rasmy, M. I. Foda, and M. M. El-Moghazy, “Assessment of the Antioxidant Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.) Extracts on the Shelf Life of Mayonnaise,” *World J. Dairy Food Sci.*, vol. 7, no. 1, pp. 28–40, 2012, doi: 10.5829/idosi.wjdfs.2012.7.1.1103.
- [165] S. P. J. N. Senanayake, *Rosemary and Green Tea Extracts as Natural Antioxidants Chemistry, Technology, and Applications*. AOCS Press, 2014.
- [166] G. Vas and K. Vékey, “Solid-phase microextraction: A powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 39, no. 3, pp. 233–254, 2004, doi: 10.1002/jms.606.
- [167] R. E. Shirey, *SPME Commercial Devices and Fibre Coatings*. Elsevier Inc., 2012.
- [168] C. Scientific, “DB-Wax High Polarity GC Columns from Agilent.” <https://www.crawfordscientific.com/products/gc-columns/high-polarity/agilent-technologies/db-j-w/db-wax> (accessed Mar. 14, 2021).
- [169] L. Xu, X. Yu, M. Li, J. Chen, and X. Wang, “Monitoring oxidative stability and changes in key volatile compounds in edible oils during ambient storage through HS-SPME/GC–MS,” *Int. J. Food Prop.*, vol. 20, no. 3, pp. S2926–S2938, 2018, doi: 10.1080/10942912.2017.1382510.
- [170] X. Wang, C. Ho, and F. Shahidi, “Flavor Components of Fats and Oils,” *Bailey’s Ind. Oil Fat Prod.*, pp. 1–25, 2020, doi: 10.1002/047167849X.bio009.pub2.
- [171] L. Xu, X. Yu, M. Li, J. Chen, and X. Wang, “Monitoring oxidative stability and changes

- in key volatile compounds in edible oils during ambient storage through HS-SPME / GC – MS,” *Int. J. Food Prop.*, vol. 20, no. 3, pp. 2926–2938, 2018, doi: 10.1080/10942912.2017.1382510.
- [172] F. Shahidi and A. Abad, *Lipid-derived flavours and off-flavours in food*. Elsevier, pp 182-192, 2018, doi: 10.1016/B978-0-08-100596-5.21666-1.
- [173] R. Wagner, M. A. A. P. da Silva, and M. R. B. Franco, “Volatile compounds important to the aroma of Italian type Salami: Assessment by osme and detection frequency techniques,” *Expr. Multidiscip. Flavour Sci. (12th Weurman Symp.)*, vol. 1, p. 465, 2008.
- [174] Y. Xueping, C. Long, S. Long, and T. Qunyi, “Volatile Compounds Analysis and Off-Flavors Removing of Porcupine Liver,” *Food Sci. Technol. Res.*, vol. 22, no. 2, pp. 283–289, 2016, doi: 10.3136/fstr.22.283.
- [175] A. De-la-Fuente-Blanco and F. Vicente, “Gas Chromatography Olfactometry (GC-O) for the (Semi)Quantitative Screening of Wine Aroma,” *Foods*, vol. 9, no. 1892, pp 1-20, 2020, doi: 10.3390/foods9121892.
- [176] T. Feng, M. Shui, S. Song, H. Zhuang, M. Sun, and L. Yao, “Characterization of the key aroma compounds in three truffle varieties from China by flavoromics approach,” *Molecules*, vol. 24, no. 18, 2019, doi: 10.3390/molecules24183305.
- [177] H. N. Mohamed, Y. C. Man, S. Mustafa, and Y. A. Manap, “Tentative Identification of Volatile Flavor Compounds in Commercial Budu, a Malaysian Fish Sauce, Using GC-MS,” *Molecules*, vol. 17, pp. 5064–5067, 2012, doi: 10.3390/molecules17055062.
- [178] R. A. M.T. Morales, G. Luna, “Comparative study of virgin olive oil sensory defects,” *Food Chem.*, vol. 91, pp. 293–301, 2005, doi: 10.1016/j.foodchem.2004.06.011.
- [179] K. D. Petersen, K. K. Kleeberg, G. Jahreis, and J. Fritsche, “Assessment of the oxidative stability of conventional and high-oleic sunflower oil by means of solid-phase microextraction-gas chromatography,” *Int. J. Food Sci. Nutr.*, vol. 63, no. 2, pp. 3–6, 2011, doi: 10.3109/09637486.2011.609158.
- [180] J. L. and H.-L. S. Xiao Yang, Fan Yang, Ye Liu, “Identification of Key Off-Flavor Compounds in Thermally Treated Watermelon Juice via Gas,” *Foods*, vol. 9, no. 227, pp. 3–8, 2020.
- [181] R. L. R. Áslaug Hognadóttir, “Identification of aroma active compounds in orange essence oil using gas chromatography – olfactometry and gas chromatography – mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 998, p. 206, 2003.

- [182] S. S. Mahajan, L. Goddik, and M. C. Qian, "Aroma Compounds in Sweet Whey Powder," *J. Dairy Sci.*, vol. 87, no. 12, pp. 4057–4063, 2004, doi: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73547-X.
- [183] F. Chemat, I. Grondin, P. Costes, L. Moutoussamy, A. S. C. Sing, and J. Smadja, "High power ultrasound effects on lipid oxidation of refined sunflower oil," *Ultrason. Sonochem.*, vol. 11, no. 5, p. 284, 2004, doi: 10.1016/j.ultsonch.2003.07.004.
- [184] C. V. Corrales *et al.*, "Key odor and physicochemical characteristics of raw and roasted jicaro seeds (*Crescentia alata* K.H.B.)," *Food Res. Int.*, vol. 96, p. 118, 2017, doi: 10.1016/j.foodres.2017.03.009.
- [185] V. I. Babushok, P. J. Linstrom, and I. G. Zenkevich, "Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils," *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 40, no. 4, 2011, doi: 10.1063/1.3653552.
- [186] S. M. Van Ruth, J. P. Roozen, and M. Jansen, "Aroma profiles of vegetable oils varying in fatty acid composition vs . concentrations of primary and secondary lipid oxidation products," *Aroma profiles oxidized Veg. oils*, vol. 44, no. 5, pp 318-322, 2020, doi: 10.1002/1521-3803(20001001)44:5<318::AID-FOOD318>3.0.CO;2-4.
- [187] Z. Li, L. Dong, J. Jeon, S. Y. Kwon, C. Zhao, and H. H. Baek, "Characterization and evaluation of aroma quality in Doubanjiang, a Chinese traditional fermented red pepper paste, using aroma extract dilution analysis and a sensory profile," *Molecules*, vol. 24, no. 17, pp. 7–9, 2019, doi: 10.3390/molecules24173107.
- [188] V. Ferreira, M. Aznar, R. Lo, and J. Cacho, "Quantitative Gas Chromatography - Olfactometry Carried out at Different Dilutions of an Extract . Key Differences in the Odor Profiles of Four High-Quality Spanish Aged Red Wines," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 49, no. 10, pp. 4819–4821, 2001.
- [189] Ä. Keszler, "Mechanism of Volatile Compound Production during Storage of Sunflower oil," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 48, no. 12, pp. 5981–5985, 2000, doi: 10.1021/jf000444e.
- [190] F. Shahidi and W. Y. Oh, "Lipid-derived flavor and off-flavor of traditional and functional foods: an overview," *J. Food Bioact.*, vol. 10, pp. 20–31, 2020, doi: 10.31665/JFB.2020.10224.
- [191] L. Culleré, A. Escudero, J. Cacho, and V. Ferreira, "Gas Chromatography-Olfactometry and Chemical Quantitative Study of the Aroma of Six Premium Quality Spanish Aged Red Wines," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 6, pp. 1656–1657, 2004, doi: 10.1021/jf0350820.

- [192] S. J. Lee and A. C. Noble, "Characterization of Odor-Active Compounds in Californian Chardonnay Wines Using GC-Olfactometry and GC-Mass Spectrometry," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 27, pp. 8039–8040, 2003, doi: 10.1021/jf034747v.
- [193] H. A. L. Souza and N. Bragagnolo, "New Method for the Extraction of Volatile Lipid Oxidation Products Chromatography–Mass Spectrometry and Evaluation of the Effect from Shrimp by Headspace–Solid-Phase Microextraction–Gas of Salting and Drying," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 62, no. 3, pp 590-599, 2014, doi: 10.1021/jf404270f.
- [194] F. Bianchi, M. Careri, A. Mangia, and M. Musci, "Retention indices in the analysis of food aroma volatile compounds in temperature-programmed gas chromatography: Database creation and evaluation of precision and robustness," *J. Sep. Sci.*, vol. 30, no. 4, pp. 563–572, 2007, doi: 10.1002/jssc.200600393.
- [195] M. Q. Hang, Q. Q. Zou, H. Y. Tian, B. G. Sun, and H. T. Chen, "Analysis of volatile components from *Dictyophora rubrovolota* Zang, ji et liou," *Procedia Eng.*, vol. 37, pp. 240–249, 2012, doi: 10.1016/j.proeng.2012.04.234.
- [196] T. Sérot, C. Regost, C. Prost, J. Robin, and J. Arzel, "Effect of dietary lipid sources on odour-active compounds in muscle of turbot (*Psetta maxima*)," *J. Sci. Food Agric.*, vol. 81, no. 14, pp. 1339–1346, 2001, doi: 10.1002/jsfa.950.
- [197] H. Jung, I. Kim, S. Jung, and J. Lee, "Oxidative stability of chia seed oil and flax seed oil and impact of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and garlic (*Allium cepa* L.) extracts on the prevention of lipid oxidation," *Appl. Biol. Chem.*, vol. 64, no. 6, pp. 11–12, 2021, doi: 10.1186/s13765-020-00571-5.
- [198] P. Yang, M. You, H. Song, X. Zhang, and Y. Liao, "Determination of the key aroma compounds in Sachima and using solid phase micro extraction (SPME) and solvent-assisted flavour evaporation spectrometry (GC-O-MS)," *Int. J. Food Prop.*, vol. 21, no. 1, pp. 1233–1245, 2018, doi: 10.1080/10942912.2018.1440242.
- [199] M. S. Macoris, N. S. Janzatti, and D. dos S. Garruti, "Volatile compounds from organic and conventional passion fruit (*Passiflora edulis* F. Flavicarpa) pulp," vol. 31, no. 2, pp. 430–435, 2011, doi: 10.1590/S0101-20612011000200023.
- [200] K. A. U. Mano, Y. U. H. Agi, and T. A. S. Hibamoto, "Volatile Chemicals Identified in Extracts from Newly Hybrid Citrus, Dekopon (*Shiranuhi* mandarin Suppl. J.)," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 19, pp. 5356–5357, 2002.
- [201] J. Ruther, "Retention index database for identification of general green leaf volatiles in plants by coupled capillary gas chromatography 2 mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*,

vol. 890, p. 316, 2000.

- [202] E. G. Barbara Rega, Nicole Fournier, Sophie Nicklaus, "Role of Pulp in Flavor Release and Sensory Perception in Orange Juice," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 52, no. 13, p. 4209, 2004.
- [203] M. T. Morales, J. J. Rios, and R. Aparicio, "Changes in the Volatile Composition of Virgin Olive Oil during Oxidation: Flavors and Off-Flavors," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 45, no. 7, pp. 2666–2673, 1997, doi: 10.1021/jf960585+.
- [204] F. Ullrich and W. Grosch, "Identification of the most intense volatile flavour compounds formed during autoxidation of linoleic acid," *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, vol. 184, no. 4, pp. 280–281, 1987, doi: 10.1007/BF01027663.
- [205] K. L. Goodner, "Practical retention index models of OV-101, DB-1, DB-5, and DB-Wax for flavor and fragrance compounds," *LWT - Food Sci. Technol.*, vol. 41, no. 6, pp. 951–954, 2008, doi: 10.1016/j.lwt.2007.07.007.
- [206] R. G. Binder, C. E. Turner, and R. A. Flath, "Volatile Components of Purple Starthistle," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 38, no. 4, p. 1054, 1990.
- [207] H. S. Choi, "Character impact odorants of citrus hallabong ([*C. unshiu* Marcov × *C. sinensis* Osbeck] × *C. reticulata* Blanco) cold-pressed peel oil," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 51, no. 9, pp. 2688–2689, 2003, doi: 10.17660/ActaHortic.2005.678.16.
- [208] M. Khan, A. Mahmood, and H. Z. Alkhatlan, "Characterization of leaves and flowers volatile constituents of *Lantana camara* growing in central region of Saudi Arabia," *Arab. J. Chem.*, vol. 9, no. 6, pp. 3–5, 2016, doi: 10.1016/j.arabjc.2015.11.005.
- [209] S. Le Guen, C. Prost, and M. Demaimay, "Characterization of odorant compounds of mussels (*Mytilus edulis*) according to their origin using gas chromatography-olfactometry and gas chromatography-mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 896, pp. 364–367, 2000, doi: 10.1016/S0021-9673(00)00729-9.
- [210] M. Qian and G. Reineccius, "Potent aroma compounds in Parmigiano Reggiano cheese studied using a dynamic headspace (purge-trap) method," *Flavour Fragr. J.*, vol. 18, no. 3, p. 258, 2003, doi: 10.1002/ffj.1194.
- [211] B. Weckerle, R. Bastl-Borrmann, E. Richling, K. Hör, C. Ruff, and P. Schreier, "Cactus pear (*Opuntia ficus indica*) flavour constituents - Chiral evaluation (MDGC-MS) and isotope ratio (HRGC-IRMS) analysis," *Flavour Fragr. J.*, vol. 16, no. 5, p. 362, 2001, doi: 10.1002/ffj.1012.

- [212] J. Elisa, V. Manfroi, M. Zanus, M. Lazarotto, and C. Alcaraz, "Characterization of the volatile profile of Brazilian Merlot wines through comprehensive two dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometric detection," *J. Chromatogr. A*, vol. 1226, pp. 124–139, 2012, doi: 10.1016/j.chroma.2012.01.002.
- [213] S. Wu, T. Xu, and D. Huang, "Chemical compositions of the volatile extracts from seeds of *Dendranthema nankingense* and *Borago officinalis*," *J. Food Drug Anal.*, pp. 1–7, 2014, doi: 10.1016/j.jfda.2014.10.006.
- [214] M. K. Cowan, *Microbiology - A Systems Approach*, 3rd Edition, McGraw-Hill, New York, 2012.
- [215] M. E. Embuscado, *Herbs and spices as antioxidants for food preservation*, Elsevier Ltd, Baltimore, 2015.

Anexos

Anexo I – Análises Físico-Químicas

As **Figuras I.1 – I.4** mostram os resultados obtidos da acidez (%ácido acético) para as combinações de Maionese 65%. Já as **Figuras I.5 e I.6** mostram os resultados da acidez para o Ketchup e Molho 0%, respetivamente.

Acidez

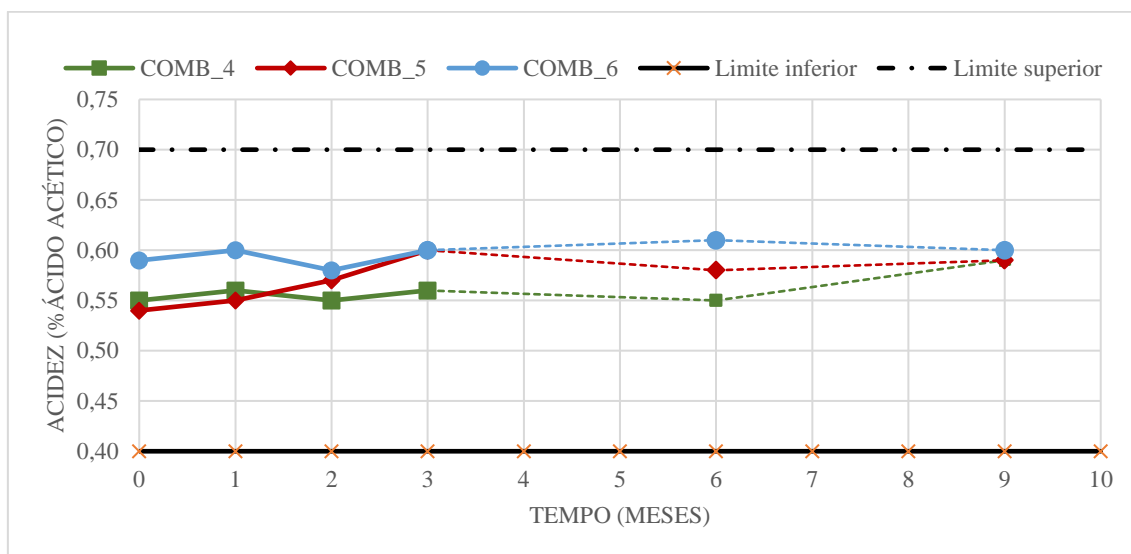


Figura I.1 - Valores da acidez para combinações de Maionese 65% Sorbato ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

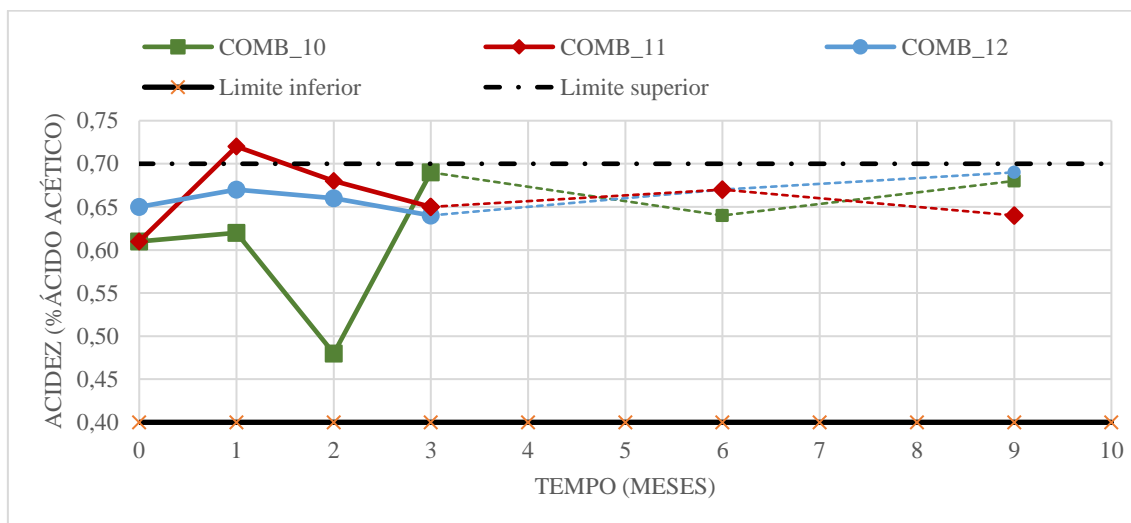


Figura I.2 - Valores da acidez para combinações de Maionese 65% ELAL ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

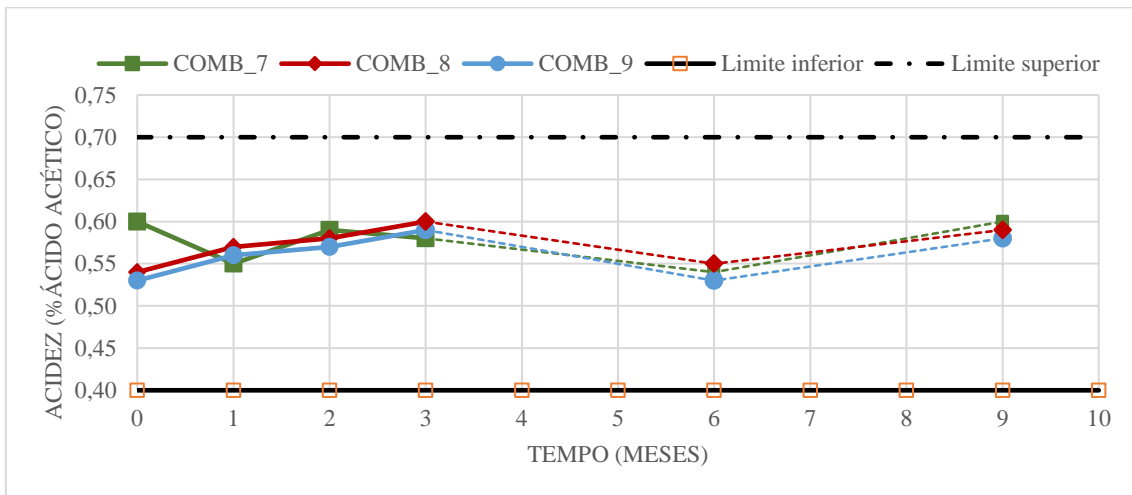


Figura I.3 - Valores da acidez para combinações de Maionese 65% VinTamp ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

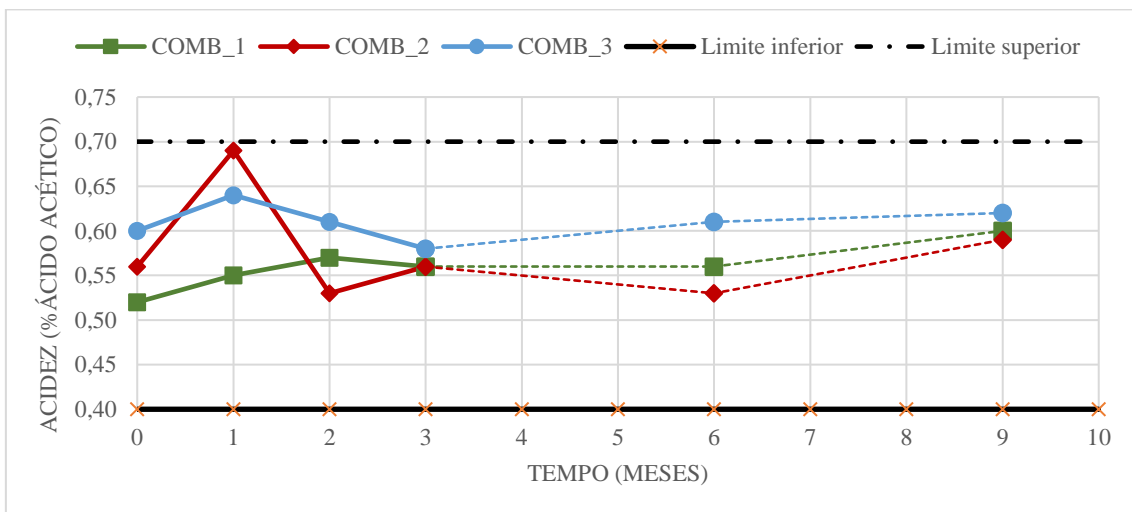


Figura I.4 - Valores de acidez para combinações de Maionese 65% sem conservante ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

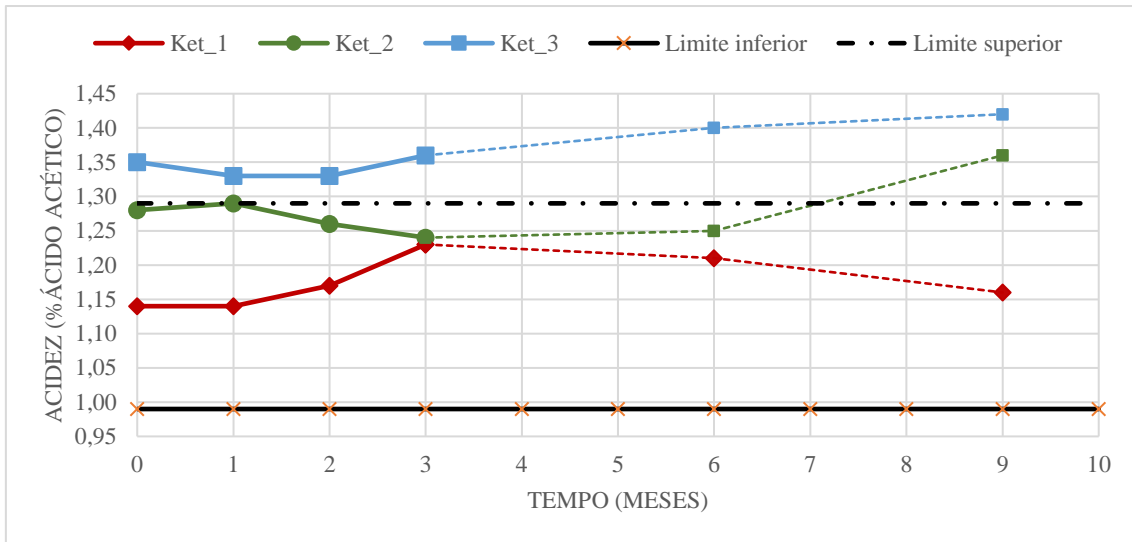


Figura I.5 - Valores de acidez para combinações de Ketchup ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

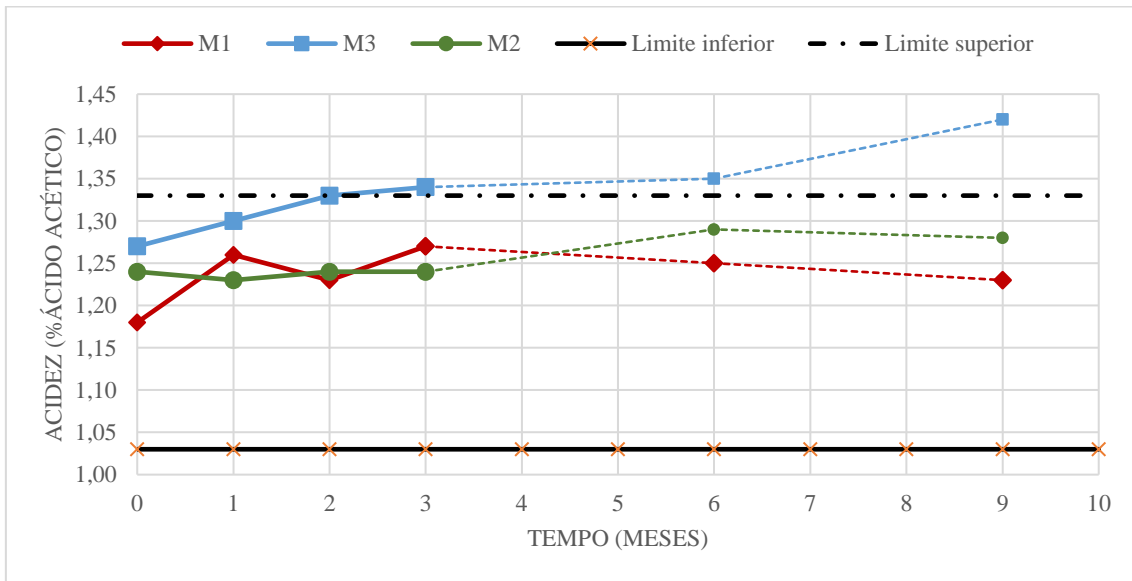


Figura I.6 - Valores de acidez para combinações Molho 0% ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

Cloretos

As **Figuras I.7 – I.10** mostram os valores de cloretos para as combinações de Maionese 65% ao longo do tempo de acompanhamento. As **Figuras I.11 e I.12** revelam os valores de cloretos obtidos para o Ketchup e Molho 0%.

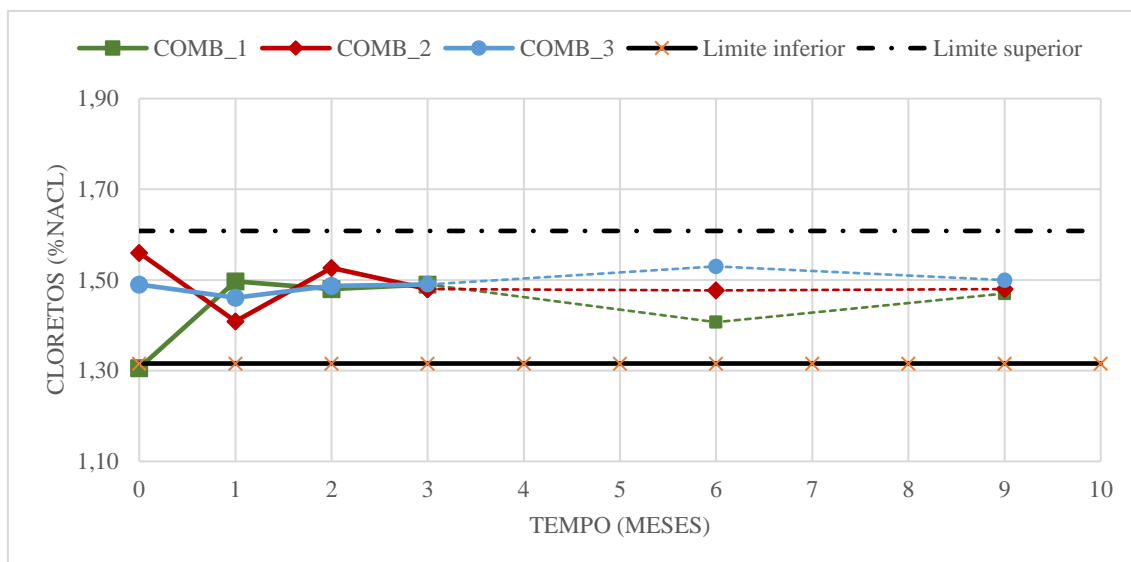


Figura I.7 - Valores de cloretos para combinações de Maionese 65% S/conservante ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

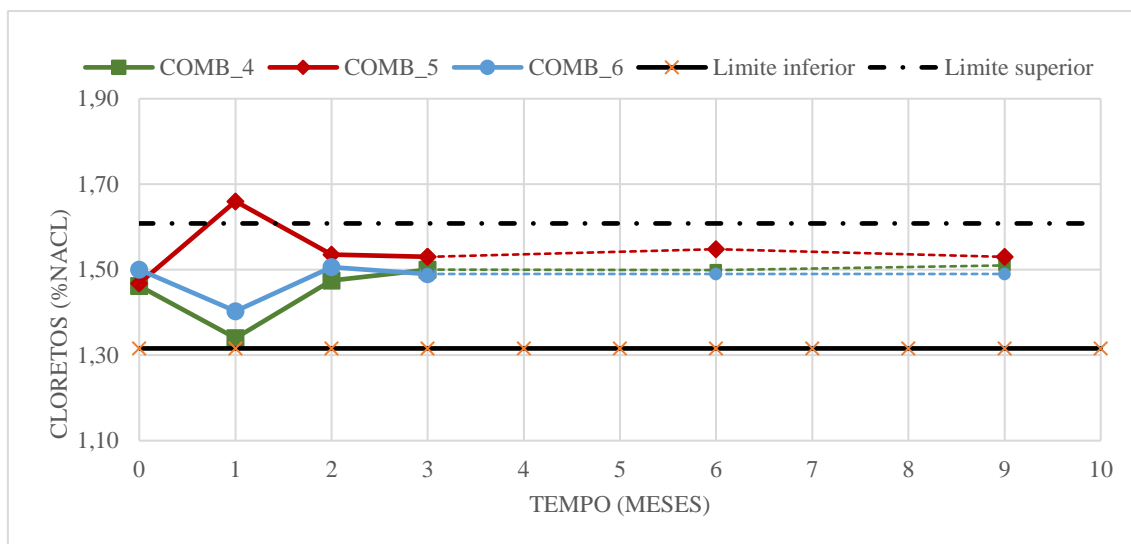


Figura I.8 - Valores de cloretos para combinações de Maionese 65% Sorbato ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

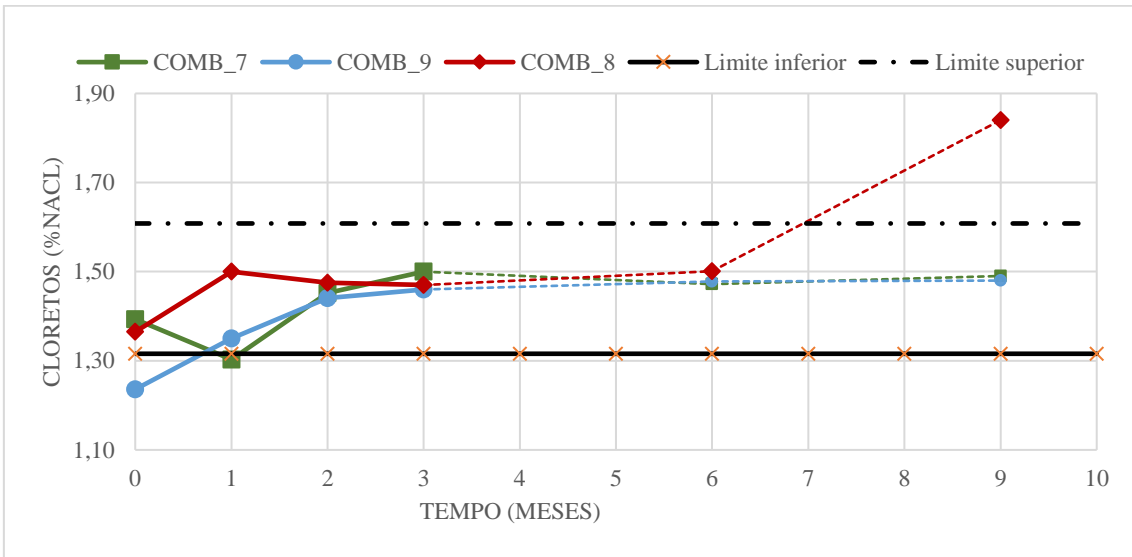


Figura I.9 - Valores de cloretos para combinações de Maionese 65% VinTamp ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

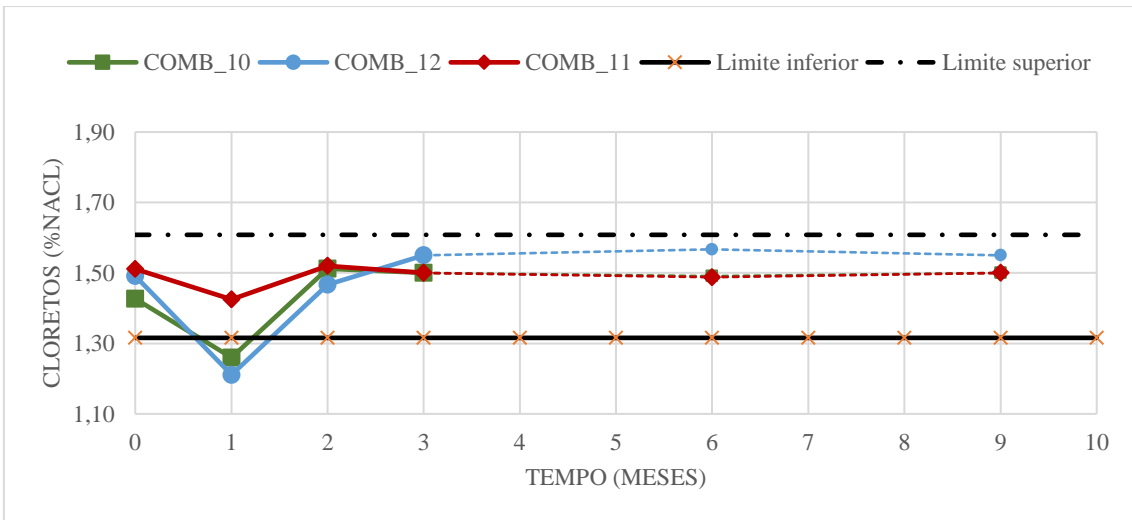


Figura I.10 - Valores de cloretos para combinações Maionese 65% ELAL ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

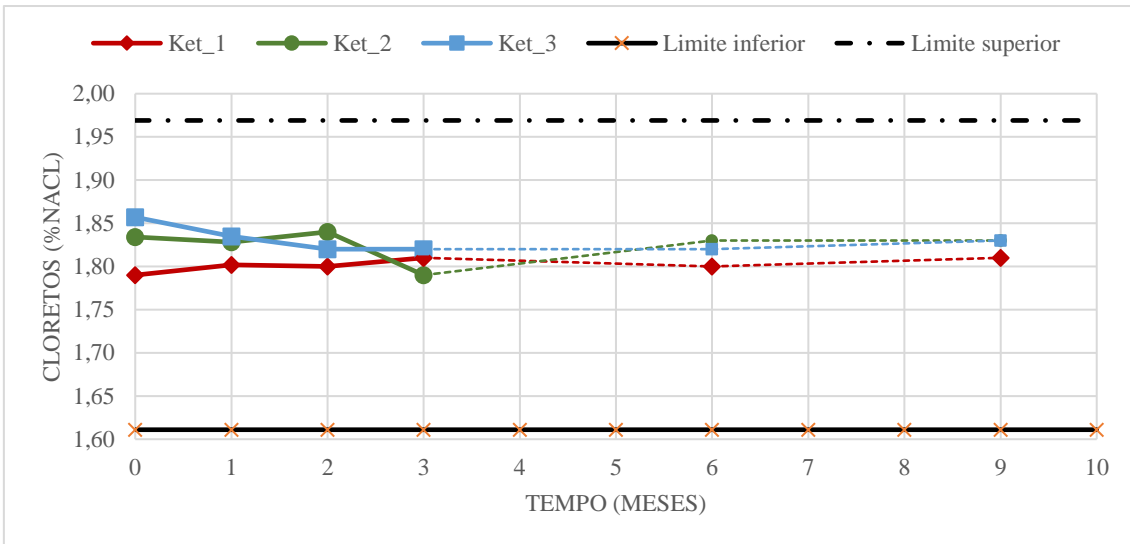


Figura I.11 - Valores de cloretos para combinações Ketchup ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

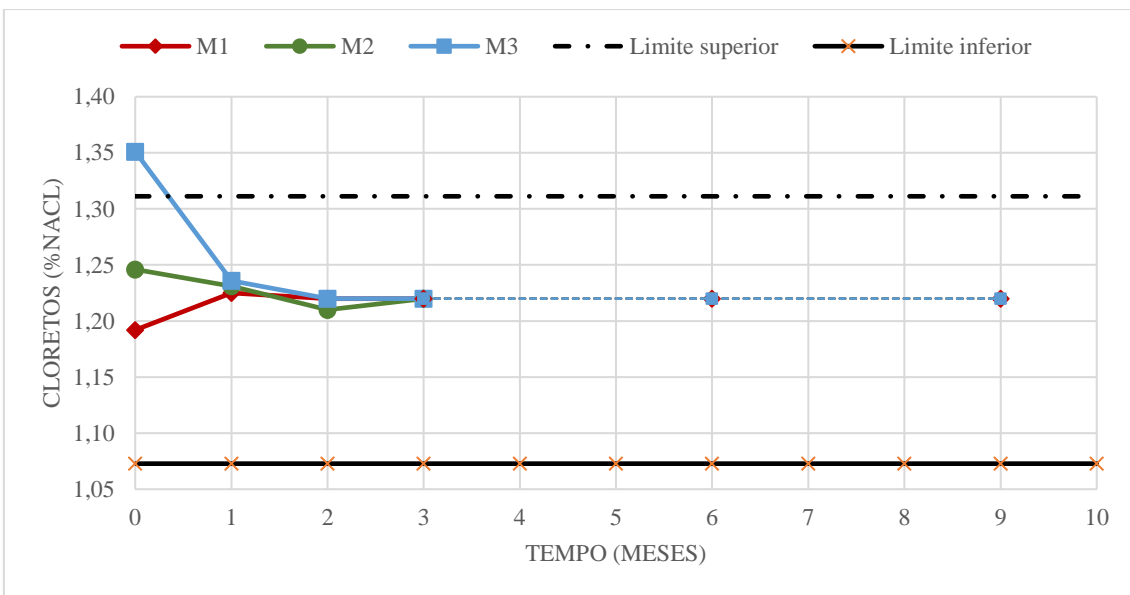


Figura I.12 - Valores de cloretos para combinações Molho 0% ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

pH

Através das **Figuras I.13 e I.14** é possível observar os valores de pH obtidos para as combinações de Maionese 65% Sem conservante e Sorbato de Potássio.

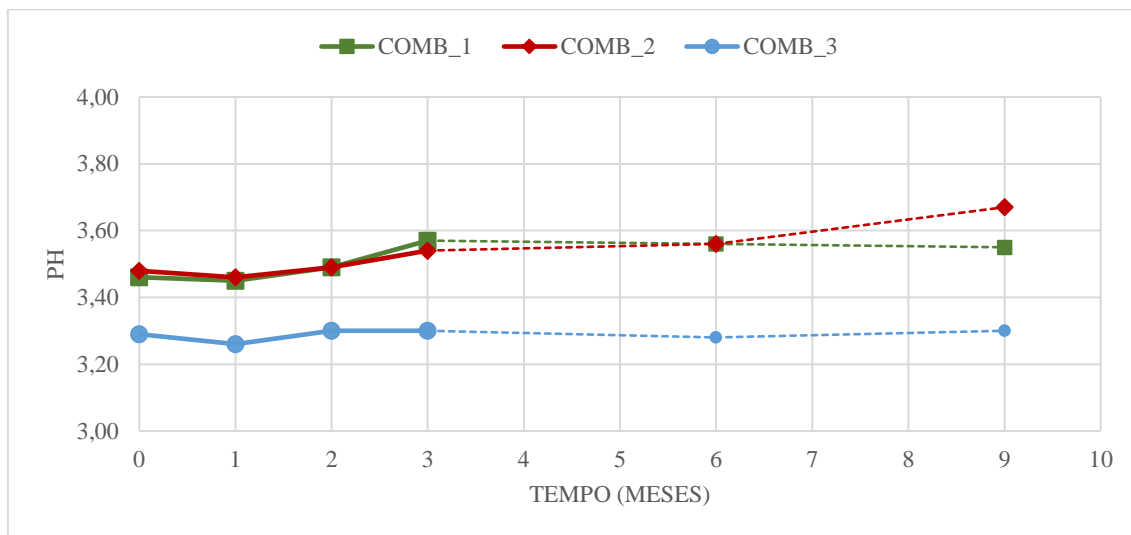


Figura I.13 - Valores de pH para combinações de Maionese 65% sem conservante ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

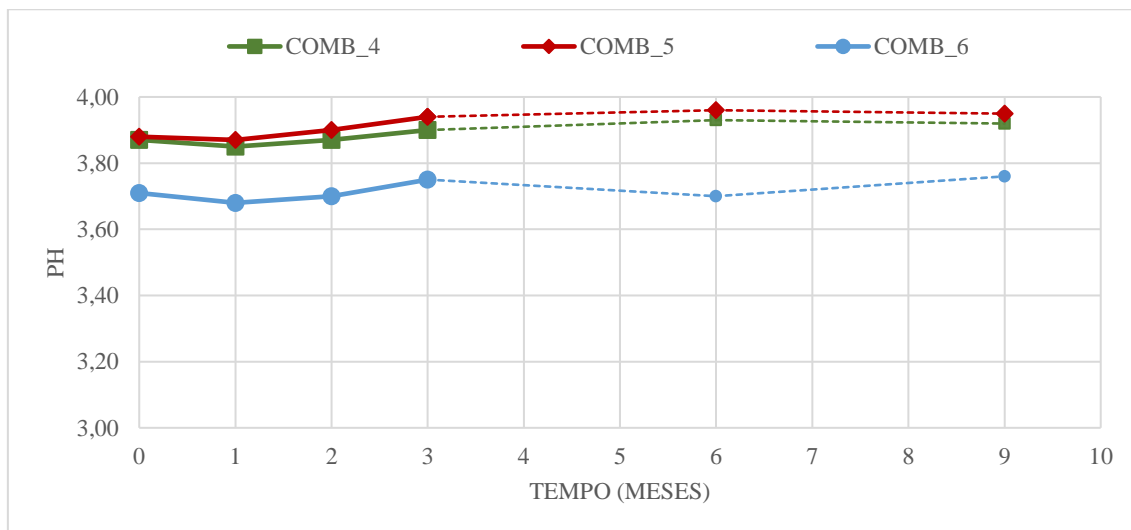


Figura I.14 - Valores de pH para combinações de Maionese 65% Sorbato ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

Viscosidade

As Figuras I.15 e I.16 mostram os valores de viscosidade obtidos nas Maionese 65% VinTamp e ELAL.

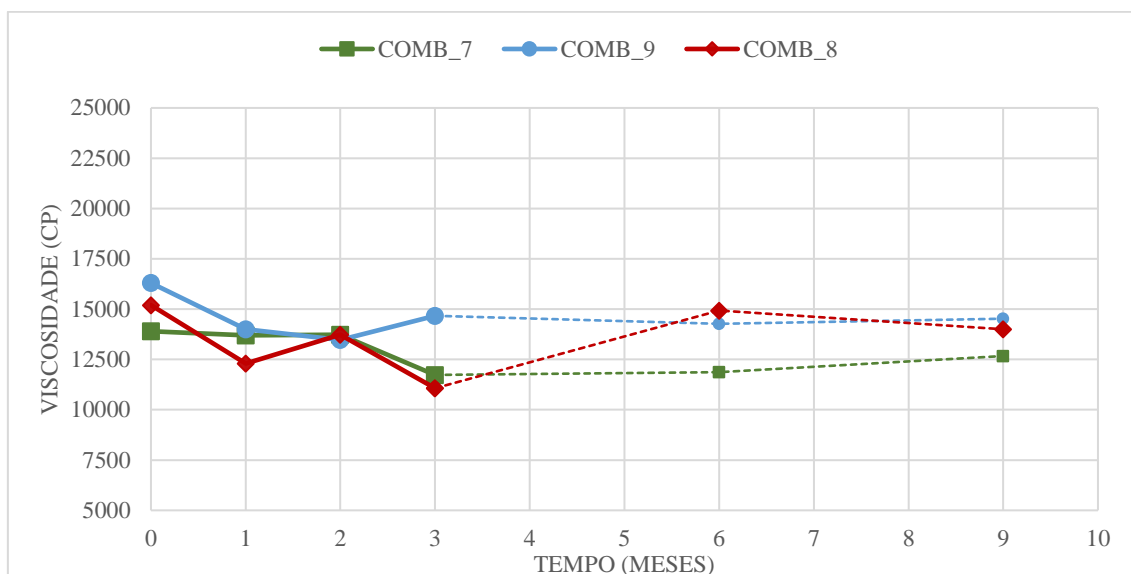


Figura I.15 - Valores da viscosidade para combinações de Maionese 65% VinTamp ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

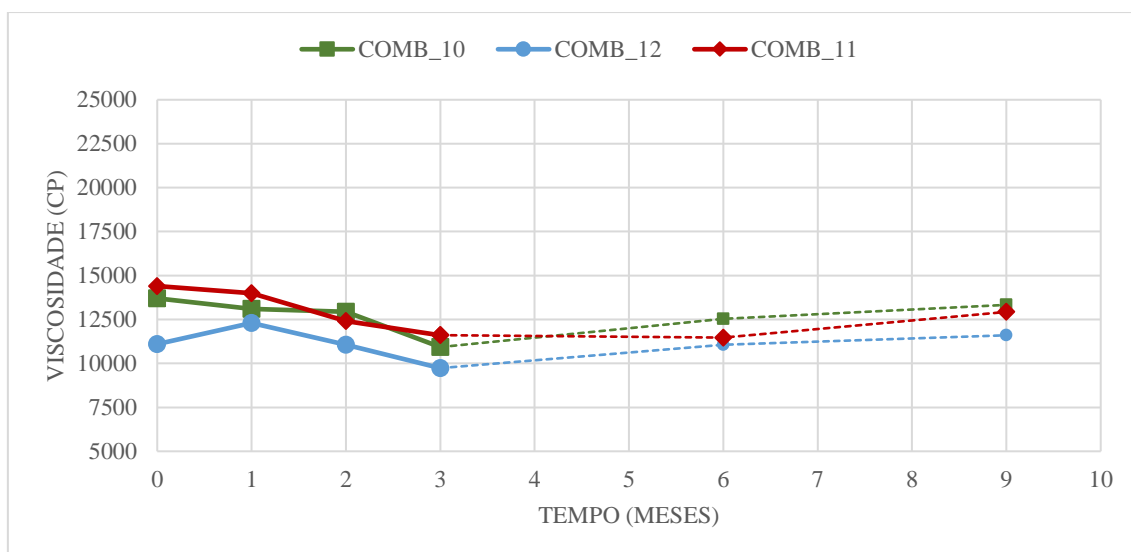


Figura I.16 - Valores da viscosidade para combinações de Maionese 65% ELAL ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

Brix

As Figuras I.17 e I.18 apresentam os valores obtidos do Brix para Ketchup e Molho 0%, respetivamente.

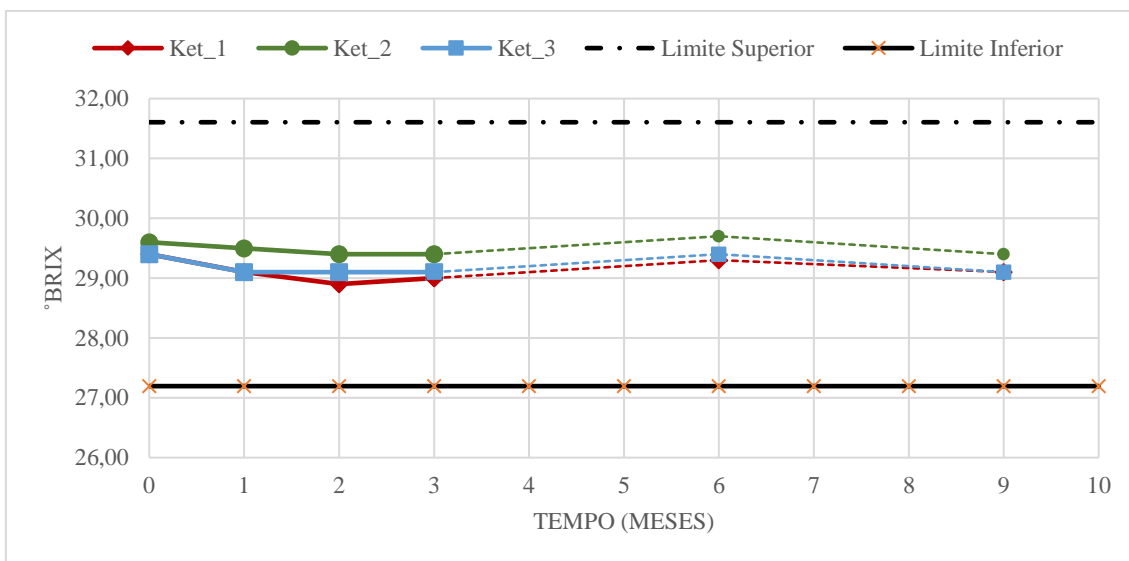


Figura I.17 - Valores de °Brix para combinações Ketchup ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

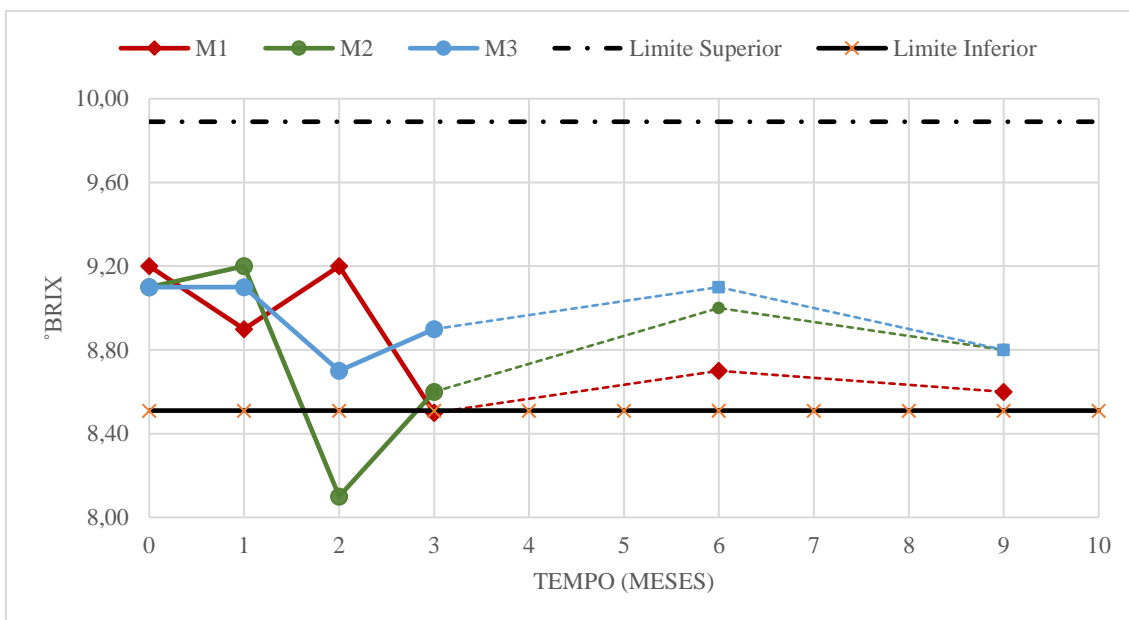


Figura I.18 - Valores de °Brix para combinações Molho 0% ao longo do tempo de acompanhamento. As linhas a tracejado representam os resultados obtidos para as amostras armazenadas 60 e 90 dias em câmara climática.

Anexo II – Análise dos compostos de oxidação secundários

Maionese 65% sem conservante + Alecrim (COMB_3)

As Tabelas II.1 e II.2 apresentam os valores de tempo de retenção (min) e LRI calculado e LRI da literatura para todos os compostos identificados na COMB_3 [169, 170, 173–188, 191–213].

Tabela II.1 - Monitorização dos compostos de oxidação secundários identificados, tempo de retenção e índices de retenção linear para a COMB_3 ao fim de 2 meses em prateleira.

| Nome | Tempo de retenção (min) | LRI _{Calculado} | LRI _{Literatura} |
|------------------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Etanol | 12,61 | 949 | [900 – 932] |
| Pentanal | 14,33 | 991 | [935 – 980] |
| 3-Penten-2-ona | 14,92 | 1005 | [1120] |
| Hexanal | 18,73 | 1095 | [1064 – 1097] |
| Heptanal | 23,04 | 1201 | [953 – 1199] |
| 2-Pentil furano | 24,78 | 1247 | [1211 – 1240] |
| 1-Pentanol | 25,48 | 1265 | [1233 – 1264] |
| Octanal | 27,13 | 1308 | [1270 – 1307] |
| 1-Octen-3-ona | 27,64 | 1323 | [1294 – 1323] |
| (2Z) -Heptenal | 28,69 | 1352 | [1349 – 1472] |
| 1-Octen-1-ol, acetato | 30,07 | 1390 | [1380] |
| Nonanal | 30,95 | 1415 | [1376-1407] |
| Octanoato de etilo | 32,17 | 1451 | [1424 – 1446] |
| (2E) -Octenal | 32,46 | 1460 | [1420 – 1442] |
| Ácido Acético | 32,78 | 1469 | [1434 – 1477] |
| Furfural | 33,58 | 1493 | [1432 – 1485] |
| (2E,4E) -Heptadienal | 34,73 | 1528 | [1457 – 1497] |
| 2(E)-Hexen-1-ol benzoato | 35,93 | 1565 | [1587] |
| (2E) -Octen-1-ol | 38,11 | 1634 | [1585 – 1610] |
| Decanoato de etilo | 38,73 | 1656 | [1638] |
| (2E) -Decenal | 39,39 | 1677 | [1635 – 1677] |
| Benzeneacetaldeído | 39,66 | 1686 | [1623 – 1646] |
| <i>trans</i> -4-Decenoato de etilo | 40,39 | 1710 | n.e. |
| α -Terpineol | 40,98 | 1731 | [1695 – 1735] |
| (2E,4E) -Decadienal | 42,99 | 1800 | [1710 – 1820] |
| 2,4-Decadienal | 44,41 | 1852 | n.e. |
| Ácido Hexanóico | 45,37 | 1887 | [1784 – 1872] |

n.e. – Não encontrado na literatura.

Tabela II.2 - Monitorização dos compostos de oxidação secundários identificados, tempo de retenção e índices de retenção linear para a COMB_3 ao fim de 3 meses em câmara climática.

| Nome | Tempo de retenção (min) | LRI _{Calculado} | LRI _{Literatura} |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Etanol | 12,59 | 949 | [900 – 932] |
| Pentanal | 14,32 | 991 | [935 – 980] |
| 3-Penten-2-ona | 14,92 | 1005 | [1120] |
| Hexanal | 18,70 | 1095 | [1064 – 1097] |
| Heptanal | 23,03 | 1201 | [953 – 1199] |
| 2-Pentil furano | 24,74 | 1246 | [1211 – 1240] |
| 1-Pentanol | 25,47 | 1265 | [1233 – 1264] |
| Octanal | 27,09 | 1307 | [1270 – 1307] |
| 1-Octen-3-ona | 27,62 | 1322 | [1294 – 1323] |
| (2Z) -Heptenal | 28,68 | 1351 | [1349 – 1472] |
| 1-Octen-1-ol acetato | 30,04 | 1389 | [1380] |
| Nonanal | 30,93 | 1414 | [1376-1407] |
| (2E) -Octenal | 32,43 | 1459 | [1420 – 1442] |
| Ácido Acético | 32,79 | 1469 | [1434 – 1477] |
| Furfural | 33,56 | 1492 | [1432 – 1485] |
| (2E,4E) -Heptadienal | 34,71 | 1527 | [1457 – 1497] |
| 2(E) -Hexen-1-ol benzoato | 35,97 | 1567 | [1552–1588] |
| (2E) -Octen-1-ol | 38,09 | 1634 | [1585 – 1610] |
| (2E) -Decenal | 39,38 | 1677 | [1635 – 1677] |
| α -Terpineol | 40,96 | 1730 | [1695 – 1735] |
| (2E,4E) -Decadienal | 42,97 | 1798 | [1710 – 1820] |
| 2,4-Decadienal | 44,39 | 1850 | n.e. |
| Ácido Hexanóico | 45,33 | 1885 | [1784 – 1872] |

n.e. – Não encontrado na literatura

Maionese 65% sem conservante + EDTA (COMB_1)

As Tabelas II.3 e II.4 apresentam os valores de tempo de retenção (min) e LRI calculado e LRI da literatura para todos os compostos identificados na COMB_1^[169, 170, 173-188, 191-213].

Tabela II.3 - Monitorização dos compostos de oxidação secundários identificados, tempo de retenção e índices de retenção linear para a COMB_1 ao fim de 2 meses em prateleira.

| Nome | Tempo de retenção (min) | LRI _{Calculado} | LRI _{Literatura} |
|------------------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Etanol | 12,60 | 949 | [900-932] |
| Hexanal | 18,71 | 1095 | [1064-1097] |
| Heptanal | 23,04 | 1208 | [953-1199] |
| 2-Pentil furano | 24,76 | 1246 | [1211-1240] |
| Octanal | 27,11 | 1308 | [1270-1307] |
| (2Z) -Heptenal | 28,68 | 1351 | [1349 – 1472] |
| Nonanal | 30,93 | 1415 | [1376-1407] |
| Octanoato de etilo | 32,16 | 1451 | [1424 – 1446] |
| (2E) -Octenal | 32,46 | 1460 | [1420 – 1442] |
| Ácido Acético | 32,65 | 1465 | [1434 – 1477] |
| 2,5 – Dimetil Furano | 33,57 | 1492 | n.e. |
| Benzaldeído | 35,98 | 1567 | [1503 – 1625] |
| Decanoato de etilo | 38,71 | 1655 | [1638] |
| <i>trans</i> -4-Decenoato de etilo | 40,38 | 1710 | n.e. |
| 2,4-Decadienal | 44,41 | 1852 | n.e. |

n.e. – Não encontrado na literatura.

$$LRI = 100 * \left[\frac{t_c - t_n}{t_{n+1} - t_n} + n \right]$$

Equação II.1 - Cálculo do LRI.

Onde, t_c é o tempo de retenção do composto de interesse; t_n é o tempo de retenção do hidrocarboneto anterior; t_{n+1} é o tempo de retenção do hidrocarboneto posterior; n representa o número de carbonos do hidrocarboneto anterior^[194].

Tabela II.4 - Monitorização dos compostos de oxidação secundários identificados, tempo de retenção e índices de retenção linear para a COMB_1 ao fim de 3 meses em câmara climática.

| Nome | Tempo de retenção (min) | LRI _{Calculado} | LRI _{Literatura} |
|----------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Etanol | 12,59 | 949 | [900 – 932] |
| Pentanal | 14,32 | 991 | [935 – 980] |
| 3-Penten-2-ona | 14,90 | 1005 | [1120] |
| Hexanal | 18,74 | 1095 | [1064 – 1097] |
| Heptanal | 23,04 | 1201 | [953 – 1199] |
| 2 – Pentil furano | 24,78 | 1246 | [1211 – 1240] |
| Octanal | 27,12 | 1308 | [1270 – 1307] |
| (2Z) -Heptenal | 28,66 | 1351 | [1349 – 1472] |
| Nonanal | 30,94 | 1415 | [1376-1407] |
| (3E) -Octen-2-ona | 31,63 | 1435 | [1379 – 1406] |
| (2E) -Octenal | 32,45 | 1459 | [1420 – 1442] |
| Ácido Acético | 32,82 | 1470 | [1434 – 1477] |
| Furfural | 33,56 | 1492 | [1432 – 1485] |
| 2,5 – Dimetil furano | 33,56 | 1492 | n.e. |
| 2-Etil-1-hexanol | 33,92 | 1503 | [1481 – 1502] |
| (2E,4E) -Heptadienal | 34,71 | 1528 | [1457 – 1497] |
| (2E) -Nonenal | 35,98 | 1568 | [1527 – 1555] |
| (2E) -Decenal | 39,39 | 1677 | [1635 – 1677] |
| (2E,4E) -Decadienal | 42,96 | 1800 | [1710 – 1820] |
| 2,4-Decadienal | 44,39 | 1851 | n.e. |
| Ácido Hexanóico | 45,36 | 1886 | [1784 – 1872] |

n.e. – Não encontrado na literatura

Maionese 65% sem conservante + XTRA (COMB_2)

As Tabelas II.5 e II.6 apresentam os valores de tempo de retenção (min) e LRI calculado e LRI da literatura para todos os compostos identificados na COMB_2 [169, 170, 173-188, 191-213]

Tabela II.5 - Monitorização dos compostos de oxidação secundários identificados, tempo de retenção e índices de retenção linear para a COMB_2 ao fim de 2 meses em prateleira.

| Nome | Tempo de retenção (min) | LRI _{Calculado} | LRI _{Literatura} |
|----------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Etanol | 12,60 | 949 | [900 – 932] |
| Hexanal | 18,70 | 1095 | [1064 – 1097] |
| Heptanal | 23,03 | 1201 | [953 – 1199] |
| 2- Pentil furano | 24,74 | 1246 | [1211 – 1240] |
| Octanal | 27,09 | 1307 | [1270 – 1307] |
| 1-Octen-3-ona | 27,61 | 1322 | [1294 – 1323] |
| (2Z) -Heptenal | 28,68 | 1351 | [1349 – 1472] |
| Nonanal | 30,93 | 1415 | [1376-1407] |
| Octanoato de etilo | 32,16 | 1451 | [1424 – 1446] |
| (2E) -Octenal | 32,45 | 1459 | [1420 – 1442] |
| Ácido Acético | 32,69 | 1466 | [1434 – 1477] |
| 2,5- Dimetil furano | 33,56 | 1492 | n.e. |
| (2E,4E) -Heptadienal | 34,71 | 1527 | [1457 – 1497] |
| Decanoato de etilo | 38,71 | 1655 | [1638] |
| (2E,4E) -Decadienal | 42,97 | 1799 | [1710 – 1820] |
| 2,4-Decadienal | 44,40 | 1835 | n.e. |
| Ácido Hexanóico | 45,37 | 1887 | [1784 – 1872] |

n.e. - Não encontrado na literatura.

Tabela II.6 - Monitorização dos compostos de oxidação secundários identificados, tempo de retenção e índices de retenção linear para a COMB_2 ao fim de 3 meses em câmara climática.

| Nome | Tempo de retenção (min) | LRI _{Calculado} | LRI _{Literatura} |
|----------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Etanol | 12,58 | 949 | [900 – 932] |
| Pentanal | 14,33 | 991 | [935 – 980] |
| 3-Penten-2-ona | 14,91 | 1005 | [1120] |
| Hexanal | 18,67 | 1094 | [1064 – 1097] |
| Heptanal | 23,02 | 1201 | [953 – 1199] |
| 2- Pentil furano | 24,74 | 1245 | [1211 – 1240] |
| 1-Pentanol | 25,47 | 1265 | [1233 – 1264] |
| Octanal | 27,10 | 1308 | [1270 – 1307] |
| 1-Octen-3-ona | 27,63 | 1322 | [1294 – 1323] |
| (2Z) -Heptenal | 28,66 | 1351 | [1349 – 1472] |
| 1-Octen-1-ol acetato | 30,05 | 1389 | [1380] |
| Nonanal | 30,99 | 1415 | [1376-1407] |
| (2E) -Octenal | 32,45 | 1459 | [1420 – 1442] |
| Ácido Acético | 32,69 | 1468 | [1434 – 1477] |
| Furfural | 33,57 | 1492 | [1432 – 1485] |
| 2-Etil-1-hexanol | 33,94 | 1503 | [1481 – 1502] |
| (2E,4E) -Heptadienal | 34,71 | 1527 | [1457 – 1497] |
| (2E) -Nonenal | 35,99 | 1567 | [1527 – 1555] |
| (2E) -Octen-1-ol | 38,09 | 1634 | [1585 – 1610] |
| (2E) -Decenal | 39,38 | 1677 | [1635 – 1677] |
| Benzeneacetaldeído | 39,63 | 1685 | [1623-1646] |
| (2E,4E) -Decadienal | 42,97 | 1800 | [1710 –1820] |
| 2,4-Decadienal | 44,38 | 1851 | n.e. |
| Ácido Hexanóico | 45,36 | 1887 | [1784 – 1872] |

n.e. – Não encontrado na literatura.

Anexo III – Acompanhamento sensorial

As Tabelas III.1 – III.6 apresentam os valores das coordenadas CIELab (L*, a*, b*) das matrizes alimentares em estudo.

Tabela III.1 - Valores das coordenadas CIELab (L*,a*,b*) para as amostras de Maionese 65% sem conservante ao longo do tempo de acompanhamento.

| Maionese 65% S/conservante | Cor | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------|-----|----|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| | L* | | | | | | a* | | | | | | b* | | | | | |
| | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F |
| COMB_1 | 91 | 91 | 91 | 91 | 91 | 90 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 14 | 15 | 14 | 14 | 13 | 13 |
| COMB_2 | 89 | 90 | 89 | 89 | 89 | 89 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 15 | 14 | 16 | 14 | 13 | 13 |
| COMB_3 | 90 | 90 | 90 | 90 | 89 | 90 | 4 | 4 | 3 | 3 | 2 | 3 | 22 | 21 | 15 | 15 | 14 | 14 |

A – mês de produção; B – 1 mês em prateleira; C – 2 meses em prateleira; D – 3 meses em prateleira; E – 6 meses em prateleira; F – 9 meses em prateleira;

Tabela III.2 - Valores das coordenadas CIELab (L*,a*,b*) para as amostras de Maionese 65% Sorbato de potássio ao longo do tempo de acompanhamento.

| Maionese 65% Sorbato | Cor | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-----|----|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| | L* | | | | | | a* | | | | | | b* | | | | | |
| | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F |
| COMB_4 | 91 | 91 | 91 | 91 | 91 | 91 | 2 | 3 | 3 | 3 | 3 | 2 | 14 | 15 | 15 | 15 | 14 | 13 |
| COMB_5 | 88 | 89 | 89 | 89 | 89 | 89 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 14 | 15 | 14 | 15 | 13 | 13 |
| COMB_6 | 90 | 90 | 89 | 90 | 91 | 90 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 23 | 17 | 16 | 16 | 15 | 15 |

A – mês de produção; B – 1 mês em prateleira; C – 2 meses em prateleira; D – 3 meses em prateleira; E – 6 meses em prateleira; F – 9 meses em prateleira;

Tabela III.3 - Valores das coordenadas CIELab (L*,a*,b*) para as amostras de Maionese 65% VinTamp ao longo do tempo de acompanhamento.

| Maionese 65% VinTamp | Cor | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|-----|----|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| | L* | | | | | | a* | | | | | | b* | | | | | |
| | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F |
| COMB_7 | 92 | 91 | 91 | 91 | 91 | 90 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 14 | 14 | 14 | 14 | 13 | 13 |
| COMB_8 | 90 | 89 | 91 | 90 | 90 | 90 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 14 | 15 | 14 | 14 | 14 | 14 |
| COMB_9 | 91 | 91 | 89 | 89 | 89 | 89 | 3 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 15 | 15 | 14 | 14 | 13 | 13 |

A – mês de produção; B – 1 mês em prateleira; C – 2 meses em prateleira; D – 3 meses em prateleira; E – 6 meses em prateleira; F – 9 meses em prateleira;

Tabela III.4 - Valores das coordenadas CIELab (L*,a*,b*) para as amostras de Maionese 65% ELAL ao longo do tempo de acompanhamento.

| Maionese 65% ELAL | Cor | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-----|----|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|
| | L* | | | | | | a* | | | | | | b* | | | | | |
| | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F |
| COMB_10 | 90 | 90 | 91 | 90 | 90 | 90 | 2 | 2 | 3 | 3 | 2 | 3 | 15 | 14 | 13 | 14 | 13 | 14 |
| COMB_11 | 89 | 89 | 89 | 90 | 88 | 89 | 2 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 16 | 16 | 15 | 14 | 13 | 14 |
| COMB_12 | 89 | 88 | 89 | 88 | 88 | 87 | 2 | 2 | 3 | 2 | 2 | 2 | 15 | 14 | 15 | 14 | 13 | 13 |

A – mês de produção; B – 1 mês em prateleira; C – 2 meses em prateleira; D – 3 meses em prateleira; E – 6 meses em prateleira; F – 9 meses em prateleira;

Tabela III.5 - Valores das coordenadas CIELab (L*, a*, b*) para as amostras de Ketchup ao longo do tempo de acompanhamento.

| Ketchup | Cor | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | L* | | | | | | a* | | | | | | b* | | | | | |
| | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F |
| Ket_1 | 23 | 23 | 23 | 23 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 26 | 22 | 23 | 22 | 22 | 19 | 18 | 19 | 19 |
| Ket_2 | 25 | 25 | 25 | 23 | 28 | 26 | 27 | 27 | 27 | 28 | 24 | 24 | 22 | 22 | 18 | 16 | 17 | 18 |
| Ket_3 | 24 | 24 | 26 | 24 | 26 | 27 | 27 | 27 | 26 | 27 | 23 | 23 | 22 | 22 | 19 | 17 | 17 | 16 |

A – mês de produção; **B** – 1 mês em prateleira; **C** – 2 meses em prateleira; **D** – 3 meses em prateleira; **E** – 6 meses em prateleira; **F** – 9 meses em prateleira;

Tabela III.6 - Valores das coordenadas CIELab (L*,a*,b*) para as amostras de Molho 0% ao longo do tempo de acompanhamento.

| Molho 0% | Cor | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|
| | L* | | | | | | a* | | | | | | b* | | | | | |
| | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F | A | B | C | D | E | F |
| M1 | 28 | 28 | 30 | 28 | 28 | 28 | 19 | 19 | 18 | 17 | 15 | 17 | 22 | 21 | 18 | 19 | 16 | 19 |
| M2 | 28 | 27 | 28 | 28 | 28 | 28 | 19 | 17 | 16 | 17 | 16 | 17 | 22 | 19 | 18 | 19 | 17 | 19 |
| M3 | 28 | 27 | 30 | 29 | 28 | 27 | 19 | 18 | 17 | 16 | 15 | 15 | 22 | 22 | 17 | 18 | 16 | 17 |

A – mês de produção; **B** – 1 mês em prateleira; **C** – 2 meses em prateleira; **D** – 3 meses em prateleira; **E** – 6 meses em prateleira; **F** – 9 meses em prateleira;